



Aus dem Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Charlotte Förster

**Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Äquivalent akkumulierter
neuronaler Evidenz**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Maximilian Jonathan Pitsch

aus Geisenfeld

Würzburg, April 2023



Referentin bzw. Referent: Univ.-Prof. Dr. Charlotte Förster

Koreferentin bzw. Koreferent: Prof. Dr. Esther Asan

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2024

Der Promovend ist Arzt

Meiner wundervollen Mama und meinem großartigen Papa

&

Meinen liebevollen Großeltern

&

Charlotte

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der Paarungsakt bei <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2. Die Corazonin-Neurone	4
1.3. Das Corazonin-„Fenster“	14
1.4. Der kanonische cAMP-Signalweg	18
1.5. Wissenschaftlicher Hintergrund	22
1.5.1. Intervall-Zeit-Messung	22
1.5.2. Evidenzakkumulation als Grundlage der Entscheidungsfindung	26
1.5.3. Implementierung unterschiedlicher neuronaler Kommunikationsmodi	31
1.6. Ziele der Arbeit	32
2. Studiendesign & Information bezüglich Kooperation	34
3. Material und Methoden	35
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> -Haltung	35
3.2. Beurteilung des Paarungsverhaltens	36
3.3. Optogenetische Stimulationsexperimente	36
3.4. Das Gal4/UAS-System	38
3.5. Das LexA/LexAop-System	39
3.6. RNA-Interferenz	39
3.7. Generierung der benötigten genetisch veränderten Fliegen	41
3.7.1. Hochdurchsatz-Screening	42
3.7.2. Generierung der Corazonin>ACR-Mosaik	49
3.8. FRET-FLIM-Mikroskopie	55
3.9. Statistik	56
3.9.1. Prinzipielles Vorgehen	57

3.9.2. Glaubwürdigkeitsintervalle für Proportionen	57
3.9.3. Bestimmung eines lang andauernden und eines normal langen Paarungsaktes	58
3.9.4. Hypothesentestung an Verhältnissen	59
3.9.5. Glaubwürdigkeitsintervalle von Mittelwerten	59
3.9.6. Hypothesentests an Verteilungen	60
3.9.7. Evidenzakkumulation	60
4. Ergebnisteil	63
4.1. Die Corazonin-Neurone besitzen ein Äquivalent akkumulierter neuronaler Information auf Minutenebene	63
4.2. Das Äquivalent akkumulierter neuronaler Information in den Corazonin-Neuronen ist cAMP	66
4.3. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel führt über eine Aktivierung der Proteinkinase A zum spannungsabhängigen Einstrom von Kalzium-Ionen	73
4.4. Der Zeitpunkt des Corazonin-Signals ist das Produkt einer netzwerkweiten Evidenzakkumulation	85
4.5. CaMKII unterdrückt Eruptionen	98
4.6. Die Corazonin-Neurone sind dazu in der Lage, Evidenz über einen langen Zeitraum hinweg zu akkumulieren	108
5. Diskussion	115
5.1. Intervall-Zeit-Messung	115
5.2. Evidenzakkumulation als Grundlage der Entscheidungsfindung	121
5.3. Die Eruption – ein Aktionspotenzial für Netzwerke?	125

6. Zusammenfassung / Summary	128
7. Literaturverzeichnis	130
8. Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
IV Detaillierte Informationen zu Material und Methoden der ex-vivo Experimente	
V Danksagung	
VI Lebenslauf	
VII Eigene Veröffentlichungen	

1. Einleitung:

Für das Treffen adäquater Entscheidungen ist es essenziell, alle verfügbare relevante Evidenz zu bündeln, zu bewerten, und gegeneinander abzuwägen. Dieser Prozess dauert oftmals einige Sekunden bis viele Minuten an, den Zeitskalen unserer gefühlten Lebensrealität. Das neuronale Äquivalent einer über eine derartige Zeitspanne hinweg akkumulierten Evidenz ist jedoch nicht bekannt. Aufgrund der großen Zahl an biochemischen Signalwegen und der Komplexität neuronaler Interaktionsmuster ist eine Vielzahl von Mechanismen der Evidenzakkumulation auf Intervallzeitskalen denkbar, sodass ein offener, uninformierter Ansatz zur Beantwortung der Frage nach der Identität des neuronalen Äquivalents sinnvoll erscheint. Voraussetzung für die Durchführung experimenteller Untersuchungen im Rahmen eines solchen offenen Ansatzes ist, dass ein Modellorganismus gewählt wird, welcher die parallele Testung einer möglichst großen Anzahl an denkbaren Antworten erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Evidenzakkumulation in Neuronen der Taufliege *Drosophila melanogaster* studiert. Aufgrund der schnellen und kostengünstigen Züchtung und Haltung sowie die für *Drosophila melanogaster* bestehende enorme Bandbreite an neurogenetischen Ressourcen und Techniken ist die Durchführung tausender biochemischer Manipulationen in spezifisch ausgewählten Neuronengruppen möglich. Darüber hinaus können Ergebnisse neuronaler Entscheidungsprozesse anhand gut charakterisierter Verhaltensreaktionen der Taufliege *in-vivo* abgelesen werden. Als Modellverhalten für die Untersuchungen dieser Arbeit dient der angeborene, bezüglich seines Zeitablaufes außerordentlich stereotype, robuste und häufig durchgeführte Paarungsakt (Kopulation) von *Drosophila melanogaster*, dessen neuronale Steuerelemente gut charakterisiert sind.

1.1 Der Paarungsakt bei *Drosophila melanogaster*

Die erfolgreiche Einleitung des Paarungsaktes ist das Ergebnis eines aus vielfältigen Verhaltenselementen zusammengesetzten, komplexen Balzverhaltens. Die Kopulation kann auch durch den ungeübten Betrachter leicht als solche erkannt und verfolgt werden. Zu Beginn besteigt das Männchen das Weibchen, woraufhin eine stereotype Paarungshaltung eingenommen wird, bei der sich das Männchen mit seinen Vorderbeinen auf den Hinterleib des Weibchens stützt und dabei sein unteres Abdomen

so krümmt, dass ein Eindringen des männlichen Genitals in das weibliche Genital möglich ist.



Abbildung 1. Repräsentatives Bild eines *Drosophila*-Paarungsaktes

(mit Genehmigung von Michael Crickmore (Fotograf des Bildes))

Die Dauer des Paarungsaktes unterschiedlicher *Drosophila*-Spezies weist eine erstaunliche Variabilität auf. So paaren sich Vertreter der Spezies *Drosophila robusta* für gerade einmal 40 Sekunden (Grant, 1983), wohingegen Vertreter der Spezies *Drosophila immigrans* eine Paarungsdauer von 40 Minuten aufweisen (Grant, 1983). Innerhalb einer Spezies erweist sich die Zeitdauer, welche ein durchschnittlicher Paarungsakt in Anspruch nimmt, jedoch als außerordentlich robust, sodass z.B. Fliegen der Spezies *Drosophila melanogaster*, so diese ungestört sind, sich im Durchschnitt für etwa 27,7 Minuten paaren, wobei die Standardabweichung bei gerade einmal 4,4 Minuten liegt (Crickmore & Vosshall, 2013).

Die Zeitdauer eines *Drosophila melanogaster*-Paarungsaktes wird dabei, anders als bei anderen *Drosophilae* Spezies (Mazzi et al., 2009), durch das Männchen bestimmt; das Weibchen hat auf die Kopulationsdauer nur minimalen Einfluss (Acebes et al., 2004; Beaver & Giebultowicz, 2004; G. Lee et al., 2001; MacBean & Parsons, 1967). Dies ist für das Studium der neuronalen Steuerung der Kopulationsdauer von großem Vorteil, da

eine Fokussierung auf die Schaltkreise des Männchens ermöglicht wird, ohne dass ein Einfluss vonseiten des Weibchens berücksichtigt werden muss.

Der Zeitpunkt der Ejakulation des Männchens während eines Paarungsaktes weist ebenfalls ein robustes wie präzises Timing auf. Werden ein Männchen und ein Weibchen 5 Minuten nach Beginn der Paarung manuell voneinander getrennt, so wird das Weibchen nie befruchtete Eier legen. Findet eine manuelle Trennung dagegen 8 Minuten nach Beginn der Paarung statt, so wird das Weibchen fast immer befruchtete Eier legen (Gilchrist & Partridge, 2000). Bei der Ejakulation selbst scheint es sich darüber hinaus um ein recht schnelles Alles-oder-Nichts-Ereignis zu handeln, da nach einer manuellen Trennung des Männchens vom Weibchen in der Folge entweder kein Nachwuchs oder aber eine normale Anzahl an Nachwuchs zu beobachten ist (Crickmore & Vosshall, 2013). Faszinierenderweise ist dieser Zeitpunkt der Ejakulation mit einer starken Änderung der Motivation des Männchens hinsichtlich des laufenden Paarungsaktes assoziiert. Wird nämlich das Männchen 5 Minuten nach Beginn der Paarung, also zu einem Zeitpunkt vor der Ejakulation, einem sehr starken und potenziell tödlichen aversiven Reiz, zum Beispiel einem Hitzeschock von 44°C für die Dauer von einer Minute, ausgesetzt, so wird das Männchen dennoch die Kopulation nicht beenden, also darauf verzichten, sich dem Reiz zu entziehen. Wird eben jener Reiz dagegen ca. 7 Minuten nach Beginn des Paarungsaktes appliziert, also nach dem Zeitpunkt der Ejakulation, so wird das Männchen den Paarungsakt in fast allen Fällen sofort beenden (Thornquist et al., 2020).

Es ist also festzuhalten, dass das Männchen willens ist, das eigene sowie das Leben der weiblichen Partnerin, welche, solange die Paarung nicht beendet ist, dem Hitzeschock ebenfalls nicht entfliehen kann, zu riskieren, um die Chance auf eine erfolgreiche Reproduktion zu wahren. Ist aus der Perspektive des Männchens das evolutionäre Ziel des Paarungsaktes, die Ejakulation, jedoch erfüllt, so wird er den Paarungsakt, welcher in ungestörtem Zustand etwa 23 Minuten andauert, bei Vorhandensein ausreichend starker aversiver Stimuli vorzeitig terminieren. Diese ausgeprägte Veränderung in der Motivation des Männchens wird im Folgenden als „motivationaler Schalter“ bezeichnet (Thornquist et al., 2020).

Das Männchen wird den Paarungsakt also erst nach erfolgter Ejakulation beenden. Interessanterweise ist die Paarungsdauer von Männchen mit erschöpften Samenreserven, zum Beispiel aufgrund mehrmaliger aufeinander folgender Paarungsakte, jedoch vergleichbar mit der Paarungsdauer von Männchen mit gefülltem

Samenspeicher. Auch sogenannte „son-of-tudor“ Männchen, welche keine Keimzellen und damit auch kein Sperma bilden können (Xue & Noll, 2000), zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der Paarungsdauer, was vermuten lässt, dass die Dauer eines Paarungsaktes nicht direkt an die Rate oder die Menge der Spermienübertragung gekoppelt ist (Crickmore & Vosshall, 2013).

Da in den letzten Jahren große Fortschritte hinsichtlich des Verständnisses der neuronalen Grundlagen des Kopulationsverhaltens sowie dessen motivationaler sowie zeitlicher Aspekte gelungen sind, sollen die Fortschritte auf diesem Gebiet in den nächsten Kapiteln zusammengefasst und diskutiert werden.

1.2 Die Corazonin-Neurone

Zentrale Elemente des neuronalen Schaltkreises, der den Paarungsakt steuert, sind vier Interneurone im Abdominalganglion des ventralen Nervensystems des *Drosophila melanogaster* Männchens, welche das Neuropeptid Corazonin (Crz) exprimieren. Im Gegensatz zu Crz-exprimierenden Neuronen im Gehirn sind die vier Crz-exprimierenden Neurone des Abdominalganglions nur im Männchen und nicht im Weibchen zu finden. Diese sind also sexuell dimorph, was unter anderem auch auf die Expression der spezifisch männlichen Isoform des Transkriptionsfaktors FruM zurückzuführen ist (Tayler et al., 2012).

Da lediglich die Crz-exprimierenden Neurone im Abdominalganglion Gegenstand dieser Arbeit sind, wohingegen die nicht sexuell dimorphen Crz-exprimierenden Neurone des Gehirns keine Relevanz für die in dieser Arbeit beleuchteten Verhaltensweisen besitzen, wird bei Verwendung der Ausdrücke „Crz-Neurone“ oder auch „Corazonin-Neurone“ lediglich auf die vier Crz-exprimierenden Neurone des Abdominalganglions Bezug genommen, es sei denn, es wurde explizit darauf hingewiesen, dass dem nicht der Fall ist.

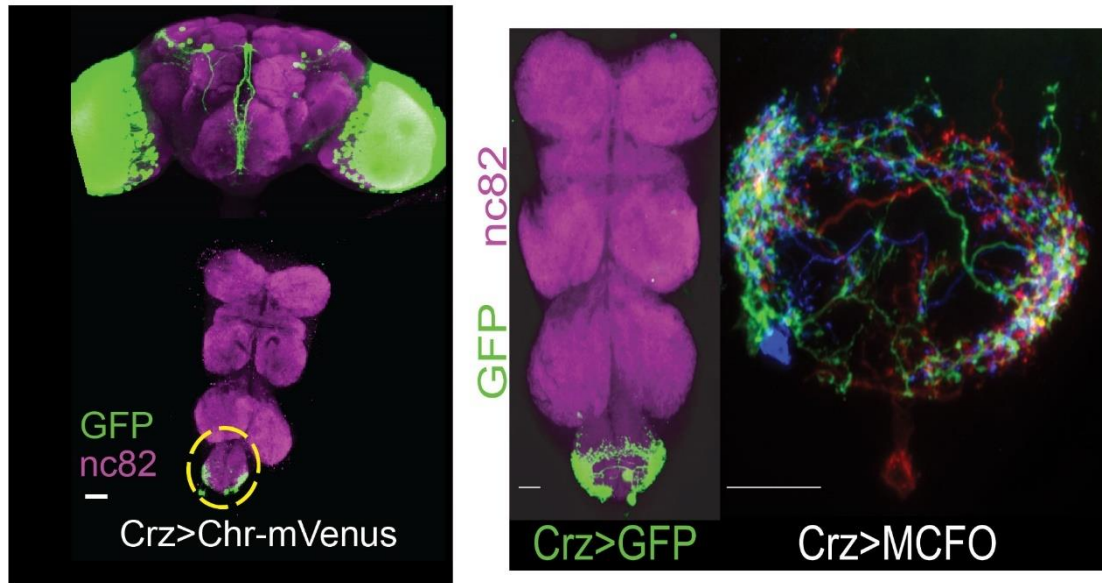


Abbildung 2. Lokalisation Corazonin-exprimierender Neurone im Gehirn sowie im Abdominalganglion von männlichen *Drosophila melanogaster*

Immunfluoreszenz-Färbung der Corazonin-Neurone im ZNS (links oben) und VNS (links unten und rechts).

Übernommen und modifiziert aus (Thornquist et al., 2020)

Im Jahr 2012 wurde durch Tayler et al. eine Corazonin Gal4 Linie erzeugt (Tayler et al., 2012), mittels welcher ein exklusiver neurogenetischer Zugang zu Corazonin exprimierenden Neuronen besteht, da der Transkriptionsfaktor Gal4 (Brand & Perrimon, 1993) nur in solchen Zellen exprimiert wird, welche auch das Neuropeptid Corazonin exprimieren.

Die Präsenz von Gal4 in diesen Zellen ermöglicht die spezifische Expression gewünschter Gene, welche sich unter der Kontrolle einer „Upstream Activating Sequence“, kurz UAS, befinden, was in dieser Arbeit dazu genutzt wurde, die Eigenschaften der Crz-Neurone im Rahmen des Kopulationsverhaltens zu studieren.

Die Crz-Neurone sind für die Steuerung des Paarungsaktes von großer Bedeutung. Wenn die neuronale Aktivität der Crz-Neurone durch die Überexpression des durchlässigen Kalium-Kanals Kir2.1 inhibiert wird, so führt dies nicht nur zu infertilen Kopulationen, sondern auch zu Paarungsakten, welche drastisch auf im Durchschnitt 100 Minuten verlängert sind (Tayler et al., 2012). Sowohl die Infertilität als auch die deutlich verlängerte Kopulationsdauer ist auf die sexuell dimorphen Crz-Neurone des Abdominalganglions zurückzuführen, was unter anderem dadurch gezeigt werden kann, dass die Expression von Kir2.1 mittels einer Crz-Gal4 Linie, welche nur genetischen

Zugriff auf die Neurone des ZNS, nicht jedoch des Abdominalganglions ermöglicht, nicht zum Auftreten dieser Phänotypen führt (Tayler et al., 2012). Weiterhin konnten Thornquist et al. 2020 zeigen, dass die Kopulationsphänotypen auf FruM positive Crz-Neurone zurückzuführen sind, was ebenfalls ausschließlich auf die Neurone des Abdominalganglions zutrifft (Thornquist et al., 2020). Die prominente Rolle des ventralen Nervensystems wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass eine Enthauptung und damit manuelle Entfernung des zentralen Nervensystems der männlichen Fliege während der Kopulation weder die Dauer der Kopulation noch den Zeitpunkt der Ejakulation beeinflusst.

Die Ergebnisse der Inhibition der Crz-Neurone legen also nahe, dass die Crz-Neurone für die Steuerung der Ejakulation notwendig sind, was unter anderem daran zu erkennen ist, dass sich die Füllmenge der Samenrüse bei vorliegender Inhibition durch Kir2.1 trotz vollzogenem Paarungsakt nicht verändert und auch kein fertiler Nachwuchs als Resultat eines Paarungsaktes entstehen kann (Thornquist et al., 2020). Eine Stimulation der Crz-Neurone mittels der Kombination aus einer Überexpression des temperatursensitiven Kationenkanals TrpA1 sowie einer Veränderung der Außentemperatur auf 31°C ist dagegen hinreichend, um eine Ejakulation sowohl im Rahmen einer Kopulation, als auch außerhalb des Paarungskontexts auszulösen (Tayler et al., 2012; Thornquist et al., 2020).

Vermittelt das Corazonin Neuropeptid selbst die Rolle der Crz-Neurone in Bezug auf die Ejakulation? Tayler et al. 2012 gelang es, mittels der Injektion von synthetischem Corazonin-Neuropeptid eine Ejakulation in einer isolierten männlichen Fliege auszulösen. Darüber hinaus wurde durch Tayler et al. 2012 beobachtet, dass die Zugabe von synthetischem Corazonin-Neuropeptid im Rahmen eines Kalzium-Bildgebungsexperimentes an explantierten ventralen Nervensystemen zu einem deutlichen Anstieg intrazellulärer Kalziumkonzentrationen in Corazonin-Rezeptor Gal4 Neuronen (CrzR-Gal4) führte. Für diese CrzR-Gal4 Neurone, deren Dendriten sich in der Nähe der Crz-Neurone befinden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ihnen eine essenzielle Rolle hinsichtlich der Ejakulation zukommt (Tayler et al., 2012). Trotz dieser Hinweise auf eine mögliche Rolle des Corazonin-Neuropeptids ist es jedoch trotz mehrmaliger Versuche bisher nicht gelungen, einen „loss-of-function“ Phänotyp nachzuweisen, da eine Herunterregulierung (Knockdown) der Produktion des Corazonin-Neuropeptids in den Crz-Neuronen zu keinen messbaren Veränderungen der

durch die Crz-Neurone vermittelten Effekte führte, sodass man gegenwärtig davon ausgeht, dass das Corazonin-Neuropeptid zwar hinreichend, jedoch nicht notwendig für die Ejakulation ist (Thornquist et al., 2020). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass, wie für neuropeptiderge Neurone nicht unüblich (Nusbaum et al., 2017), eine Kotransmission mehrerer Neurotransmitter erfolgen könnte. Tatsächlich lassen sich bei der Analyse der kürzlich zum ventralen Nervensystem publizierten Single-Cell RNA-Sequencing Daten (Allen et al., 2020) Hinweise auf eine mögliche Expression anderer Neurotransmitter in den Crz-Neuronen erkennen, da in den Crz-Neuronen eine deutlich erhöhte Anzahl an mRNAs für das Diuretic hormone 44 (DH44) sowie für das Enzym ChAT, welches für die Biosynthese von Acetylcholin verantwortlich ist, detektiert werden konnte.

Für die Präsenz weiterer Neurotransmitter in den Crz-Neuronen spricht weiterhin, dass ein Knockdown des Corazonin-Neuropeptides hinsichtlich der Kopulationsdauer ohne Konsequenz bleibt (Thornquist et al., 2020). Tatsächlich gelang es Thornquist et al. 2020 nicht, in der viel größeren Population der Fruitless Gal4 Neurone, die die Crz-Neurone miteinschließt, die Kopulationsdauer mittels RNAis gegen eine Vielzahl an bekannten Neurotransmittersystemen zu verändern. Dies spricht ebenfalls für eine gewisse Redundanz auf Neurotransmitterebene. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Effektivität der RNAi-vermittelten Neurotransmitter-Herunterregulation variieren kann, sodass es durchaus möglich ist, dass die für einen Effekt notwendige Stärke einer solchen Manipulation nicht erreicht wurde. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass bisher unbekannte Neurotransmitter für die Kopulationsdauer eine wichtige Rolle spielen. Auch hierfür lassen sich durch das Studium des „single cell transcriptomic atlas of the adult *Drosophila* ventral nerve cord“ (Allen et al., 2020) Hinweise finden: die Crz-Neurone könnten den in nur äußerst wenigen Neuronen exprimierten vesikulären Transporter *portabella* herstellen, dessen potenzieller Neurotransmitter unbekannt ist (Brooks et al., 2011). Da alle Knockdown-Experimente in konstitutiv aktiver Form durchgeführt wurden, müssen außerdem entwicklungsbedingte Auswirkungen auf die Neurone berücksichtigt werden.

Ein gängiger Ansatz in der neurowissenschaftlichen Literatur besteht darin, neuronale Populationen auf einem Spektrum zwischen sensorischem Input und motorischem Output einzuordnen und zu klassifizieren. Wo finden sich die Crz-Neurone auf dieser Skala wieder?

Unter Berücksichtigung ihrer Anatomie als Interneurone (Tayler et al., 2012) sowie der Existenz weiterer bekannter neuronaler Populationen, welche den Crz-Neuronen nachgeschaltet sind und welche wiederum selbst keine Motoneurone sind, etwa die zuvor beschriebenen CrzR-Gal4 Neurone, aber auch die kürzlich publizierte DIN Neurone (Crickmore & Vosshall, 2013; Thornquist & Crickmore, 2020), ist wohl am ehesten anzunehmen, dass es sich bei den Crz-Neuronen um ein übergeordnetes Organisationszentrum handelt, welches sich zwischen sensorischen und motorischen neuronalen Schaltkreisen befindet.

Dieser Ansatz, dass es sich bei den Crz-Neuronen um ein höheres Organisationszentrum handeln könnte, zeigt wiederum eine nützliche Perspektive hinsichtlich der zu beobachtenden Effekte der Crz-Neurone in Bezug auf die Kopulationsdauer auf. Verläuft der Paarungsakt von *Drosophila melanogaster* ungestört, so beträgt die durchschnittliche Kopulationsdauer circa 27 Minuten, bei einer Standardabweichung von etwa 4 Minuten (Crickmore & Vosshall, 2013). Werden die Crz-Neurone dagegen während der Paarung z.B. mittels des konstitutiv durchlässigen Kaliumkanals Kir2.1 oder mittels des durch grünes Licht aktivierbaren Chloridkanals GtACR1 (Mohammad et al., 2017) inhibiert, so dauert die Paarung ein Vielfaches dessen (Tayler et al., 2012; Thornquist et al., 2020), die Aktivität der Crz-Neurone ist also notwendig, um die Paarung pünktlich beenden zu können.

Eine artifizielle Stimulation der Crz-Neurone mittels des durch roten Lichts aktivierbaren Kationenkanals CsChrimson (Klapoetke et al., 2014) führt dagegen zu keiner Änderung der Kopulationsdauer (Thornquist et al., 2020). Dieses Ergebnis mag auf den ersten Blick überraschend sein, wird aber in seiner Bedeutung klarer, wenn ein interessantes Verhaltensphänomen der männlichen Fliege während der Kopulation berücksichtigt wird: der „motivationale Schalter“.

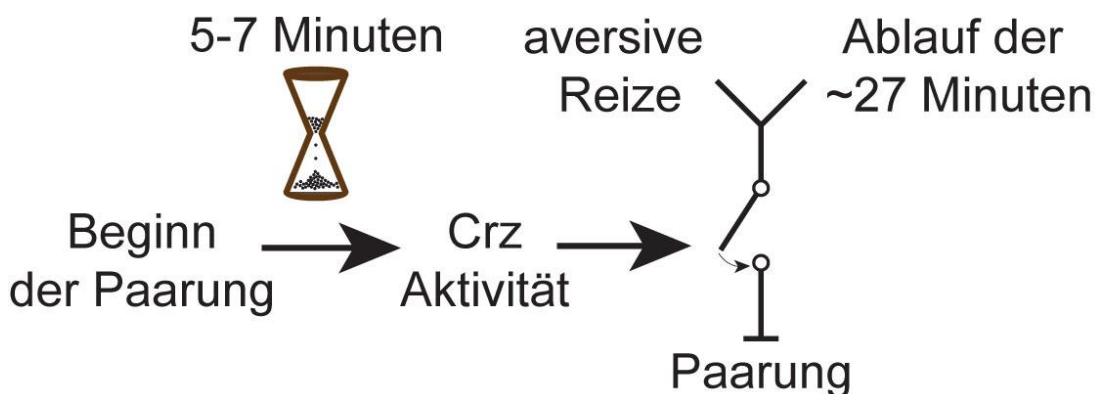


Abbildung 3. Der motivationale Schalter wird durch die Aktivität der Crz-Neurone umgelegt

Modell bezüglich der Funktionsweise der Corazonin-Neurone und des motivationalen Schalters (übernommen und modifiziert nach (Thornquist et al., 2020))

Wie bereits zuvor in der Verhaltenssektion der Einleitung beschrieben, ändert sich die Motivation der männlichen Fliege, den Paarungsakt in Reaktion auf aversive Reize aufzugeben, zwischen Minute 5 und Minute 7 nach Beginn der Paarung, zu einem Zeitpunkt, an dem auch das Signal zur Ejakulation gegeben wird, dramatisch.

Vor der Ejakulation, bevor die Crz-Neurone aktiv werden, wird das Männchen die Kopulation trotz potenziell lebensgefährlicher Bedrohungen, wie etwa einem Anstieg der Temperatur auf 44°C für eine Minute, nicht beenden. Nach der Ejakulation dagegen, also nachdem die Crz-Neurone aktiv waren, wird das Männchen als Reaktion auf derartige Bedrohungen die Kopulation beenden (Thornquist et al., 2020). Ungestörte Kopulationen enden jedoch nicht nach erfolgter Ejakulation, also ~6 Minuten nach Paarungsbeginn, sondern dauern noch weitere ~20 Minuten an. Die evolutionären Gründe, warum die Paarung weitere 20 Minuten andauert, sind unklar. Ein denkbarer Erklärungsansatz könnte sein, dass die Motivation der weiblichen Fliege, sich nach Abschluss der Paarung nochmals zu paaren, mit zunehmender Paarungsdauer abnimmt, was den reproduktiven Erfolg des Männchens erhöhen würde. Von den evolutionären Gründen einmal abgesehen erklärt diese zusätzliche Zeitspanne zwischen der Ejakulation und dem Ende der Kopulation jedoch, warum eine künstliche Stimulation der Crz-Neurone zu keiner Änderung der absoluten Kopulationsdauer führt.

Thornquist et al. 2020 konnten zeigen, dass die Crz-Neurone jenen „motivationalen Schalter“ umlegen, welcher es ermöglicht, dass die Kopulation auf Bedrohungen hin abgebrochen werden kann. Es ist jedoch wichtig festzuhalten, dass ein gewöhnlicher Paarungsakt derlei Bedrohungen nicht ausgesetzt ist, was der Grund ist, warum die prinzipielle Freigabe der Crz-Neurone, die Paarung zu beenden, ohne Konsequenz bleibt und sich die Kopulationsdauer nicht ändert. Wird dagegen ein aversiver Stimulus mit der künstlichen Stimulation der Crz-Neurone kombiniert, so tritt der Effekt dieser Stimulation sehr deutlich zutage. Wie bereits oben erwähnt, werden Männchen die Kopulation trotz aversiver Stimuli nicht vor Minute 5 nach Paarungsbeginn beenden. Werden die Crz-Neurone dagegen z.B. eine Minute nach Beginn der Kopulation, also vor dem eigentlichen Zeitpunkt der Ejakulation, künstlich stimuliert, so wäre zu erwarten, dass unter diesen Voraussetzungen eine Beendigung der Kopulation auf aversive Reize hin möglich ist, was auch tatsächlich so durch Thornquist et al. 2020 beobachtet wurde.

Eine Inhibition der Crz-Neurone dagegen verlängert die sonst ~6 Minuten messende Zeitspanne der hohen Motivation, die Kopulation auch unter aversiven Stimuli weiterzuführen, sodass sich dadurch auch die absolute Kopulationsdauer ausdehnt.

Während der ersten 5 Minuten der Kopulation ist die männliche Fliege also hinsichtlich jeglicher Gefahren der Umwelt indifferent, die männliche Fliege exponiert also sowohl sich als auch seine weibliche Kopulationspartnerin gegenüber Bedrohungen wie möglichen Fressfeinden, da durch die mechanische Verbindung beider Geschlechtsorgane eine Flucht durch Wegfliegen unmöglich ist. Wieso nehmen sich *Drosophila melanogaster* Männchen so viel Zeit bis zur Ejakulation? Andere *Drosophila*-Spezies wie etwa *Drosophila robusta* weisen eine absolute Paarungsdauer von gerade einmal 40 Sekunden auf (Grant, 1983), mechanische Aspekte des Ejakulationsprozesses als mögliche Erklärungsansätze scheiden also aus. Eine vollumfängliche Antwort auf diese Frage nach dem evolutionären Nutzen des ~6 Minuten Ejakulations-Timers wird womöglich nicht einfach zu finden sein, die Robustheit dieses Zeitmessers ermöglicht jedoch die Entschlüsselung einer noch fundamentaleren Frage: Woher wissen die Crz-Neurone, dass 5 bis 7 Minuten vergangen sind? Oder, um die Frage etwas allgemeiner zu formulieren: Wie können Neurone Intervall-Zeitspannen messen, also solche, welche Sekunden und Minuten lang sind?

Auf der Grundlage der Überlegung, dass das neuronale Korrelat dieser Zeitmesser womöglich spezifische Zeitmesser-Proteine sein könnten - Transkriptions- und Translationsprozesse werden in dieser Überlegung als zu langsam, elektrische Aktivität als zu kurzlebig betrachtet - wurde durch Thornquist et al. 2020 ein groß angelegter Knockdown- und Überexpressions-Screen in allen FruM exprimierenden Neuronen durchgeführt, in der Hoffnung, ein eben solches Zeitmesser-Protein zu finden.

Es wurden insgesamt 2673 genetische Manipulationen getestet, wobei 99,1% keinen signifikanten Effekt bezüglich der Kopulationsdauer aufwiesen. Der mit Abstand stärkste Effekt wurde durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) erreicht, was die Paarungsdauer um viele Stunden verlängerte. Im Anschluss gelang es, diesen Effekt auf die CaMKII-Überexpression in den Crz-Neuronen zurückzuführen.

CaMKII ist, evolutionär betrachtet, eine stark konservierte Kinase. Das Enzym spielt eine Rolle in zahlreichen intrazellulären Prozessen wie z.B. der Langzeitpotenzierung

(Lisman et al., 2012) und besitzt eine prominente Eigenschaft, die es zu einem äußerst geeigneten Intervall-Zeitmesser-Protein machen könnte:

Untereinheiten von CaMKII lagern sich zu einem dodekamerischen Holoenzym zusammen, in welchem die einander benachbarten Untereinheiten dazu in der Lage sind, sich gegenseitig an der Aminosäure Threonin an der Stelle T287 zu phosphorylieren. Diese Befähigung zur Autophosphorylierung ermöglicht es CaMKII, auch dann noch aktiv zu sein, wenn das eigentliche Aktivierungssignal von CaMKII, erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen, bereits nicht mehr vorhanden ist. Diese von Kalzium unabhängige, durch die Autophosphorylierung bedingte Aktivität kann dabei mindestens mehrere Minuten betragen (Bading et al., 1993; J. Y. Chang et al., 2017; Michalski, 2013).

CaMKII könnte daher als ein auf beliebige Zeitskalen einstellbares Zeitmesser-Protein dienen, da das intrazelluläre biochemische Milieu von Neuronen mittels Phosphatasen so angepasst werden könnte, dass die Autophosphorylierung von CaMKII für das benötigte Zeitintervall aufrechterhalten wird.

Diese Hypothese wird durch folgenden Befund gestützt: Wird eine konstitutiv aktive Form der CaMKII, bei der Threonin an der Autophosphorylierungsstelle T287 durch Aspartat (D) ersetzt und so ein Zustand kontinuierlicher Autophosphorylierung imitiert wird (Fang et al., 1989), in den Crz-Neuronen überexprimiert, so kommt es zu stundenlangen Kopulationen (Thornquist et al., 2020). Dies könnte hinsichtlich der möglichen Funktion von CaMKII als Zeitmesser-Protein so interpretiert werden, dass das von CaMKII gemessene Zeitintervall nie endet, 6 Minuten also zu einer Ewigkeit werden.

Auf der Grundlage dieser Überlegung, dass der Phosphorylierungsstatus an der T287 Stelle die Dauer des durch die Neurone gemessenen Zeitintervalls bestimmt, überexprimierten Thornquist et al. 2020 in einem nächsten Schritt eine CaMKII T278A Mutante in den Crz-Neuronen, die Aminosäure Threonin wurde hier durch die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin ersetzt, was eine Autophosphorylierung verhindert (Jin et al., 1998). Aufgrund der Zusammenlagerung von mutierten und wildtypischen CaMKII Untereinheiten zu einem dodekamerischen Holoenzym limitiert dies die Aktivitätsspanne von CaMKII auf etwa die Zeitspanne, während der das ursprüngliche Aktivierungssignal, also an Kalzium gebundenes, aktiviertes Calmodulin, noch präsent ist. Es bleibt also allein die Kalzium-abhängige CaMKII-Aktivität, welche deutlich kürzer ist. Tatsächlich besaßen solche Männchen, deren Crz-Neurone CaMKIIT287A exprimierten, einen stark verkürzten Corazonin-Zeitmesser, was sich

unter anderem daran zeigte, dass der motivationale Schalter zu einem früheren Zeitpunkt umgelegt wurde.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse von Thornquist et al. 2020 also nahe, dass die in den Crz-Neuronen lokalisierte Überexpression von CaMKII-T287D-Proteinen, die möglicherweise nie ablaufende Zeitmesser darstellen, deshalb zu langen Kopulationsdauern führt, weil die Crz-Neurone nie das Signal erhalten, dass die ~6 Minuten zur Ejakulation verstrichen sind.

Dem gegenüber steht die Überexpression von CaMKII T287A Proteinen, welche ihre intrinsische Zeitmessfunktion verloren haben, was zu verfrühten Ejakulationen und einem vorzeitigem Umlegen des „motivationalen Schalters“ führt - die Crz-Neurone nehmen fälschlicherweise zu früh an, dass die ~6 Minuten vergangen sind.

Doch wie teilt die CaMKII den Crz-Neuronen ihre Einschätzung über die abgelaufene Zeit mit? Und wie kann es sein, dass eine einfache Überexpression von mutierten CaMKII-Proteinen so effektiv darin ist, die Zeitmessung in den Crz-Neuronen zu beeinflussen, wenn die endogen in den Crz-Neuronen exprimierten CaMKII-Proteine ebenfalls vorhanden sind?

Zwar konnten Thornquist et al. 2020 keinen Mechanismus aufdecken, mittels dessen CaMKII die Aktivität der Crz-Neurone beeinflussen könnte, jedoch führte die optogenetische Stimulation der Crz-Neurone mittels CsChrimson zu einer Überwindung des kopulationsverlängernden Effekts der CaMKII T287D Überexpression. Dies könnte also darauf hindeuten, dass die aktive CaMKII die Crz-Neurone daran hindert, aktiv zu werden.

Eine mögliche Erklärung dafür, warum die CaMKII-T287D-Überexpression die endogene CaMKII Aktivität überstimulieren könnte, könnte Folgende sein: auch wenn die endogene CaMKII Aktivität nach ~6 Minuten abgenommen hat, bleiben die CaMKII-T287D-Proteine aktiv und blockieren weiterhin jegliche Aktivität der Crz-Neurone.

Es ist jedoch wichtig, zu bedenken, dass sich meist 12 CaMKII-Untereinheiten zu einem CaMKII-Holoenzym zusammenschließen (Kolodziej et al., 2000), was wiederum die Grundlage für die Autophosphorylierung darstellt, da CaMKII von benachbarten Untereinheiten autophosphoryliert wird (Hanson et al., 1994). Da sich sowohl endogen exprimierte CaMKII-Untereinheiten als auch künstlich überexprimierte mutierte CaMKII-Untereinheiten zu einem Holoenzym zusammenlagern, passt sich die Aktivität der endogenen CaMKII-Untereinheiten zu einem gewissen Grad an die der überexprimierten CaMKII-Mutanten an (Fang et al., 1989; Waldmann et al., 1990; Z. Wang et al., 1998),

was auch durch Thornquist et al. 2020 unter Verwendung eines Phospho-T287 Antikörpers gezeigt werden konnte (Thornquist et al., 2020). Dies kann auch erklären, warum die Überexpression der nicht autophosphorylierbaren CaMKII-T287A-Mutante zu einer Verkürzung des 6 Minuten Zeitintervalls in den Crz-Neuronen führt: da die CaMKII-T287A-Untereinheiten ihre Aktivität nach dem Abfall des Kalzium/Calmodulin-Signals nicht aufrechterhalten können, wird die Autophosphorylierung innerhalb des CaMKII-Holoenzym geschwächt, sodass auch in absoluten Maßstäben die Anzahl der zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt noch aktiven CaMKII-Untereinheiten abnimmt. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung führt auch eine Herunterregulation endogener CaMKII-Untereinheiten mittels RNAi zu einer Verkürzung des 6 Minuten Zeitintervalls (Thornquist et al., 2020), was zusätzlich die Bedeutung endogener CaMKII-Proteine hinsichtlich der Aktivität der Crz-Neurone unterstreicht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Überexpression von mutierten CaMKII-Untereinheiten in einer konstitutiven Weise geschieht - die UAS-Transgene werden exprimiert, sobald Gal4 unter der Kontrolle des Crz-Promotors exprimiert wird - besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass CaMKII-Manipulationen über eine Beeinflussung der Entwicklung der Crz-Neurone zu den beobachteten Phänotypen führen könnte.

Um diese Eventualität auszuschließen, wurde in den Crz-Neuronen das Transgen paAIP2 (Murakoshi et al., 2017) exprimiert, welches ein Peptid enkodiert, das auf eine Exposition mit blauem Licht hin die Aktivität der katalytischen Domäne von CaMKII inhibiert. Dies ermöglicht eine Kontrolle der CaMKII-Aktivität in Echtzeit. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der konstitutiven CaMKII-Aktivitätsmodifikationen verkürzte eine akute Hemmung der CaMKII-Aktivität mittels Applikation von blauem Licht, z. B. zu Beginn der Paarung, das 6-Minuten-Zeitintervall dramatisch, was sich durch ein verfrühtes Umlegen des „motivationalen Schalters“ als auch durch eine verfrühte Ejakulation äußerte. Dies legt nahe, dass die akute CaMKII-Aktivität für das 6-Minuten-Zeitintervall von Bedeutung ist.

Um die CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen zu verschiedenen, festgelegten Zeitpunkten während der Paarung messen zu können, nutzten Thornquist et al. 2020 einen 2-Photonen Förster-Resonanzenergietransfer-Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FRET-FLIM) Reporter, Green-Camu α (S.-J. R. Lee et al., 2009), welcher eine Bestimmung absoluter CaMKII-Aktivität erlaubt. Zwar gelang es Thornquist et al. 2020 nicht, die CaMKII-Aktivität während des Paarungsaktes zu messen (die in vivo Präparation eines Abdominalganglions innerhalb weniger Minuten nach Beginn der

Paarung und die anschließende Mikroskopie, ohne das Paarungsverhalten durch den Eingriff zu terminieren, stellte sich als technisch zu schwierig dar), jedoch war es möglich, im Rahmen einer *ex vivo* Präparation aufschlussreiche Beobachtungen zu machen. Für diese Untersuchungen verwendeten Thornquist et al. 2020 die in Würzburg entwickelte, stark Kalzium-durchlässige Channelrhodopsin-Variante X XM (Scholz et al., 2017). Nach Überexpression dieses Channelrhodopsins in den Crz-Neuronen führte die Anwendung von blauem Licht für mindestens 5 Sekunden zu einem Anstieg der CaMKII-Aktivität, gemessen durch die Zunahme der Fluoreszenz-Lebensdauer (Fluorescent Lifetime) des ebenfalls in den Neuronen exprimierten Reporters Green-Camuid. Die Aktivität erreichte nach circa 5 Minuten wieder das Grundniveau. Dies entspricht in etwa dem 5-7 Minuten Zeitintervall zu Beginn der Paarung, an dessen Ende die Crz-Neurone den motivationalen Schalter umlegen und die Ejakulation induzieren.

Zusammen mit der Beobachtung, dass das Kalzium-Signal, das durch die X XM-Stimulation hervorgerufen wurde, im Vergleich deutlich schneller abfällt, unterstützt dieser Befund die Hypothese, dass Kalzium die CaMKII-Aktivität zwar initiiert, die Kalzium-unabhängige CaMKII-Aktivität aber die Intervall-Zeitmessfunktion in den Crz-Neuronen wesentlich bestimmt.

Dabei ist es wichtig, anzumerken, dass ein identischer Channelrhodopsin X XM-Stimulus in anderen Neuronen zu deutlich kürzeren CaMKII-Aktivitätsspannen führt (Thornquist et al., 2020). Dies deutet auf ein spezifisch angepasstes intrazelluläres Milieu in den Crz-Neuronen hin, das darauf abgestimmt ist, die Kalzium-unabhängige CaMKII-Aktivität für eben jenen Zeitraum aufrechtzuerhalten, welcher für die Einrichtung des zu messenden Zeitraums erforderlich ist, im Fall der Crz-Neurone etwa 5 - 7 Minuten.

1.3. Das Corazonin-„Fenster“

Wie bereits oben erwähnt, hebt die optogenetische Aktivierung der Crz-Neurone den Effekt der CaMKII-T287D-Überexpression auf, was zu einer rechtzeitigen Beendigung von Kopulationen führt, welche sonst noch stundenlang andauern würden. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss der elektrischen Aktivität auf den Output der Crz-Neurone dem Einfluss von CaMKII übergeordnet ist.

Doch welche Rolle kommt der elektrischen Aktivität hinsichtlich des Zeitmessvorgangs in den Crz-Neuronen zu? Zur Klärung dieser Frage generierten Thornquist et al. 2020 Fliegen, in deren Crz-Neuronen der durch grünes Licht aktivierbare Chloridkanal GtACR1 (Mohammad et al., 2017) exprimiert wurde. Werden bei diesen Fliegen nun die

Crz-Neurone während der gesamten Dauer der Paarung optogenetisch hyperpolarisiert und damit inhibiert, so führt dies, ähnlich wie bei einer Inhibition durch Kir2.1 (siehe oben), zu einer deutlich verlängerten Kopulation von mindestens 50 Minuten Länge. Wird grünes Licht genau 5 Minuten nach dem Beginn der Paarung appliziert, kommt es ebenfalls zu lang andauernden Kopulationen. Dies bestätigt, dass die Crz-Neurone nach dem Abfall der CaMKII-Aktivität elektrisch aktiv werden müssen, um den motivationalen Schalter umlegen sowie die Ejakulation einleiten zu können. Wird das grüne Licht dagegen 10 Minuten nach dem Beginn der Paarung appliziert, so zeigt sich ein vollkommen gegenteiliges Bild, da nun fast alle Paarungsakte normale, ~27 Minuten umfassende, Kopulationsdauern aufwiesen.

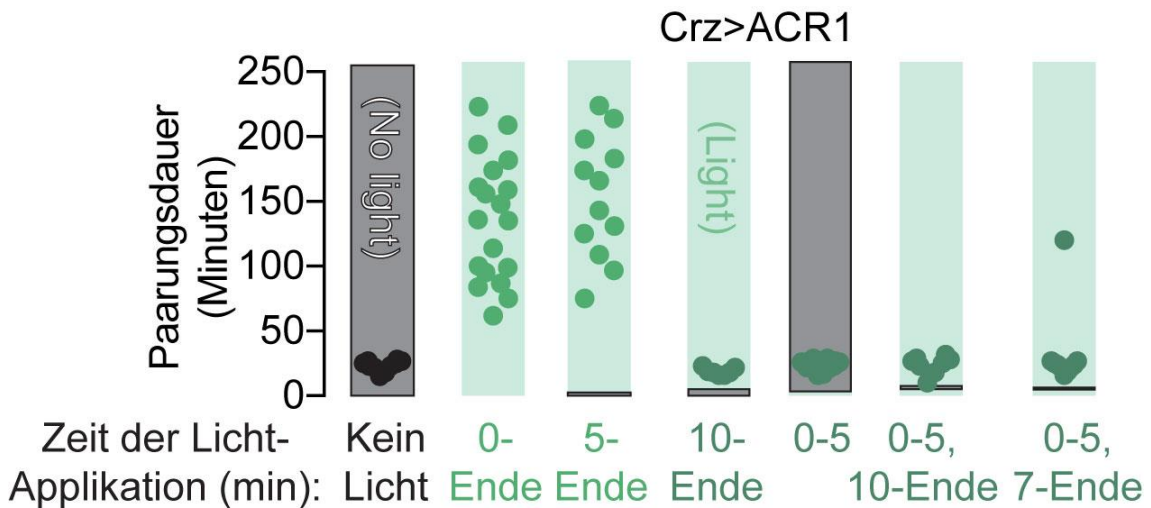


Abbildung 4. Die Corazonin-Neurone legen den motivationalen Schalter circa zwischen Minute 5 und Minute 7 der Paarung um

Inhibition der Corazonin-Neurone während unterschiedlicher Zeitpunkte innerhalb der Paarung mittels GtACR1 (Abbildung in modifizierter Form übernommen aus (Thornquist et al., 2020))

Darüber hinaus führte interessanterweise eine Grünlicht-vermittelte Inhibition der Crz-Neurone während der gesamten Dauer der Paarung mit Ausnahme der zwei Minuten zwischen Minute 5 und Minute 7 der Paarung, dem Zeitraum, in dem normalerweise der „motivationale Schalter“ umgelegt und die Ejakulation induziert wird, ebenfalls zu normal langen Paarungen.

Diese Reihe von Experimenten verdeutlicht zwei Punkte:

Erstens scheinen die Crz-Neurone dazu in der Lage zu sein, das Zeitintervall von 5-7 Minuten auch dann zu messen, wenn sie während dieses Zeitraums hyperpolarisiert sind, die Zeitmessung selbst erfolgt also auf eine von elektrischer Aktivität unabhängige Art und Weise.

Zweitens müssen die Crz-Neurone nach dem Abklingen der CaMKII-Aktivität nur für eine limitierte Zeitspanne aktiv sein, um das Ergebnis ihrer Zeitmessung übermitteln zu können, da ihre Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der Kopulation nicht mehr vonnöten zu sein scheint.

Was jedoch geschieht, wenn die Crz-Neurone den Zeitpunkt ihrer Aktivität zwischen 5 und 7 Minuten nach Paarungsbeginn verpassen, weil sie während dieses Zeitraums durch eine optogenetische Manipulation inhibiert wurden?

Mehrere Szenarien wären denkbar, zum Beispiel könnten die Crz-Neurone sofort aktiv werden, sobald die artifizielle Hyperpolarisation dies erlaubt. Es wäre jedoch ebenfalls denkbar, dass die Crz-Neurone, nachdem sie ihr Zeitfenster verpasst haben, gar nicht mehr aktiv werden, was zu langen Kopulationsdauern führen würde.

Um dies zu untersuchen, inhibierten Thornquist et al. 2020 die Crz-Neurone für 10 Minuten nach Beginn des Paarungsaktes, also einige Minuten länger, als das Zeitintervall, welches durch CaMKII gemessen wird. Dies verhindert, dass die Crz-Neurone während ihres üblichen Aktivitätszeitraumes zwischen Minute 5 und Minute 7 aktiv werden können. Interessanterweise endeten die Paarungen trotz dieses Inhibitionsexperiments jedoch zum in etwa gleichen Zeitpunkt wie jene, welche gar keine Inhibition erfahren hatten, was darauf hinweist, dass die Crz-Neurone, nachdem ihr intrinsisches Zeitintervall einmal abgelaufen ist, aktiv werden, sobald es ein Ende der GtACR1 vermittelten Hyperpolarisation erlaubt.

Im Rahmen weiterer Variationen dieser Inhibitionsexperimente machten Thornquist et al. 2020 anschließend eine weitere, überraschende Beobachtung, welche die Grundlage für diese Doktorarbeit darstellt:

Werden die Crz-Neurone mittels GtACR1 für eine Zeitspanne, welche länger als 7 Minuten beträgt, inhibiert, dann aber die Inhibition für eine Minute aufgehoben, nur um nach Ablauf dieser einen Minute die Inhibition erneut durchzuführen, so wird man feststellen, dass diese Minute den Crz-Neuronen nicht ausreicht, um nachgeschalteten Neuronen das Ende des von ihnen gemessenen Zeitintervalls zu vermitteln. Kopulationen, welche diesem Paradigma unterworfen sind, werden also lange andauern, so, als ob die Inhibition für die gesamte Dauer der Paarung stattgefunden hätte. Wird

dagegen eben jene Inhibitionspause auf 90 Sekunden ausgedehnt, so wird dies den Crz-Neuronen nahezu immer ausreichen, ihr Signal zu geben.

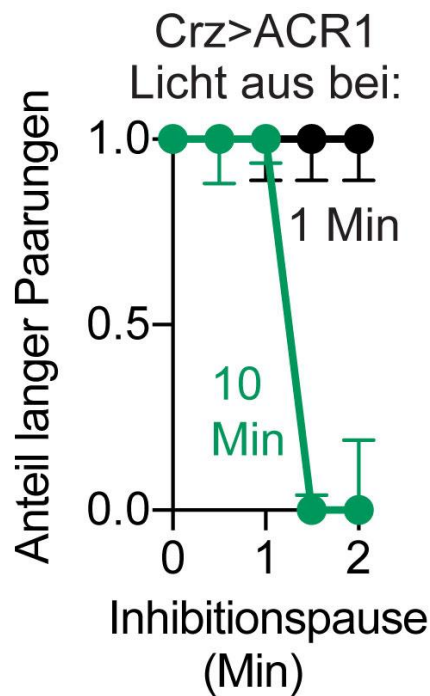


Abbildung 5. Das Corazonin-„Fenster“

Inhibitionspause der Corazonin-Neurone vor (schwarz) und nach Ablauf des CaMKII-Zeitmessers (grün). Nach Ablauf der CaMKII-Aktivität benötigen die Corazonin-Neurone mehr als 1 Minute an erlaubter elektrischer Aktivität, um den motivationalen Schalter umzulegen (Thornquist et al., 2020)

Da die Öffnungs- sowie Verschlusskinetiken des Kanals GtACR1 äußerst schnell sind - die Öffnung ereignet sich innerhalb eines Bruchteils einer Sekunde, der Schluss benötigt ebenfalls weniger als eine Sekunde (Govorunova et al., 2015) - kann dieses für Neurone immens lange Intervall zwischen dem Beginn der elektrischen Aktivität und der Generierung eines Ausgangs-Signals, welches im Weiteren auch als Crz-Fenster bezeichnet wird, nicht durch die verwendeten optogenetischen Werkzeuge erklärt werden.

Nach der Interpretation von Thornquist et al. 2020 liefert die beobachtete Notwendigkeit eines so langen Aktivitätsintervalls eine mögliche Erklärung dafür, dass ein Anstieg von intrazellulärem Kalzium, welcher für die Aktivierung von CaMKII und damit für die Errichtung des 6 Minuten Zeitintervalls ab Beginn der Paarung benötigt wird, nicht bereits selbst zu einem Output der Crz-Neurone führt, obwohl intrazelluläre Kalziumerhöhungen selbst ein zentrales Signal für die Abgabe von Neurotransmittern darstellen. Ein

Zeitfenster von mehr als 60 Sekunden zwischen dem Auftreten elektrischer Aktivität in den Crz-Neuronen (mutmaßlich verbunden mit dem Einstrom von Kalzium) und der Weitergabe eines Signals aus dem Crz-Netzwerk zu Beginn der Paarung könnte jene Zeit überbrücken, welche CaMKII nach dem Kalzium-Einstrom benötigt, bis diese ein ausreichendes Ausmaß an Aktivität erreicht hat, das erlaubt, den Output der Crz-Neurone für das definierte Zeitintervall von etwa 6 Minuten zu unterdrücken.

Sobald die inhibierende Wirkung der CaMKII durch deren Aktivitätsabfall abgeklungen ist, werden die Crz-Neurone elektrisch aktiv, benötigen aber wiederum mehr als 60 Sekunden, um aus der elektrischen Aktivität ein Ausgangssignal zu generieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer möglicher Zweck dieses 60 bis 90 Sekunden umfassenden Aktivierungsfensters identifiziert, welcher, zusammen mit dessen Implikationen, im Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellt werden soll. Dafür spielt insbesondere ein Signalweg eine Rolle, dessen zentrales Molekül der „second messenger“ cykliches Adenosin-Monophosphat (cAMP) ist.

1.4. Der kanonische cAMP-Signalweg

“It has been shown that the response to the hormones occurs in two stages, each of which may be eventually broken down into several steps. In the first stage, some portion of the particulate fraction of liver homogenates produces a heat-stable, dialyzable factor in the presence of the hormones. [...]. In the second stage, this factor somehow influences the reactivation or inactivation reactions occurring [...]” (BERTHET et al., 1957)

Mit der Identifizierung eines “Faktors“, welcher den Effekt extrazellulärer Hormone auf intrazelluläre Enzyme vermittelte, brachten Jacques Berthet, Theodore W. Rall und Earl W. Sutherland im Jahr 1957 das Konzept der “second messenger“ auf den Weg (Rall, 1975), kleine Moleküle oder Ionen, welche jene Signale, die u.a. durch membrangebundene Rezeptoren empfangen werden, amplifizieren, verarbeiten, und an intrazelluläre Effektoren weiterleiten. Nur wenige Zeit später konnte die Identität dieses Faktors benannt werden: Es handelte sich um Cyclisches Adenosinmonophosphat, kurz cAMP (Lipkin et al. 1959).

Seitdem gelang es, viele weitere “second messenger“ wie etwa cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) oder Diacylglycerin (DAG) zu identifizieren (Newton et

al., 2016), und auch das Verständnis der Wirkweise und der Implikationen dieser Substanzen nimmt stetig zu. Dies trifft in besonderem Maße auf den in dieser Arbeit zentralen second messenger cAMP zu, dessen Rolle initial in der Regulation des Metabolismus von Sutherland und Kollegen entdeckt wurde (BERTHET et al., 1957). Darüber hinaus kommen cAMP zahlreiche weitere wichtige Funktionen in der Regulation mannigfaltiger biologischer Prozesse, von der Steuerung der Herzkontraktilität (Zaccolo, 2009) bis hin zur Vermittlung synaptischer Plastizität (Zars et al., 2000) zu.

Aufgrund der zentralen Bedeutung des second messengers cAMP für diese Arbeit, soll daher im Folgenden der klassische cAMP-Signalweg näher beleuchtet werden:

Binden "first messenger" wie Hormone oder Neurotransmitter an die jeweiligen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), so führt dies zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, wodurch heterotrimere GTP-bindende Proteine, kurz G-Proteine, aktiviert werden (Alberts et al., 2014).

Dabei muss zwischen mehreren unterschiedlichen G-Protein-Formen unterschieden werden, welche jeweils aus drei Proteinuntereinheiten aufgebaut sind, einer α -Untereinheit sowie einer β und γ -Untereinheit.

Als Folge der Konformationsänderung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors tauscht die α -Untereinheit des G-Proteins das von ihr gebundene GDP durch GTP aus, was zu einer Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit von der kombinierten $G\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch die kombinierte $G\beta\gamma$ -Untereinheit interagieren daraufhin mit zahlreichen intrazellulären Partnerproteinen (Alberts et al., 2014).

Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt dabei eine GTPase-Aktivität, die nach einer definierten Zeit das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert. Dies führt zur Selbst-Inaktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit (Alberts et al., 2014).

Eine große Gruppe an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert bei Ligandenbindung die $G\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins, $G_{\alpha s}$, welche an unterschiedliche Adenylatcyclasen bindet und diese dadurch aktiviert. Dies hat einen deutlichen Anstieg der Produktion des second messengers cAMP aus ATP zur Folge (Levitcki, 1988).

Eine weitere, ebenfalls große Gruppe von GPCRs aktiviert inhibitorische G-Proteine, kurz $G_{\alpha i}$, welche ebenfalls Adenylatcyclasen binden, jedoch deren katalytische Aktivität vermindern, was zu einer Abnahme der cAMP Produktion führt (Dessauer et al., 2002). Andere biochemische Signalmoleküle wie Kalzium können die Aktivität von Adenylatzyklen je nach Isoform sowohl steigern als auch vermindern (Brostrom et al.,

1975; Levin et al., 1992). 3',5'-Cyclonukleotid-Phosphodiesterasen, kurz PDEs, bauen cAMP zu AMP ab (Beavo, 1995; BUTCHER & SUTHERLAND, 1962) und reduzieren somit die Menge an intrazellulärem cAMP.

Wird durch eine starke Gas Stimulation mehr cAMP gebildet als durch PDEs hydrolysiert werden kann, steigen die cAMP-Spiegel im Zytosol an, was zu einer freien Diffusion durch das Zytoplasma führt, wobei neueste Erkenntnisse nahelegen, dass die Ausbreitung von cAMP komplexen Regeln folgen könnte, welche noch besser verstanden werden müssen (Anton et al., 2022; Bock et al., 2020; J. Z. Zhang et al., 2020).

Klassischerweise können diese neu gebildeten cAMP Moleküle anschließend die cyclic-AMP-dependent protein kinase (Walsh et al., 1968), besser bekannt unter dem Namen Proteinkinase A, stimulieren, welche wiederum definierte Serin oder Threonin-Reste bestimmter Zielproteine phosphoryliert (Alberts et al., 2014).

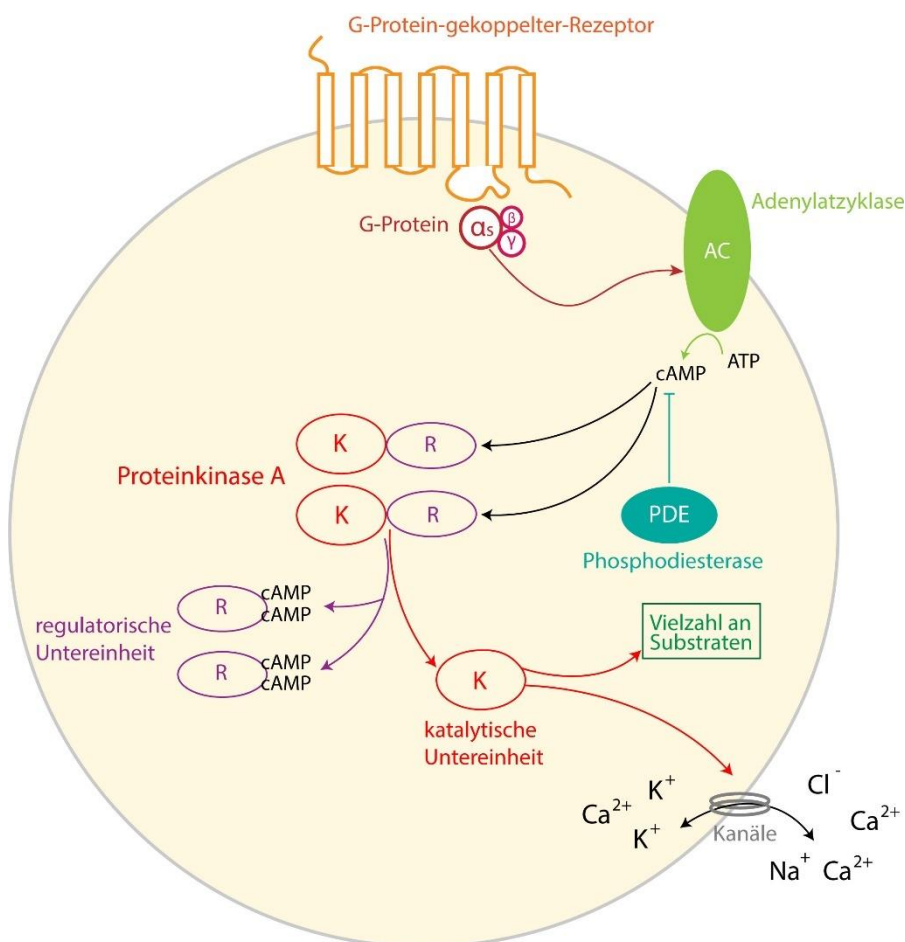


Abbildung 6. Der cAMP-Signalweg

Illustration des Gas-cAMP-PKA Signalwegs (modifiziert nach (Sassone-Corsi, 2012))

Die Proteinkinase A, kurz PKA, ist ein Tetramer aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Ist die zytosolische cAMP-Konzentration niedrig, so sind die katalytischen Untereinheiten von PKA an die regulatorischen Untereinheiten gebunden. Die vier Untereinheiten bilden so einen inhibitorischen Holoenzym-Komplex, der die katalytischen Untereinheiten in einem inaktivierten Zustand hält. Steigen dagegen die zytosolischen cAMP-Spiegel an, so kann cAMP an die regulatorischen Untereinheiten von PKA binden und eine Konformationsänderung induzieren. Die regulatorischen Untereinheiten lösen sich aus dem Holoenzym-Komplex, die katalytischen Untereinheiten werden aktiv und phosphorylieren ihre Substrate (Kim et al., 2007).

Im Laufe der Jahre konnten zahlreiche Substrate der Proteinkinase A nachgewiesen werden (Shabb, 2001), unter anderem Transkriptionsfaktoren wie das cAMP response element-binding protein, kurz CREB, oder Ionenkanäle wie z.B. spannungsabhängige Kalziumkanäle vom Typ L. Über letztere können dabei eine enorme Anzahl physiologischer Prozesse reguliert werden, von der Skelettmuskelkontraktion (C. F. Chang et al., 1991) bis zur Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses (Dash et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit spielt der Gas-cAMP-PKA Signalweg eine wichtige Rolle und wird dabei in einen neuen Kontext gerückt.

1.5. Wissenschaftlicher Hintergrund

1.5.1. Intervall-Zeit-Messung

„Es gibt ein großes und doch ganz alltägliches Geheimnis. Alle Menschen haben daran teil, jeder kennt es, aber die wenigsten denken je darüber nach. Die meisten Leute nehmen es einfach so hin und wundern sich kein bisschen darüber. Dieses Geheimnis ist die Zeit. Es gibt Kalender und Uhren, um sie zu messen, aber das will wenig besagen, denn jeder weiß, dass einem eine einzige Stunde wie eine Ewigkeit vorkommen kann, mitunter kann sie aber auch wie ein Augenblick vergehen – je nachdem, was man in dieser Stunde erlebt. Denn Zeit ist Leben. Und das Leben wohnt im Herzen.“

Michael Ende, Momo

Das Konzept der Zeit tangiert alle Aspekte des Lebens.

Als Albert Einstein im Wunderjahr 1905 seine spezielle Relativitätstheorie publizierte, führte dies zu einer dramatischen Änderung der physikalischen Perspektive auf das Wesen der Zeit, welche in folgendem Zitat ihren Ausdruck findet:

„Zeit ist das, was man an der Uhr abliest.“

Albert Einstein

Das Zitat zu Beginn dieses Kapitels aus dem Kinderbuch „Momo“, verfasst von dem bekannten Kinderbuchautor Michael Ende, kontrastiert das Verständnis der Zeit als etwas, das man an der Uhr abliest, durch die allgemein geteilte Erfahrung, dass sich die individuelle Wahrnehmung der Zeit deutlich von jener objektiven Zeit unterscheiden kann, welche durch eine Uhr gemessen wird. Dies mündet in der poetischen Schlussfolgerung, dass Uhren für das subjektive Zeitempfinden wenig Aussagekraft besitzen.

Doch was formt die individuelle, subjektive Wahrnehmung der Zeit?

Zwar stellt die Zeit als solche eine inhärente Eigenschaft biologischer Systeme dar, jedoch hat die Arbeit an zirkadianen Systemen gezeigt, dass Uhren biochemischen Ursprungs auch eine aktive, zellintrinsische Vermessung und Repräsentation der Zeit ermöglichen (Kondo et al., 1994; Peschel & Helfrich-Förster, 2011; Takahashi, 2017).

Die moderne Zivilisation hat Atomuhren hervorgebracht, die Zeitspannen sowohl im Bereich von Nanosekunden als auch über die Jahrtausende hinweg mit einer beeindruckenden Genauigkeit vermessen können.

Auch Lebewesen messen und organisieren Zeit über viele Zeitskalen hinweg - von Mikrosekunden bis hin zu Jahren.

Die bislang identifizierten biologischen Zeitmesser unterscheiden sich jedoch nicht nur in erheblichem Maße von Atomuhren, sondern auch voneinander, da die Evolution für die Vermessung der unterschiedlichen Zeitskalen unterschiedliche Lösungen hervorgebracht hat.

Dies hat mehrere Gründe, von denen der Offensichtlichste darin besteht, dass die biologische Zeitmessung durch die Zeitkonstanten der biochemischen Reaktionen, auf deren Grundlage die biologischen Uhren agieren, begrenzt ist. Beispielsweise sind der akkuraten Vermessung und Repräsentation von Mikrosekunden mittels transkriptions- und translations- basierter Prozesse aufgrund von deren Trägheit Grenzen gesetzt.

Es ist jedoch durchaus möglich, Zeitunterschiede von nur wenigen Mikrosekunden durch Aktionspotenziale zu kodieren, wenn diese sich entlang eines langen Axons bewegen, einer physikalischen Verzögerungsstrecke.

Dieser Code kann von Neuronen ausgelesen werden, die als Koinzidenzdetektoren fungieren (Buonomano, 2007; Carr, 2003). Eine solche Strategie wird beispielsweise von Neuronen der auditorischen Hirnstammkerne angewandt, um geringe Zeitunterschiede zwischen dem Auftreffen eines Tones auf das rechte und das linke Ohr zu detektieren. Dadurch kann das Gehirn die Lokalisation einer Geräuschquelle ausmachen (Carr, 2003), eine Fähigkeit, die über Leben und Tod entscheiden kann.

Aufgrund der limitierten Länge von Axonen ist diese Art der Zeitmessung jedoch zugleich ungeeignet, um Zeiträume von Monaten oder gar Jahren zu erfassen, wie sie der Anpassung an die Jahreszeiten oder dem Beginn der Pubertät zugrunde liegen.

Ein weiterer Grund, warum biologische Uhren divers sind, und sich zugleich von menschengemachten Atomuhren unterscheiden, liegt in der Notwendigkeit begründet, dass biologische Uhren über ein hohes Maß an Flexibilität verfügen müssen.

Beispielsweise ermöglicht die zirkadiane Uhr, deren Kernstück eine ineinandergreifende transkriptionelle sowie translatorische Rückkopplungsschleife ist (Partch et al., 2014), zwar selbsterhaltende, regelmäßige ~24-Stunden-Rhythmen in konstanter Dunkelheit, jedoch weist sie zugleich eine außerordentliche Flexibilität auf, da sie durch eine Vielzahl anderer Faktoren der inneren oder äußeren Umwelt beeinflusst werden kann - zum Beispiel durch unterschiedliche metabolische Zustände des Organismus (Mendoza,

2007; Zhang et al., 2009.), oder durch sich verändernde Lichtzyklen (Takahashi & Zatz, 1982). Diese Flexibilität ermöglicht es z.B. Tieren, sich an unterschiedliche Jahreszeiten anzupassen.

Zirkadiane Rhythmen sowie die Befähigung zur Zeitmessung sind jedoch keine exklusive Eigenschaft von multizellulären Organismen. Auch einzellige Lebewesen, z.B. Cyanobakterien, sind auf reliable Zeitmesser angewiesen, um so zuverlässige Vorhersagen bezüglich der Zukunft treffen zu können (Kondo et al., 1994). Da alle multizellulären Organismen von einzelligen Organismen abstammen, könnte argumentiert werden, dass komplexe Lebewesen einen Großteil des immensen Repertoires an biochemischen Signalwegen geerbt haben könnten, mittels dessen Einzeller bzw. phylogenetisch ältere, einfache Organismen die Herausforderungen der Zeitmessung gemeistert haben.

Dies könnte dabei helfen, die weißen Flecken auf der Landkarte der biologischen Zeitmessung zu füllen.

Sowohl die biologischen Grundlagen zirkadianer Rhythmen als auch die Zeitmessung auf der Ebene von Mikrosekunden, sowie zu einem gewissen Teil auf der Ebene von Millisekunden - der natürlichen Zeitskala elektrischer neuronaler Aktivität - sind relativ gut verstanden. Die biochemische Repräsentation sowie Organisation von Zeit auf Intervallzeitskalen, also auf Sekunden und Minutenebene, ist dagegen ungeklärt (Agostino et al., 2011; Paton & Buonomano, 2018). Sekunden- und Minutenzeiträume sind jedoch von essenziell wichtiger Bedeutung für unser subjektives Erleben von Zeit. Daher wäre das Wissen darum, wie Zeit auf diesen Zeitskalen repräsentiert und mit anderen kognitiven Prozessen verwoben wird, von großem Interesse, und könnte außerdem neue Perspektiven auf interessante Fragen ergeben, beispielsweise nach dem Mechanismus neuronaler Entscheidungsfindung oder der Entstehung des Kurzzeitgedächtnisses.

Eine der ersten Theorien darüber, wie die Intervallzeitmessung vom Gehirn umgesetzt werden könnte, wurde in den 1960er und 1970er Jahren vorgeschlagen, als Schrittmacher-Akkumulator-Modelle postulierten, dass neuronale Oszillatoren in Kombination mit nachgeschalteten neuronalen Akkumulatoren eine lineare Bestimmung der verstrichenen Zeit ermöglichen könnten (Gibbon, 1977; Paton & Buonomano, 2018; Treisman, 1963).

Dieser Erklärungsansatz wurde seitdem um verschiedene „neuronal ramping models“ erweitert, welche vorschlagen, dass die lineare Repräsentation von Zeit stattdessen durch langsam ansteigende neuronale Aktivität kodiert werden könnte. Das Ende einer definierten Zeitspanne würde dann vermeldet, wenn die Feuerrate der Neurone einen definierten Schwellenwert erreicht (Durstewitz, 2003; Simen et al., 2011). Ein weiterer verbreiteter Ansatz basiert auf sogenannten „population clocks“. Dabei wird angenommen, dass Neuronengruppen, die ihre Zusammensetzung dynamisch ändern können, durch ihre Interaktion zeitinstruktive Aktivitätsmuster ausbilden könnten (Buonomano & Mauk, 1994).

Der erste experimentell nachgewiesene Intervallzeitmesser wurde schließlich bei *Drosophila melanogaster* durch Thornquist und Kollegen im Jahr 2020 publiziert (Thornquist et al., 2020). In starkem Kontrast zu den bisher vorgeschlagenen Intervallzeitmessungskonzepten, welche vor allem auf der Konnektivität zwischen Neuronengruppen beruhen, stellte sich der in dieser Arbeit identifizierte Intervallzeitmessungsmechanismus als innerhalb von Neuronen residierender, biochemischer Vorgang heraus.

Es konnte gezeigt werden, dass das Abfallen der Aktivität von CaMKII, ein Zeitintervall von ~6 Minuten Länge instruiert, welches mit dem Beginn des *Drosophila melanogaster* Paarungsaktes anfängt und mit der Ejakulation ~6 Minuten später endet. (Für nähere Informationen zum Modellverhalten des *Drosophila* Paarungsaktes sei auf das zugehörige Kapitel verwiesen.)

Da es sich bei der Kinase CaMKII um ein evolutionär stark konserviertes Protein (Rothschild et al., 2020) mit nahezu ubiquitärer Expression (Tombes et al., 2003) und variabler Aktivitätsdauer (Thornquist et al., 2020) handelt, ist es denkbar, dass CaMKII den Schlüssel zur Lösung biologischer Intervallzeitmessung auf Sekunden-, Minuten- und im Prinzip auch Stundenebene darstellt.

Zahlreiche essenzielle Eigenschaften dieses potenziell universellen Intervallzeitmessers sind jedoch unklar.

So gelang es Thornquist et al. 2020 nicht, den Mechanismus zu identifizieren, mittels dessen die CaMKII die neuronale Aktivität beeinflusst, obwohl im Rahmen eines Screens 2673 genetische Manipulation versucht wurden, welche u.a. eine Herunterregulation aller inhibitorischen Ionenkanäle einschlossen (Thornquist et al., 2020).

Darüber hinaus verblieb unklar, wie der aus den vier Crz-Neuronen bestehende Schaltkreis, der das 6 Minuten Zeitintervall bemisst, das Signal bezüglich des Endes dieser Zeitspanne zu einem bestimmten Zeitpunkt abgeben kann, obwohl die

intrazellulären CaMKII-Zeitmesser der Neurone des Schaltkreises sich in ihrer Aktivitätsdauer erheblich voneinander unterscheiden (Thornquist et al., 2020).

Diese Arbeit setzt sich zum Ziel, den Mechanismus, welcher den CaMKII-Zeitmesser mit der neuronalen Aktivität verbindet, zu entschlüsseln. Darüber hinaus wird diese Arbeit den Versuch unternehmen, zu zeigen, wie intrazelluläre Repräsentationen von Zeit auf der Ebene neuronaler Netzwerke verarbeitet werden können.

1.5.2. Evidenzakkumulation als Grundlage der Entscheidungsfindung

“A wise man ... proportions his belief to the evidence”

(David Hume in *Enquiry on Human Understanding (Section X)*)

Das Treffen von Entscheidungen, die Wahl, welche Überzeugungen angenommen und welche Handlungen ausgeführt werden sollen, ist für unser Leben von zentraler Bedeutung. Da jedoch sowohl unsere Umwelt als auch unsere inneren Befindlichkeiten komplex, reich an Information und zum Teil sogar widersprüchlich sind, ist das Treffen guter Entscheidungen nicht trivial. Für das Treffen adäquater Entscheidungen ist es daher essenziell, alle verfügbare relevante Evidenz zu bündeln, zu bewerten, und gegeneinander abzuwägen.

Das Studium der sensorischen Evidenzakkumulation stellt, historisch gesehen, den vorherrschenden Ansatz dar, die biologischen Grundlagen der Evidenzakkumulation zu verstehen. Bereits im Jahr 1885 publizierte der französische Wissenschaftler Adolphe-Moïse Bloch den Essay “Expériences sur la vision”. (Gorea, 2015; Huk et al., 2014; Bloch 1885), welcher sich mit der Frage beschäftigt, ob es möglich ist, dem Auge ein Objekt für eine derart kurze Zeit zu zeigen, dass dieses nicht gesehen wird.

Dies führte zu der faszinierenden Beobachtung, dass Lichtreize, welche für weniger als 100 Millisekunden präsentiert werden, zu einer Aufsummierung von Information unterhalb eines Sehschwellenwertes führen, welche sowohl von der Expositionszeit als auch der Helligkeit des Objekts abhängig ist. Das Bloch’sche Gesetz besagt, dass ein Lichtreiz dann als solcher detektiert werden kann, wenn das Produkt aus der Expositionszeit und der Helligkeit einen definierten Wert überschreitet, den

Detektionsschwellenwert. Ein Reiz, dessen Expositionszeit halbiert wird, kann also dann weiterhin als solcher erkannt werden, wenn dafür die Helligkeit dieses Reizes verdoppelt wird.

Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden theoretische Evidenzakkumulationsmodelle entwickelt, welche in der Lage sind, Phänomene wie das Bloch'sche Gesetz gut zu beschreiben, wobei an dieser Stelle besonders auf die vorherrschenden „bounded drift diffusion models“ eingegangen werden soll (Bahl & Engert, 2020; Ratcliff et al., 2016).

So berücksichtigen diese Modelle etwa verschiedene Evidenzquellen, z.B. sensorische Reize aus der Umwelt, welche durch unsere Sinnesorgane aufgenommen werden - im Falle des Bloch'schen Gesetzes die Expositionsdauer und die Intensität des Lichtes, welches durch die Retina wahrgenommen wird, darüber hinaus jedoch auch interne Evidenzquellen wie in der Vergangenheit gemachte Erfahrungen oder den Motivationszustand.

Den „bounded drift diffusion models“ ist dabei gemein, dass diese Evidenz von einem Startpunkt ausgehend in Richtung eines Schwellenwertes akkumuliert (Ratcliff & McKoon, 2008).

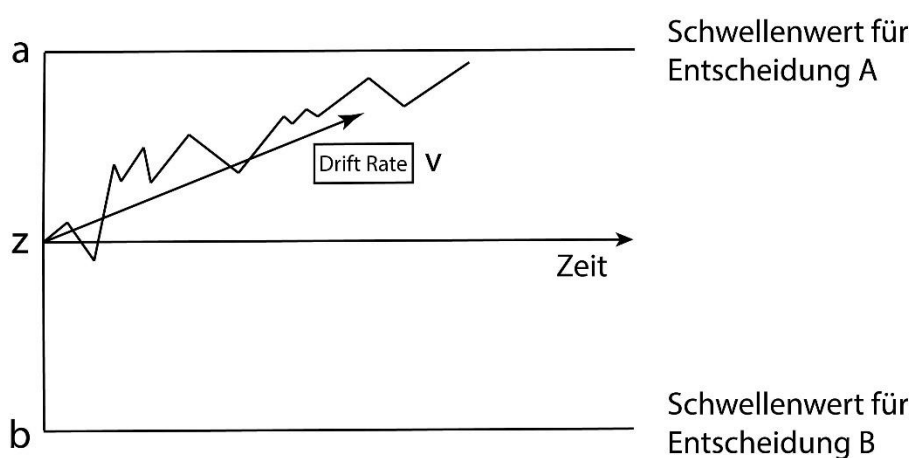


Abbildung 7. Modell eines „bounded drift diffusion models“

Modell eines einfachen „bounded drift diffusion models“. Modifiziert nach Ratcliff & McKoon 2008. (Ratcliff & McKoon, 2008). Die Variablen a und b stellen diejenige Menge an Evidenz dar, welche akkumuliert werden muss, um die Entscheidung A oder B zu treffen. Sie repräsentieren daher jeweils die Schwellenwerte (boundaries) der Evidenzakkumulation. Die Variable z repräsentiert wiederum den Startpunkt der Evidenzakkumulation, welcher sich in diesem Falle genau zwischen A und B befindet, sodass keine Startpräferenz vorliegt. Die Drift Rate wird wiederum durch v repräsentiert und zeigt die Rate der Evidenzakkumulation an.

Dieser Schwellenwert, im Englischen auch „boundary“ genannt, stellt diejenige Menge an Evidenz dar, welche benötigt wird, um eine Antwort zu erzeugen. So wird im Falle des Bloch'schen Gesetzes der Schwellenwert durch die Retina festgelegt und die Antwort, welche bei Erreichen des Schwellenwertes ausgelöst wird, ist die Wahrnehmung des Lichts.

Diese einfachste Form des „drift diffusion Modells“ beschreibt Entscheidungen zwischen zwei möglichen Optionen. Da jedoch oftmals zwischen vielen möglichen Optionen entschieden werden muss, kann es auch eine Vielzahl an Schwellenwerten, eine je Option, geben, welche sich theoretisch gesehen alle in einem Neuron oder aber auch innerhalb verschiedener neuronaler Schaltkreise befinden könnten (M. N. Shadlen & Kiani, 2013).

Gemäß der klassischen „bounded drift diffusion Modelle“ sind drei Variablen für den Entscheidungsprozess von maßgeblicher Bedeutung:

1. Die Akkumulationsrate, deren Durchschnitt als „drift rate“ bezeichnet wird (Ratcliff et al., 2016).
2. Die Position des Akkumulationsstartpunktes, welche eine Startpräferenz in den Entscheidungsprozess implementieren kann, da der Ausgangspunkt nicht gleich weit von den jeweiligen Schwellenwerten entfernt sein muss (Ratcliff et al., 2016).
3. Die Lage der Schwellenwerte selbst (Ratcliff et al., 2016).

Wird die Evidenz jedoch über eine längere Zeitspanne hinweg akkumuliert, so muss zusätzlich noch eine vierte Komponente, die Rate, mit welcher die Evidenz über die Zeit „vergessen“ wird, in Betracht gezogen werden. Diese vierte Komponente ist bisher wenig verstanden und der Grund, warum „drift diffusion Modelle“ bislang oftmals auf kurze Zeitskalen limitiert sind (Ratcliff & McKoon, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wird ein potenzieller Lösungsansatz für dieses Problem vorgeschlagen werden, in dem Versuch, diese zeitliche Beschränkung aufzulösen.

Das klassische experimentelle Modellverhalten der Evidenzakkumulation in einem Entscheidungsfindungskontext basiert auf einem „direction discrimination task“ in Primaten (Newsome et al., 1989; Salzman et al., 1990). Während dieses Tests beobachten Primaten, wie sich Punkte auf einem Bildschirm bewegen. Dabei bewegt

sich ein definierter Teil dieser Punkte kohärent in eine Richtung, wohingegen die übrigen Punkte zufällige Bewegungsmuster aufweisen.

In der Vorbereitung auf diesen Test lernen die Affen, die Richtung der sich kohärent bewegenden Punkte mittels einer sakkadischen Augenbewegung zu einer von zwei Lampen, welche den möglichen Richtungen entsprechen, akkurat widerzugeben – korrekte Entscheidungen werden belohnt bis der Lerneffekt erreicht ist.

Dieses klassische Evidenzakkumulationsexperiment hat einige Vorteile, da u.a. die Stärke der Evidenz bzw. des Reizes und damit die „evidence drift rate“ präzise und standardisiert titriert werden kann. Mittels dieses Modellverhaltens gelang es, einzelne Neurone im Bereich des lateralen intraparietalen Kortex (LIP) zu identifizieren, deren Feuerrate im Vorfeld einer sakkadischen Augenbewegung in die entsprechende Richtung zunimmt und in die Gegenrichtung abnimmt. Dies ermöglichte es, akkurate Vorhersagen bezüglich des Verhaltens des Affen während des Tests zu treffen (Huk et al., 2014; Roitman & Shadlen, 2002a; M. N. Shadlen & Newsome, 2001a). Als Reaktion auf eine Erhöhung der absoluten Evidenzmenge, was durch einen gesteigerten relativen Anteil der sich kohärent bewegenden Punkte erreicht wurde, konnte wiederum ein steileres Ansteigen der „spike rate“ dieser Neurone beobachtet werden, wobei die Steigung der „spike rate“ der „drift rate“ des „bounded drift diffusion Models“ entspricht. Da definitionsgemäß für die Entscheidungsfindung eine Integration der Evidenz über einen gewissen Zeitraum vonnöten ist, wurde ebenfalls getestet, ob die identifizierten LIP-Neurone dazu in der Lage sind, flüchtige sensorische Eindrücke in eine persistierende Form der Evidenz zu überführen, welche zudem über einen längeren Zeitraum hinweg einer ständigen Neubewertung zugänglich ist. Tatsächlich wurde beobachtet, dass 100 Millisekunden lange Bewegungspulse die Feuerrate der LIP-Neurone für einen Zeitraum von 800 Millisekunden beeinflussen. Dies könnte für eine Informationsintegrationskapazität der LIP-Neurone in dieser Größenordnung sprechen (Huk & Shadlen, 2005). Die mechanistischen Hintergründe dieser Evidenzintegration sind allerdings noch unklar, ebenso wie die Beantwortung der Frage, ob den LIP-Neuronen überhaupt eine zentrale Rolle dabei zukommt (Huk et al., 2014; M. N. Shadlen & Kiani, 2013).

Noch unklarer wird die Situation, wenn solche Entscheidungen berücksichtigt werden, für die ein Sammeln und Auswerten von Information über Zeiträume von Sekunden und Minuten unabdingbar ist. So stellen Sekunden und Minuten zwar essenzielle Zeiteinheiten unserer subjektiven Erfahrung dar, jedoch sind diese um ein Vielfaches

länger als die typischerweise Millisekunden umfassenden Zeitskalen, auf welchen Neurone normalerweise Information integrieren. Dies liegt darin begründet, dass der elektrischen Informationsverarbeitung in individuellen Neuronen biophysikalische Grenzen gesetzt sind (Bahl & Engert, 2020; Waskom & Kiani, 2018).

So benannten zwei der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Evidenzakkumulation, Michael Shadlen und Roozbeh Kiani, den Mechanismus der Evidenzintegration als "vielleicht wichtigstes zu lösendes Problem" ihres Feldes (M. N. Shadlen & Kiani, 2013). Mit diesem zentralen Problem sind jedoch noch weitere wichtige offene Fragen verknüpft, etwa was den Beginn einer Evidenzakkumulation auslöst, oder wie diese zum Abschluss kommt. Zwar sagen „Bounded drift diffusion“ Modelle die Existenz von Schwellenwerten voraus, es ist jedoch weder bekannt, wo genau diese Schwellenwerte zu finden sind, noch, wie diese Schwellenwerte gesetzt werden (M. N. Shadlen & Kiani, 2013). Darüber hinaus ist offen, wie und wo sowohl externe Evidenz aus der Umwelt, welche durch sensorische Informationen repräsentiert wird, als auch internale Evidenz, welche z.B. auf den Erfahrungen und Motivationszuständen eines Organismus beruhen, miteinander verarbeitet werden (M. N. Shadlen & Shohamy, 2016).

In letzter Zeit wurden daher verschiedene Ansätze in unterschiedlichen Modellorganismen erprobt, wobei einige interessante mechanistische Erklärungsansätze zum Wesen der Evidenzakkumulation vorgeschlagen wurden. Diese reichen von der komplexen Interaktion weiter neuronaler Schaltkreise in Zebrafischlarven, welche mittels eines Ganzhirn-Bildgebungs-Ansatzes beobachtet wurden (Bahl & Engert, 2020), bis hin zur Akkumulation von elektrischer Information unterhalb eines Schwellenwertes, welche durch die Menge an definierten Ionenkanälen, die wiederum durch die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren bestimmt wird, beeinflusst wird (Groschner et al., 2018).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten sollen diese Ansätze um ein neuartiges, second-messenger-basiertes, Evidenzakkumulationskonzept erweitern, welches anhand eines kompakten neuronalen Netzwerks zeigt, wie Evidenz auf einer Intervall-Zeitskala von Sekunden bis Stunden akkumuliert und integriert werden kann, wobei im gleichen Zuge ein Mechanismus zur Instruktion eines Evidenz-Schwellenwertes präsentiert wird.

1.5.3. Implementierung unterschiedlicher neuronaler Kommunikationsmodi

Rube-Goldberg-Maschinen sind faszinierende Konstruktionen. Sie bestehen aus den unterschiedlichsten Apparaten, die in kreativer Art und Weise aneinandergereiht werden. Dabei besitzt jede dieser Apparaturen eine eindeutig definierte Funktion, die die Initiierung der Funktion der nächsten Apparatur auslöst, was schließlich zur Ausführung der gewünschten, oftmals simplen, Funktion führt.

Vergleichen wir das Gehirn mit einer Rube-Goldberg-Maschine, so entsprächen die Apparaturen der Maschine wohl am ehesten jenen neuronalen Schaltkreisen, die ebenfalls definierte Funktionen ausüben. Während Rube-Goldberg-Maschinen jedoch dadurch an Komplexität gewinnen, dass sie eine immer größere Anzahl an Apparaturen hintereinanderschalten, die letztlich erzielte Output-Funktion aber dieselbe bleibt, repräsentieren neuronale Schaltkreise das absolute Gegenteil. Neuronale Schaltkreise sind nämlich dazu in der Lage, eine weite Bandbreite an komplexen Funktionen auszuüben, obwohl sich ihre anatomische Vernetzung untereinander nur in geringem Maße ändert, was ihr Verständnis noch schwieriger gestaltet. So sind zahlreiche Beispiele neuronaler Populationen bekannt, die in dem einen Moment der einen Aufgabe nachgehen, in einem anderen Moment jedoch einer anderen, wobei die Mechanismen, mittels derer diese Populationen ihre funktionelle Vielseitigkeit erreichen, nicht gut verstanden sind (Mante et al., 2013; Rigotti et al., 2013).

Eine Möglichkeit, sich dieser faszinierenden Quelle funktionaler Flexibilität anzunähern, stellt das Studium jener neuronaler Schaltkreise dar, welche bei dem fundamental bedeutsamen Prozess der Entscheidungsfindung mitwirken: die Neurone dieser Netzwerke müssen dazu befähigt sein, Evidenz zu akkumulieren, diese untereinander zu kommunizieren und schließlich zu einem Konsens zu kommen, ohne verfrühte oder unvollständige Reaktionen in nachgeschalteten Netzwerken auszulösen (Elsayed et al., 2016; Kaufman et al., 2014; Yoo & Hayden, 2020). Sobald innerhalb der Neuronengruppe dieser Konsens gefunden ist, muss die Kommunikation innerhalb des Netzwerks hin zu einer Kommunikation zu Neuronen außerhalb des Netzwerks verlagert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird mit der sogenannten „Eruption“ ein Mechanismus vorgeschlagen werden, der erklären könnte, wie neuronale Populationen zwischen unterschiedlichen Kommunikationsmodi hin und her wechseln könnten. Dies

könnte uns der Beantwortung der Frage nach den Grundlagen der faszinierenden Flexibilität neuronaler Netzwerke einen Schritt näherbringen.

1.6 Ziele der Arbeit

1. Das Hauptziel der Arbeit ist die Identifizierung des neuronalen Äquivalents von Evidenz, die in Neuronen über Sekunden und Minuten hinweg akkumuliert. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Crz-Neurone circa 75 Sekunden an elektrischer Aktivität benötigen, soll daher zunächst durch eine tiefere Charakterisierung dieses Phänomens gezeigt werden, dass es sich bei diesem Prozess um eine kontinuierliche Evidenzakkumulation handelt. Anschließend soll ein optogenetisches Hochdurchsatz-Screening-Verfahren entwickelt werden, das eine Testung tausender Gene hinsichtlich deren Einflusses auf das 75 Sekunden Fenster ermöglicht. Nachdem das Äquivalent der Evidenzakkumulation identifiziert ist, soll der Mechanismus der Evidenzakkumulation sowie dessen Regulation durch weitere Signalwegkomponenten tiefergehend ergründet, beschrieben und charakterisiert werden.
2. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit ist die Adressierung der Frage, wie sich Neurone innerhalb eines Entscheidungsnetzwerks über akkumulierte Evidenz austauschen und wie schließlich in der Gesamtheit des neuronalen Netzwerks eine Alles-oder-Nichts-Entscheidung getriggert wird. Die vier Crz-Neurone treffen eine Alles-oder-Nichts-Entscheidung zu einem definierten Zeitpunkt circa 6 Minuten nach dem Beginn der Paarung, was unter anderem zur Initiierung der Ejakulation führt. Da die vier Crz-Neurone jedoch individuell unterschiedlich lange CaMKII-Zeitmesser besitzen ist unklar, welches Neuron diese Alles-oder-Nichts-Entscheidung trifft, oder aber ob hinsichtlich dieses Zeitpunktes ein Konsens zwischen den Crz-Neuronen erzielt werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher untersucht werden, welche Rolle jedem einzelnen Neuron innerhalb des Netzwerks zukommt und ob beziehungsweise wie die einzelnen Neurone miteinander kommunizieren. Auf dieser Erkenntnis aufbauend soll dann der Mechanismus beschrieben werden, wie das Crz-Netzwerk die Alles-oder-Nichts-Entscheidung trifft.

3. Die CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen stellt den ersten beschriebenen molekularen Zeitmesser auf Intervallzeitskalen dar. Das Verständnis des Zeitmessmechanismus von CaMKII ist jedoch unvollständig, da nicht bekannt ist, wie die Aktivität der CaMKII die neuronale Aktivität für die Dauer des zu messenden Zeitintervalls unterdrückt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, weitere Komponenten des Zeitmessvorgangs zu identifizieren, über die die CaMKII Einfluss auf die neuronale Aktivität nehmen kann, um so den Zeitmessmechanismus der CaMKII weitergehend entschlüsseln zu können.

2. Studiendesign & Information zur wissenschaftlichen Kooperation

Die experimentelle Arbeit der vorliegenden Dissertation wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts durchgeführt, das aus zwei Unterprojekten besteht.

Das erste Unterprojekt dieses Kooperationsprojekts umfasste die Planung, Durchführung und Interpretation der für die Adressierung der Ziele essenziellen *in-vivo* Verhaltensuntersuchungen und gezielten Veränderungen des Genoms der untersuchten Fliegen und wurde von dem Verfasser dieser Dissertation durchgeführt.

Das zweite Unterprojekt inkludiert die *ex-vivo* Analysen mittels bildgebender Methoden und wurde durch Dr. Stephen Thornquist durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Kooperationsprojekts wurden mit den Untersuchern beider Unterprojekte als Co-Erstautoren publiziert (Thornquist, Pitsch et al., 2021).

Beide Unterprojekte sind eng miteinander verwoben, da im Verlauf des Kooperationsprojekts die Ergebnisse der jeweiligen Unterprojekte die Ausrichtung und Ziele des jeweils anderen Projekts stark beeinflusst haben. Im Ergebnisteil dieser Dissertationsarbeit werden die experimentellen Ansätze und Erkenntnisse aus der Arbeit des Autors dieser Dissertation beschrieben, welche das erste Unterprojekt umfassen. Darüber hinaus werden die Ergebnisse des zweiten Teilprojekts aufgenommen, so dies für die Nachvollziehbarkeit der grundlegenden Erkenntnisse sowie der Aussagekraft der Arbeit erforderlich ist.

Die Urheberschaft für diese Ergebnisse aus dem zweiten Unterprojekt wird im Text sowie den Abbildungen eindeutig Dr. Thornquist zugeschrieben, wobei das Stichwort „*ex-vivo*“ dem Leser dieser Arbeit ein weiteres Kennzeichen bezüglich der Urheberschaft der vorgestellten Ergebnisse an die Hand gibt. Im Abschnitt Material und Methoden werden die Methoden für die vom Autor dieser Arbeit durchgeführten *In-vivo*-Experimente und die statistischen Methoden für die aus diesen Experimenten gewonnenen Daten im Detail beschrieben. Die im zweiten Teilprojekt durchgeführten *ex-vivo* und mikroskopischen Methoden werden in dem Ausmaß beschrieben, wie ihre Kenntnis für den Leser notwendig ist, um den Ergebnisbeschreibungen folgen zu können. Weiterführende Details diesbezüglich befinden sich im Anhang.

3. Material und Methoden:

3.1. *Drosophila melanogaster*-Haltung

Die Fliegen wurden auf konventionellem Maismehl-Melasse-Agar bei konstantem 12 Stunden Licht zu 12 Stunden Dunkelheit Zyklus bei 25°C gehalten. Die Männchen wurden 0-8 Tage nach deren Schlüpfen von den Weibchen getrennt und für mindestens 3 Tage zusammen mit anderen Männchen gehalten, um die Paarungsmotivation zu steigern, bevor diese getestet wurden. Jene Fliegen, welche optogenetische Werkzeuge wie GtACR1 oder CsChrimson exprimieren, wurden, zum Zwecke der Retinalaufnahme auf rehydriertem Kartoffelfutter (Carolina Bio Supply Formula 4-24 Instant *Drosophila* Medium, Blue) gehalten, welches mit All-trans-Retinal (Sigma Aldrich R2500) versetzt wurde, welches auf 50mM in 70% Ethanol verdünnt wurde. Diese Exposition zu Retinal wurde für mindestens 3 Tage durchgeführt. „Kein Retinal“ Kontrollen wurden auf Futter ohne Retinalzusatz gehalten. Um einer Degradation des photosensitiven Retinals durch Licht vorzubeugen, wurden die Behältnisse mit den Fliegen durch schwarze Plastikverkleidungen ummantelt, welche mittels eines 3D Druckers hergestellt wurden.

Als Kopulationspartnerinnen für die männlichen Fliegen wurden jungfräuliche Weibchen gewählt, welche ein CsChrimson-mVenus Transgen tragen (Bloomington stock #55135). Diese Weibchen besitzen eine erhöhte Rezeptivität bezüglich der Paarung, was sowohl zu einer erhöhten absoluten Anzahl an beobachteten Paarungen als auch zu einer verkürzten Latenz bis zur Paarung führt, sodass mehr Kopulationsexperimente in kürzerer Zeit durchgeführt werden konnten. Dies setzt jedoch voraus, dass die Dauer der Kopulation nicht durch den Genotyp des Weibchens beeinflusst wird, was durch MacBean & Parsons gezeigt werden konnte (MacBean & Parsons, 1967). Die Gewinnung einer hohen Menge an benötigten Jungfrauen wurde dadurch vereinfacht, dass die Männchen des UAS-CsChrimson-mVenus stocks ein durch Hitze aktivierbares, apoptoseinduzierendes hs-hid Transgen auf dem Y-Chromosom tragen (Grether et al., 1995). Die für die Gewinnung von Jungfrauen bestimmten Fliegenphiolen wurden kurz vor dem Schlüpfen der ersten adulten Fliegen für ca. 70 Minuten in ein 37°C heißes Wasserbad getaucht, was zu einem Absterben der männlichen Larven und Puppen führte, sodass ausschließlich Weibchen schlüpften. Diese wurden für 3-13 Tage in Gruppen gehalten, bevor sie für die Kopulationsexperimente verwendet wurden. Die Kopulationsexperimente wurden zu jeder Tageszeit durchgeführt, zum einen, da von uns

kein Zusammenhang zwischen der Tageszeit und der Dauer der Paarung festgestellt wurde, zum anderen, da jene Fliegen, welche optogenetische Werkzeuge exprimieren, aufgrund der Retinalexposition vor den Experimenten mindestens 3 Tage in absoluter Dunkelheit verbrachten.

Eine detaillierte Übersicht zu allen verwendeten Genotypen ist im Tabellenanhang zu finden.

3.2. Beurteilung des Paarungsverhaltens

Ein Paarungsakt zweier Fliegen wurde dann als solcher gewertet, wenn diese mindestens 30 Sekunden lang die dafür typische Haltung aufweisen. Diese charakteristische Position ist daran zu erkennen, dass das Männchen das Weibchen besteigt und sein Abdomen mittels seiner Vorderbeine auf den Rücken des Weibchens hievt, während sich die Genitalien des Männchens und Weibchens miteinander vereinigen. Eine Paarung zweier Fliegen ist auch für den ungeübten Betrachter leicht als solche zu erkennen und kann problemlos von anderen Verhaltensweisen unterschieden werden.

Diese stereotype Position wird selbst unter negativen Bedingungen wie z.B. während der Exposition eines Hitzeschocks beibehalten, es sei denn, das Männchen entscheidet sich aufgrund dieses aversiven Ereignisses für die Beendigung der Paarung. Dies ist eindeutig von einem sogenannten "stuck" Phänotypen zu unterscheiden, welcher manchmal auftreten kann, wenn das Männchen Probleme hat, seine Genitalien aus dem Weibchen herauszulösen. Dieser Phänotyp ist daran zu erkennen, dass sich das Männchen von dem Weibchen wegorientiert und durch Abstemmen seiner Hinterbeine versucht, sein Genital aus der Verbindung zu lösen. In diesem seltenen Fall, welcher besonders bei extrem lang andauernden Paarungen von über einer Stunde auftreten kann und womöglich auf ein Aushärten der Samenflüssigkeiten zurückzuführen ist, wurde die Paarung als beendet gewertet.

3.3. Optogenetische Stimulationsexperimente

Für Experimente, welche die Stimulation von CsChrimson beinhalteten, wurden jeweils eine männliche sowie eine weibliche Fliege in eine von ~3,2mm dickem Acryl ummantelte Kammer mit einem Durchmesser von ~21,8mm platziert. 10,16cm unterhalb der Acrylkammern befinden sich LEDs mit einer Emissionswellenlänge von 655nm

(Luxeon Rebel, Deep Red, LXM3-PD01-0350), welche mit konstanten 700mA betrieben werden (LuxDrive BuckPuck, 03021-D-E-700). Das erzeugte Licht wird anschließend durch eine satinierte Kollimationsoptik geleitet (Carclo #10124) und trifft auf eine dünne Diffusionsschicht (Inventables, 23114-01) unterhalb der Kammern. Dies führt zu einer gleichmäßigen Verteilung der Lichtintensität (etwa 0,1mW/mm²). Die LEDs werden durch einen Arduino Mega2560 (Adafruit) gesteuert, welcher wiederum durch ein benutzerdefiniertes Skript unter der Kontrolle eines Raspberry Pi gesteuert wird. Eine Beobachtung der Fliegen während der Verhaltensexperimente ist durch die Nutzung einer Raspberry Pi NoIR Kamera sowie einer Infrarotbeleuchtung von unten mittels Infrarotlampen (Crazy Cart 48-LED CCTV Ir Infrared Night Vision Illuminator) möglich. Das erzeugte Video wird auf einen Computerbildschirm übertragen, sodass das Paarungsverhalten der Fliegen in Echtzeit beobachtet werden kann.

Für Experimente, welche eine Stimulation von GtACR1 beinhalteten, wurde der selbige Aufbau wie soeben beschrieben verwendet, anstelle der roten LEDs wurden jedoch grüne Luxeon Rebel, LXML PM01-0100 LEDs verwendet. Diese wurden, falls nicht anders erwähnt, mittels einer Pulsweitenmodulation so beeinflusst, dass eine über die Zeit gemittelte Intensität von etwa 5 mW/mm² erreicht wird, was in etwa einer 6-fach höheren Lichtintensität als Umgebungslicht entspricht.

Für Experimente mit bPAC wurde ebenfalls der selbige Aufbau verwendet, jedoch zusätzlich eine blaue LED (Luxeon Rebel LXML-PB01-0040) mit einer Wellenlänge von 470nm verwendet, welche eine durchschnittliche Intensität von etwa 0,25 mw/mm² erreicht.

Im Rahmen des Hochdurchsatz-Screens wurden jeweils eine männliche sowie eine weibliche Fliege in die einzelnen Kammern einer 32-Kammer-Platte platziert, wo deren Paarungsverhalten mittels einer sich etwa 23cm über den Kammern befindenden Videokamera (Canon VIXIA HF R600) aufgezeichnet wurde. Die Beleuchtung der Kammern von unten wurde durch die Verwendung einer diffusen weißen Lichtquelle von etwa 5000 Lux Beleuchtungsstärke erreicht (Artograph LightPad 930LX). Diese Beleuchtungsquellen wurden mittels eines Arduino ATMEGA2560 kontrolliert. Der dabei ausgeführte Code, welcher durch Dr. Thornquist programmiert wurde, ist auf github auf der Seite des Crickmore&Rogulja Labs zu finden: <https://github.com/CrickmoreRoguljaLabs/>.

3.4. Das GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System ist ein binäres Expressionssystem, welches die selektive Aktivierung eines beliebigen klonierten Gens in einer Vielzahl von zellspezifischen Mustern ermöglicht.

Es besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten:

1. Dem Transkriptionsfaktor Gal4
2. Optimierten Gal4-Bindungsstellen, der Upstream activating sequence (UAS)

Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und besteht wiederum aus zwei wesentlichen Komponenten (Brent & Ptashne, 1985; Keegan et al., 1986; Ptashne, 1988):

1. Der Gal4-DNA-Bindungsdomäne
2. Der Gal4-Aktivierungsdomäne

Da die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 ausschließlich an die UAS-Sequenz bindet, welche im Genom von *Drosophila melanogaster* nicht vorkommt, kann der Transkriptionsfaktor Gal4 in *Drosophila melanogaster* heterolog exprimiert werden, ohne Einfluss auf die endogene Genexpression auszuüben (Brand & Perrimon, 1993; Fischer et al., 1988). Wird zusätzlich zu Gal4 weiterhin die UAS-Sequenz mit dem gewünschten Gen heterolog in *Drosophila melanogaster* exprimiert, so bindet die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 an die UAS-Sequenz und die Gal4-Transaktivierungsdomäne induziert ein Ablesen der stromabwärts liegenden Gensequenz.

Die Zellspezifität des Gal4/UAS-Systems kann dabei auf mehrere Arten erreicht werden. Es ist zum Beispiel möglich, das Gal4-Gen mittels P-Element-Transformation an zufälligen Orten im Genom einzubringen (Brand & Perrimon, 1993), was dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor Gal4 nur in jenen Zellen exprimiert wird, die den Genabschnitt, in dem das Gal4-Transgen gelandet ist, natürlicherweise verstärkt ablesen (Enhancer-Trap-Strategie). Es ist jedoch auch möglich, das Gal4-Transgen zusammen mit der Enhancer-Region eines gewünschten Gens mittels des phiC31 site-specific integration system (Groth et al., 2004) an einer definierten Stelle im Genom einzufügen (Pfeiffer et al., 2008). So wurde die in dieser Arbeit verwendete Crz-Gal4 Linie dadurch erzeugt,

dass die 391 Basenpaare stromaufwärts der vermuteten Transkriptionsstartstelle der endogenen Crz-Sequenz dem Gal4-Transgen als Enhancer-Sequenz hinzugefügt wurden (Tayler et al., 2012). Des Weiteren ist es möglich, mittels CRISPR-Cas9 gewünschte Gene aus dem Genom herauszuschneiden und durch eine attP docking site zu ersetzen, mittels welcher wiederum in einem weiteren Schritt die zuvor ausgeschnittene Gen-Sequenz, mit einer Gal4-Sequenz an deren C-Terminus, erneut an deren endogene Stelle eingefügt werden kann. Dabei wird das STOP-Codon der Gen-Sequenz durch eine spaltbare T2A-Sequenz ersetzt, was die Expression von Gal4 zusammen mit dem Gen der Wahl ermöglicht (Deng et al., 2019).

3.5. Das LexA/LexAop-System

Das LexA/LexAop-System ist ein weiteres binäres Expressionssystem, das in Drosophila die Expression gewünschter Transgene in zellspezifischen Mustern ermöglicht (Lai & Lee, 2006).

Die Sequenzen der gewünschten Transgene werden dabei unter die Kontrolle eines basalen Promotors gestellt, welcher mehrere LexA-Bindungsstellen besitzt und als LexA operator, kurz LexAop (analog der UAS-Sequenz im Gal4 System), bezeichnet wird.

Die DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA wird zum Zwecke der Transgen-Aktivierung mit einer Aktivierungsdomäne, zum Beispiel der viralen VP16 Aktivierungssequenz, fusioniert (Lai & Lee, 2006). Bindet die DNA-Bindungsdomäne von LexA die LexAop-Sequenz des gewünschten Transgens, so induziert die Aktivierungsdomäne die Transkription des Transgens.

Die Zellspezifität der LexA-Expression wird unter Verwendung der gleichen Techniken wie bei dem Gal4/UAS-System (siehe oben) erreicht.

3.6. RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen biologischen Mechanismus der Gen-Stillegung (Fire et al., 1998; Hannon, 2002). Die Gen-Stillegung durch RNAi wird dabei entweder über small interfering RNAs (siRNA) oder aber microRNAs (miRNAs) erreicht. Small interfering RNAs entstehen im Rahmen einer antiviralen

Immunabwehr, wenn bei einer viralen Infektion einer Zelle lange doppelsträngige virale RNAs durch die Endoribonuklease Dicer-2 in kurze Fragmente geschnitten werden (X. H. Wang et al., 2006). MicroRNAs oder ihre Vorläufer-Transkripte, die im Rahmen mehrerer Schritte (He & Hannon, 2004), unter anderem auch unter Mitwirkung der Endoribonuklease Dicer, zu microRNAs prozessiert werden, sind dagegen im Genom enkodiert und besitzen eine Rolle in der endogenen Expressionsregulation (R. C. Lee et al., 1993). Sowohl die microRNAs als auch siRNAs binden im Rahmen der RNA-Interferenz an ein Mitglied der Argonaute-Protein-Familie. Der dadurch entstehende Komplex wird als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichnet und stellt den Effektor des RNA-Interferenz-Mechanismus dar. Der RISC-Komplex kann bereits in seiner minimalen Form, bestehend aus dem Argonaute-Protein und der kurzen regulatorischen RNA, eine RNA-Interferenz-Funktion ausüben (Rivas et al., 2005), jedoch kann der RISC-Komplex auch aus einer größeren Anzahl an komplex miteinander interagierenden Bestandteilen bestehen (Pham et al., 2004). Den RISC-Komplexen gemeinsam ist jedoch, dass die kurze regulatorische RNA als Guide für den RISC-Komplex dient, z.B. indem diese über komplementäre Basenpaarung an die komplementäre mRNA Sequenz, welche durch den RISC abgebaut werden soll, bindet (Pratt & MacRae, 2009). Der aktivierte RISC-Komplex kann das Ziel der Gen-Stilllegung dabei auf mehreren verschiedenen Wegen erreichen, z.B. durch eine Unterdrückung der Translation (Iwasaki et al., 2009), ein Aufschneiden von mRNA (Tolia & Joshua-Tor, 2007) oder durch eine Beeinflussung der Transkription oder des Genoms selbst (z.B. durch die Induktion von Heterochromatin) (Verdel et al., 2004).

Der Mechanismus der RNA-Interferenz kann als genetisches Werkzeug zur Stilllegung gewünschter Gene genutzt werden, indem doppelsträngige RNA-Moleküle, zum Beispiel durch eine Injektion, in die gewünschten Zellen beziehungsweise den gewünschten Organismus eingebracht werden (Fire et al., 1998).

Anstelle einer Injektion doppelsträngiger RNA können jedoch auch inverted-repeat-Gene ins Genom eingebracht werden, deren Transkription zur Herstellung von RNA-Molekülen mit einer stabilen Haarnadelstruktur führt. Diese Haarnadelstruktur-RNA kann als doppelsträngige RNA ebenfalls zu einer RNA-Interferenz-induzierten Genstilllegung führen (Kennerdell & Carthew, 2000; Tavernarakis et al., 2000). Die in-vivo Expression von Haarnadelstruktur-RNA besitzt mehrere Vorteile: Zum einen nimmt die Konzentration der zellintern vorliegenden doppelsträngigen RNA auch bei mehrfacher Teilung der Zelle nicht ab, was eine gleichbleibend wirkungsvolle Genstilllegung zu

unterschiedlichen Stufen der Entwicklung, etwa auch im adulten Gewebe ermöglicht (Tavernarakis et al., 2000). Zum anderen ermöglicht die in-vivo Expression von doppelsträngiger Haarnadelstruktur-RNA die spezifische Genstilllegung in präzise definierten Geweben bzw. Zellen. Dies spielt vor allem auch in *Drosophila melanogaster* eine große Rolle, da doppelsträngige RNA-Moleküle in *Drosophila melanogaster*, im Gegensatz zu *C. elegans* (Tabara et al., 1998), die Zellmembran nicht überwinden können (Van Roessel et al., 2002). Werden die inverted-repeat-Gene daher mit dem Gal4/UAS-System kombiniert, so ist eine zellspezifische Gen-Stilllegung möglich (Dietzl et al., 2007). Da die transkribierten Haarnadelstruktur-RNA-Moleküle zunächst durch die Endoribonuklease Dicer-2 in kürzere doppelsträngige RNA-Moleküle umgewandelt werden müssen, ermöglicht eine gleichzeitige Überexpression von Dicer-2 eine noch effektivere Genstilllegung (Dietzl et al., 2007). Dies ist dann zu beachten, wenn im Rahmen von RNAi-Experimenten Transgene der älteren Generation (z.B. Valium 1 oder Valium 10 Vektoren) verwendet werden. RNAi Transgene der Generation 2 enkodieren dagegen kurze Haarnadelstruktur-RNA (shRNA) (Ni et al., 2011) und sind deshalb nicht auf die Ko-Expression von Dicer-2 angewiesen.

3.7. Generierung der benötigten genetisch veränderten Fliegen

Im Folgenden sollen die Prinzipien und Techniken der *Drosophila*-Neurogenetik am Beispiel zweier für diese Dissertationsarbeit essenzieller Experimente, dem Hochdurchsatz-Screening sowie dem CoinFlp-Mosaikexperiment, aufgezeigt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung jedes einzelnen Genotyps würde den angedachten Umfang dieser Dissertationsarbeit übersteigen.

Aufgrund der enormen Vorarbeiten der *Drosophila*-Gemeinschaft kann zur Herstellung der benötigten genetisch veränderten Fliegen oftmals auf ein Baukasten-Prinzip zurückgegriffen werden, da im Rahmen mehrerer großer Projekte wie z.B. dem "Transgenic RNAi Project (TRiP)" (Perkins et al., 2015) oder der RNAi-Kollektion des Vienna *Drosophila* Resource Center (Dietzl et al., 2007) tausende von transgenen Fliegen hergestellt wurden. Am Beispiel der transgenen RNAi Fliegen wurden die Vektoren, welche unter anderem das UAS-RNAi-Konstrukt zur Herunterregulation definierter Gene beherbergen, dabei entweder mittels P-Element Insertion an variablen Stellen des Genoms eingefügt und anschließend hinsichtlich ihrer Position überprüft (Dietzl et al., 2007), oder aber mittels der phiC31 targeted integration method in eine

bestimmte und bereits zuvor charakterisierte landing site, z.B. attP2, eingefügt (Groth et al., 2004; Ni et al., 2008, 2009, 2011).

Die Fliegen, welche im Rahmen dieser Projekte hergestellt wurden, sind von Drosophila Stock-Zentren wie z.B. dem Bloomington Drosophila Stock Center erhältlich. An diesen Stock-Zentren wird auch ein großer Teil der jemals hergestellten transgenen Fliegen aufbewahrt und kann von diesen angefordert werden, wovon in dieser Arbeit in großem Maße Gebrauch gemacht wurde. Die auf diese Weise erlangten genetisch veränderten Fliegen müssen anschließend durch verschiedene Kreuzungsschemata so gekreuzt und die enkodierten Transgene damit kombiniert werden, dass am Ende der Kreuzungsschemata eine Fliege mit der Kombination aller gewünschten Transgene vorliegt.

3.7.1. Hochdurchsatz-Screening

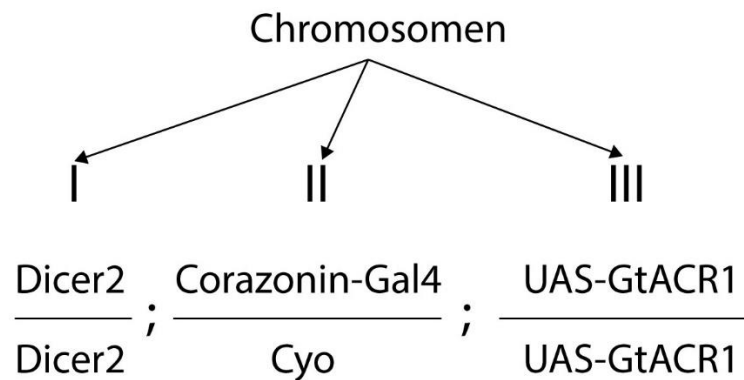
Um im Rahmen des optogenetischen Hochdurchsatz-Screenings männliche Fliegen mit genetischen Manipulationen in den Crz-Neuronen auf eine Veränderung des Crz-Fensters testen zu können, mussten zunächst die Fliegen der Eltern-Generation (P-Generation) hergestellt bzw. beschafft werden.

Die männlichen Fliegen der P Generation stellten dabei den variablen Teil der Kreuzung dar, da diese die Transgene für die Manipulation eines spezifischen Gens in ihrer DNA enkodierten. Die Linien der männlichen Fliegen der P Generation wurden daher durch den Autor dieser Arbeit zunächst mittels der Drosophila Gen-Datenbank FlyBase als in Frage kommend identifiziert und dann von den großen Drosophila Stock-Zentren beschafft. Bei der überwiegenden Zahl dieser Fliegenlinien handelte es sich dabei um UAS-RNAi oder UAS-Überexpressionslinien.

Die Linie der weiblichen Fliegen der Eltern-Generation musste dagegen zunächst durch eine Reihe an Kreuzungen aus anderen Linien hergestellt werden und dabei drei wesentliche Transgene beinhalten:

1. Den Transkriptionsfaktor Gal4 unter der Kontrolle des Crz-Promotors (Tayler et al., 2012)
2. Den durch grünes Licht aktivierbaren Chloridkanal GtACR1 (Mohammad et al., 2017) unter der Kontrolle einer upstream activating sequence (UAS)
3. Die Endonuklease Dicer-2 (Dietzl et al., 2007)

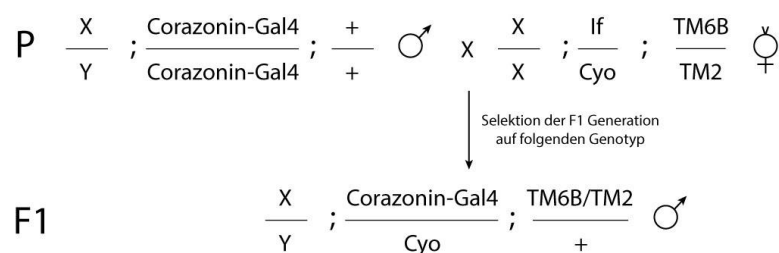
Da sich das ausgewählte Dicer-2 Transgen auf dem X-Chromosom, das Corazonin-Gal4 Transgen auf dem Chromosom II sowie das UAS-GtACR1 Transgen auf dem Chromosom III befindet, hat die hergestellte weibliche Linie der P-Generation z.B. folgenden Genotyp:



Um die benötigten Transgene kombinieren zu können, mussten die jeweiligen Transgen-tragenden Chromosomen auf den Chromosomen II und III durch homologe Balancer-Chromosomen „gebalancet“ werden. Balancer-Chromosome sind mehrfach invertierte und neu angeordnete Chromosomen, welche eine zentrale Rolle in der Umsetzung zahlreicher genetischer Techniken einnehmen (Millerid et al., 2019). Ihre Inversionen verhindern, dass eine homologe Rekombination des Chromosomenabschnitts, auf dem das Transgen liegt, zu überlebensfähigen Nachkommen führen kann. Zugleich besitzen Balancer-Chromosomen rezessiv letale bzw. sterile Mutationen, sodass das Balancer-Chromosom das Nicht-Balancer-Chromosom niemals verdrängen kann (Muller, 1917, 1918). Aufgrund der Kombination dieser beiden Eigenschaften ermöglichen Balancer-Chromosomen die langfristige Aufbewahrung einer heterozygoten Drosophila-Linie. Da Balancer-Chromosomen ebenfalls solche Mutationen enkodieren, welche zu visuell sichtbaren Veränderungen des Phänotyps der Fliege führen (Millerid et al., 2019; Muller, 1917), ist es darüber hinaus möglich, am Phänotyp der jeweiligen Fliegen der F1 Generation zu bestimmen, ob diese entweder das Balancer-Chromosom, oder aber das Chromosom mit dem gewünschten Transgen geerbt haben. Auf der Grundlage dieser Eigenschaften ist es daher möglich, allein durch die Kenntnis der optisch identifizierbaren Balancer-Marker und mehrerer Kreuzungsschritte, mehrere Transgene in einer Fliege zu kombinieren. Dies soll anhand der nachfolgend dargestellten Kreuzungsschritte, welche zur Herstellung der weiblichen P Linie benötigt waren, illustriert werden:

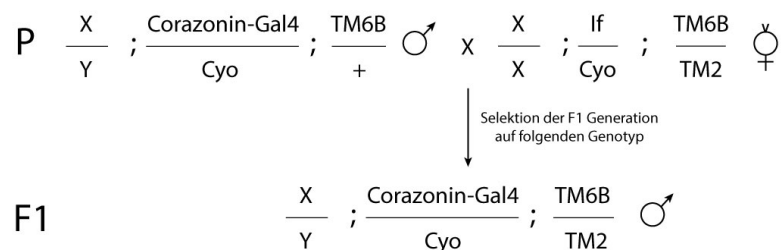
Schritt 1:

Erste „Balancing-Kreuzung“. Die Corazonin-Gal4-Transgen beherbergende Fliege wird mit einer „Double-Balancer-Fliege“, welche die 3 Balancer Cyo (Chromosom II), TM6B (Chromosom III) sowie TM2 (Chromosom III) sowie den Marker If (Chromosom II) besitzt, gekreuzt. Es werden solche Nachkommen der F1 Generation selektiert, welche die phänotypischen Zeichen der Balancer Cyo (~50%) sowie entweder der Balancer TM2 oder TM6B tragen (100%).



Schritt 2:

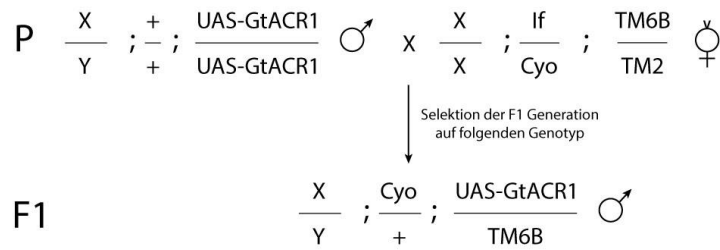
Zweite „Balancing-Kreuzung“. Die nun einfach gebalancete Corazonin-Gal4 Fliege wird erneut mit einer „Double-Balancer-Fliege“ gekreuzt. Es werden solche Nachkommen der F1 Generation selektiert, welche die phänotypischen Zeichen der Balancer Cyo sowie sowohl des Balancers TM2 als auch des Balancers TM6B tragen.



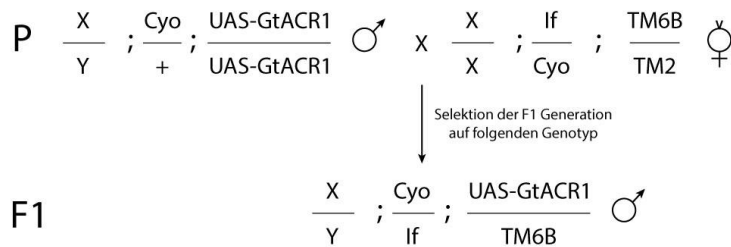
Schritt 3:

Die UAS-GtACR1 enkodierende Fliege wird ebenfalls doppelt „gebalancet“.

Schritt 3.1:

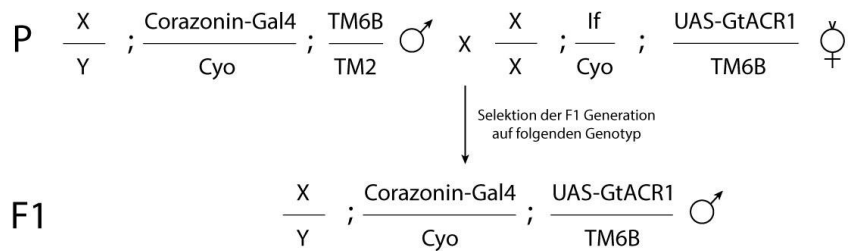


Schritt 3.2:



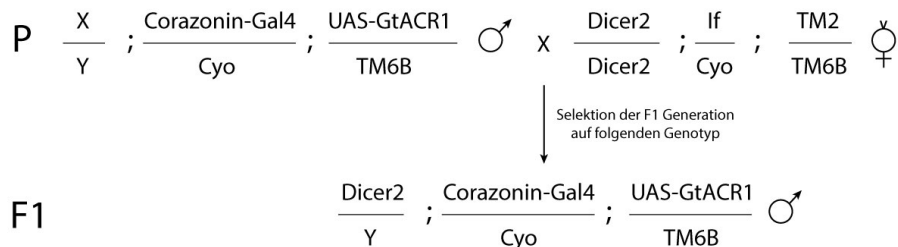
Schritt 4:

In einem nächsten Schritt können das Corazonin-Gal4 Transgen sowie das UAS-GtACR1-Transgen in einer Fliege kombiniert werden, indem die beiden doppelt gebalancierten Fliegenlinien zueinander gekreuzt werden. Anschließend werden nur solche Männchen der F1 Generation selektiert, welche ausschließlich die Balancer für Cyo (gebogene Flügel), und somit Corazonin-Gal4 auf dem anderen zweiten Chromosom, sowie entweder TM6B (vermehrte Haare am oberen seitlichen Thorax sowie oftmals gedrungener Körper) oder TM2 (verkürzte und rundere Haltere (Schwingkölbchen)), und somit UAS-GtACR1 auf dem anderen 3. Chromosom, aufweisen.



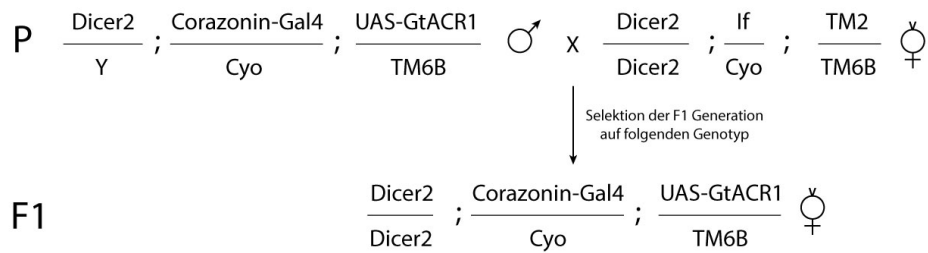
Schritt 5:

In diesem Schritt wird ein Dicer-2 Transgen auf das X-Chromosom der Corazonin-Gal4 / UAS-GtACR1 Fliegenlinie hinzugefügt. Dafür wird ein Männchen dieser Linie mit einem doppelt gebalancierten Weibchen mit dem Dicer-2 Transgen auf den X-Chromosomen gepaart und erneut für Männchen mit ausschließlich dem Balancer Cyo sowie entweder TM6B oder TM2 selektiert. Da das X-Chromosom des Männchens von der Mutter stammt, wird jedes der aus dieser Kreuzung entstammenden Männchen das Dicer-2 Transgen auf dem X-Chromosom besitzen.



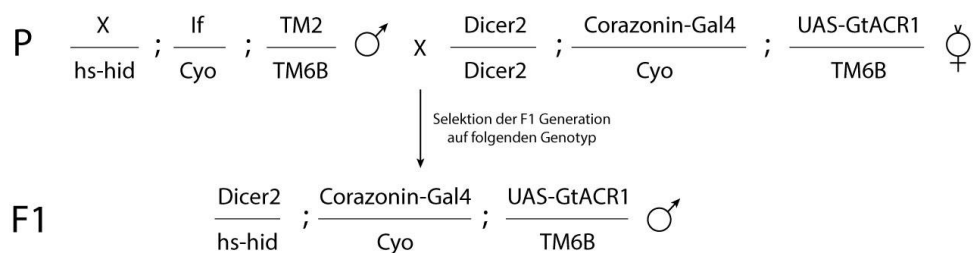
Schritt 6:

In diesem Schritt wird das Dicer2 / Corazonin-Gal4 / UAS-GtACR1 Männchen erneut mit doppelt gebalancierten Weibchen mit dem Dicer-2 Transgen auf den X-Chromosomen gepaart. Anschließend werden diejenigen weiblichen Jungfrauen gesammelt, welche wiederum nur die Balancer Cyo und entweder TM6B oder TM2 besitzen.



Schritt 7:

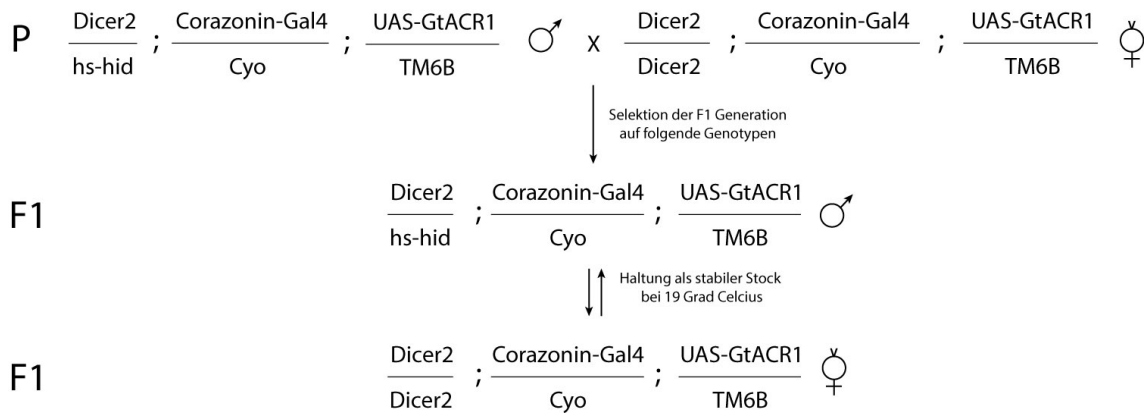
Die zuvor gesammelten Dicer-2 / Corazonin-Gal4 / UAS-GtACR1 Weibchen werden nun mit doppelt gebalancierten Männchen verpaart, die das Gen *head involution defective* (*hid*) unter der Kontrolle eines Hitze-Schock-Promotors auf dem Y-Chromosom tragen (*hs-hid*) (Grether et al., 1995). Da es sich bei *hid* um einen Aktivator der Apoptose handelt, führt ein Anstieg der Außentemperatur auf 37 Grad für eine Stunde zum Tod des Trägers des *hs-hid* Transgens. Dies hat den Vorteil, dass bei einer solchen Linie nach Applikation des Hitzeschocks alle daraufhin schlüpfenden Fliegen weibliche Jungfrauen sind, welche für weitere Kreuzungen verwendet werden können. Aus diesem Grund werden in diesem Kreuzungsschritt solche Männchen selektiert, welche nur die Balancer *Cyo* und *TM6B* (aus subjektiver Perspektive des Autors dieser Arbeit ist *TM6B* schneller zu identifizieren als *TM2*) besitzen.



Schritt 8:

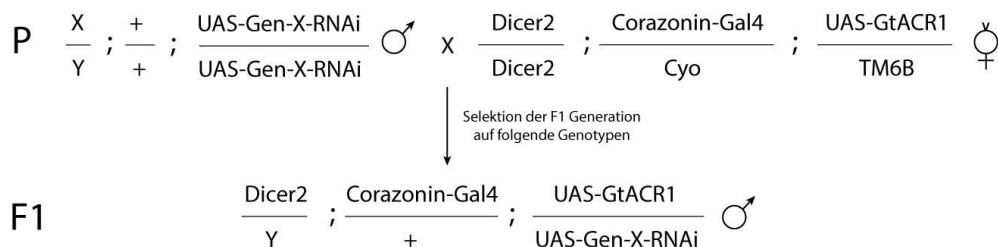
In diesem Schritt werden die zuvor gesammelten *hs-hid* / Dicer-2 / Corazonin-Gal4 / UAS-GtACR1 Männchen zu ebenfalls gesammelten weiblichen Dicer-2 / Corazonin-Gal4 / UAS-GtACR1 Jungfrauen gekreuzt. Das Ergebnis dieser Kreuzung ist eine stabile

Fliegenlinie, welche bei Applikation eines Hitzeschocks Jungfrauen des passenden Genotyps in großer Zahl bereitstellt.



Schritt 9:

Diese Jungfrauen können in einem nächsten Schritt zu Männchen gekreuzt werden, welche auf ihren Chromosomen II oder III unterschiedliche UAS-RNAi-Transgene oder UAS-Überexpressions-Transgene exprimieren.



Die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung werden gegen Balancer selektiert und können, nachdem diese für mehrere Tage von Weibchen getrennt waren und mit Retinalhaltigem Futter gefüttert wurden, anschließend im Rahmen des optogenetischen Hochdurchsatz-Screening getestet werden. Bei der Beladung der Test-Setups mit Testfliegen wurde der Autor dieser Arbeit durch die beiden Studentinnen Eliza Smith und Jingwen Ren unterstützt.

3.7.2. Generierung der Corazonin>ACR-Mosaik

Zur Herstellung genetischer Mosaik wurde in dieser Arbeit die CoinFlp-Gal4-Technik angewandt (Bosch et al., 2015). Diese Technik beruht auf der Konstruktion eines Transgens, in welchem der Transkriptionsfaktor Gal4 unter der Kontrolle des Actin5c Promotors abgelesen wird. Da der Actin5c Promotor ubiquitär aktiv ist, würde Gal4 in allen Zellen abgelesen werden, jedoch befindet sich stromaufwärts der Gal4 Sequenz ein STOP-Codon, welches die Expression von Gal4 verhindert. Das STOP-Codon wiederum wird von zwei Paaren unterschiedlicher flippase recognition targets (FRTs) flankiert: FRT und FRT3. Sowohl die kanonische FRT als auch die FRT3 wird von der FLP-Rekombinase mit gleicher Affinität erkannt, jedoch ist nur eine Rekombination zwischen zwei gleichen FRTs möglich, eine Rekombination zwischen einer FRT und einer FRT3-Stelle ist damit nicht möglich. Wird nun in einer Zelle die FLP-Rekombinase exprimiert, so wird diese mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% eine Rekombination zwischen den beiden FRT3-Stellen induzieren, was zu einer Exzision einer einzelnen FRT-Stelle, welche sich zwischen den beiden FRT3 Stellen befindet, führt. Da die FLP-Rekombinase in der Folge keine Rekombination zwischen den beiden FRT-Stellen mehr durchführen kann (eine FRT-Stelle wurde im Rahmen der Rekombination zwischen den FRT3-Stellen entfernt), bleibt das STOP-Codon bestehen und Gal4 wird nicht abgelesen. Führt die FLP-Rekombinase dagegen eine Rekombination zwischen den beiden kanonischen FRT-Stellen durch, so kommt es neben der Exzision einer FRT3-Stelle auch zur Entfernung des STOP-Codons, was zur Folge hat, dass nun der Transkriptionsfaktor Gal4 abgelesen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CoinFLP-Technik in den Crz-Neuronen angewandt, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% den optogenetischen Chloridkanal GtACR1 in jedem einzelnen Neuron zu exprimieren.

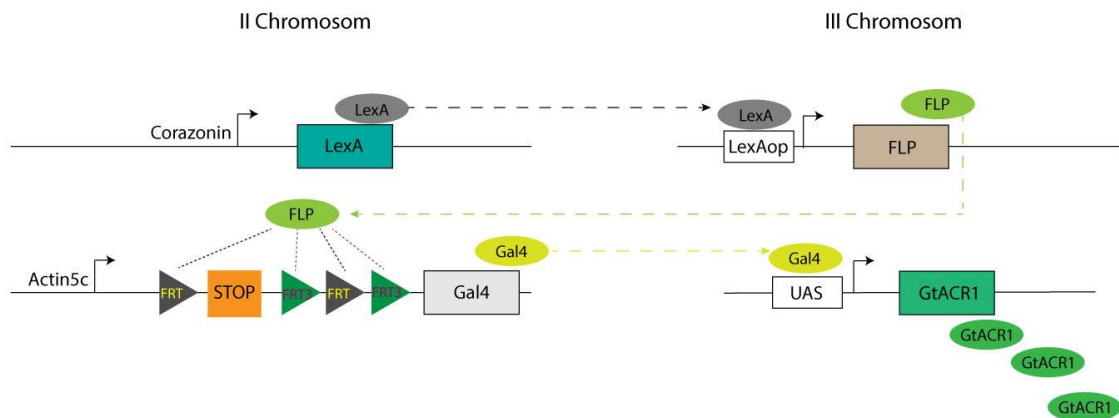


Abbildung 8. Das CoinFLP-System

Schema zur Funktionsweise des CoinFLP-Systems

Dies wurde dadurch erreicht, dass ausschließlich in Crz-exprimierenden Zellen der Transkriptionsfaktor LexA (Lai & Lee, 2006) (siehe oben) exprimiert wurde. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an eine LexAop-FLP-Rekombinase-Sequenz, was zu einer Expression der FLP-Rekombinase in allen Crz-exprimierenden Zellen führt. Die FLP-Rekombinase entfernt daraufhin mit 50%iger Wahrscheinlichkeit in den Crz-exprimierenden Zellen das STOP-Codon vor dem Transkriptionsfaktor Gal4. Wird der Transkriptionsfaktor Gal4 abgelesen, so bindet dieser an eine UAS-GtACR1-Sequenz was zum Ablesen des Chloridkanals und nachfolgend dessen Einbau in die Plasmamembran führt.

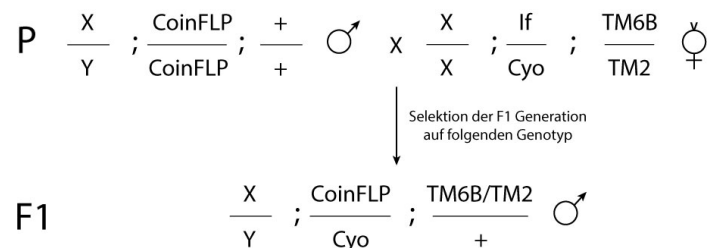
Um die CoinFLP-Technik in den Crz-Neuronen zur Anwendung zu bringen, müssen in einer Fliegenlinie vier Transgene kombiniert werden:

1. Der Transkriptionsfaktor LexA unter der Kontrolle des Crz-Promotors (Thornquist et al., 2020)
2. Der durch grünes Licht aktivierbare Chloridkanal GtACR1 (Mohammad et al., 2017) unter der Kontrolle einer upstream activating sequence (UAS)
3. Das CoinFLP-Gal4-Transgen (Bosch et al., 2015)
4. Die Flippase Rekombinase (FLP) unter der Kontrolle einer LexAop-Sequenz (Lai & Lee, 2006)

Die nachfolgend aufgeführten Kreuzungsschritte sollen darstellen, wie diese vier Transgene in einer Fliege kombiniert wurden:

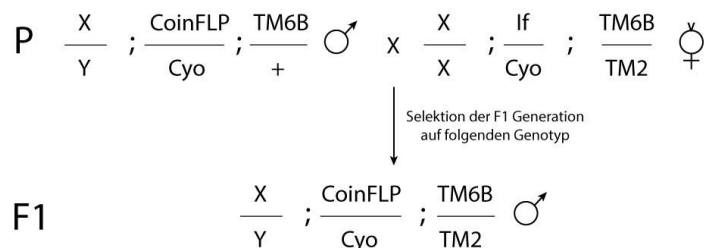
Schritt1:

Balancing des CoinFLP-Gal4-Transgens. Die CoinFLP-Gal4-Transgen beherbergende Fliege wird mit einer „Double-Balancer-Fliege“, welche die 3 Balancer Cyo (Chromosom II), TM6B (Chromosom III) sowie TM2 (Chromosom III) sowie den Marker If (Chromosom II) besitzt, gekreuzt. Es werden solche Nachkommen der F1 Generation selektiert, welche die phänotypischen Zeichen der Balancer Cyo (~50%) sowie entweder der Balancer TM2 oder TM6B tragen (100%).



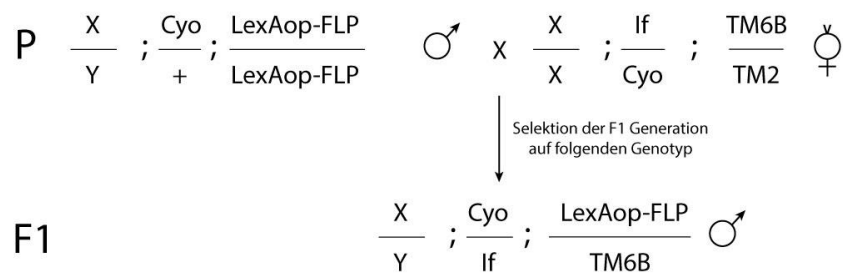
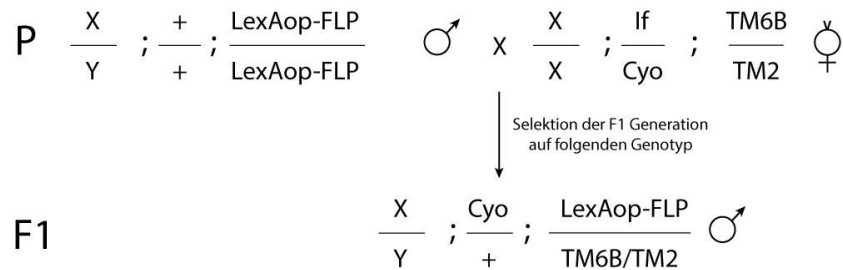
Schritt2:

Zweite „Balancing-Kreuzung“. Die nun einfach gebalancete CoinFLP-Gal4 Fliege wird erneut mit einer „Double-Balancer-Fliege“ gekreuzt. Es werden solche Nachkommen der F1 Generation selektiert, welche die phänotypischen Zeichen der Balancer Cyo sowie sowohl des Balancers TM2 als auch des Balancers TM6B tragen.



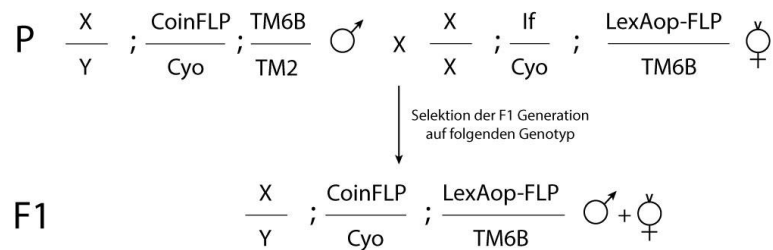
Schritt 3:

Die LexAop-FLP-Transgen enkodierende Fliege wird ebenfalls doppelt „gebalanciert“.



Schritt 4:

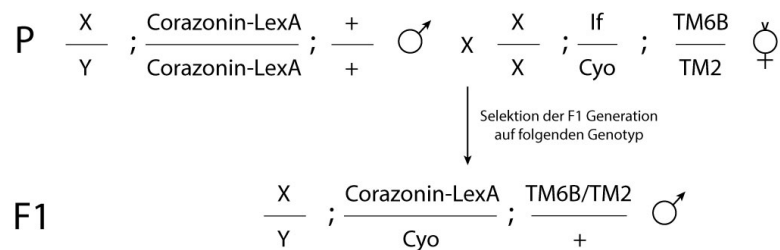
In einem nächsten Schritt können das CoinFLP-Gal4 Transgen sowie das LexAop-FLP-Transgen in einer Fliege kombiniert werden, indem die beiden doppelt gebalancierten Fliegenlinien zueinander gekreuzt werden. Anschließend werden nur solche Männchen sowie weibliche Jungfrauen der F1 Generation selektiert, welche ausschließlich die Balancer für Cyo (gebogene Flügel) sowie entweder TM6B (vermehrte Haare am oberen seitlichen Thorax sowie oftmals gedrungener Körper) oder TM2 (verkürzte und rundere Haltere (Schwingkölbchen)) aufweisen. Die gesammelten Männchen und weiblichen Jungfrauen des passenden Genotyps werden anschließend miteinander gekreuzt, um daraus eine stabile Fliegenlinie zu kreieren.



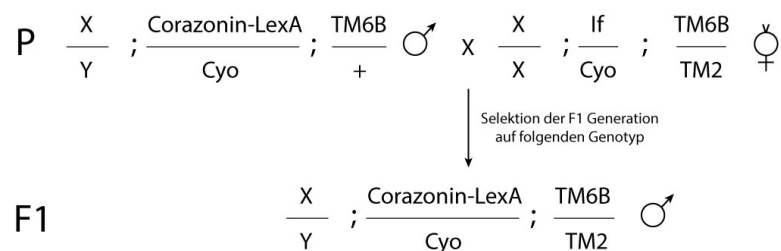
Schritt 5:

Die Crz-LexA-Transgen enkodierende Fliege wird ebenfalls doppelt „gebalanciert“.

Schritt 5.1:



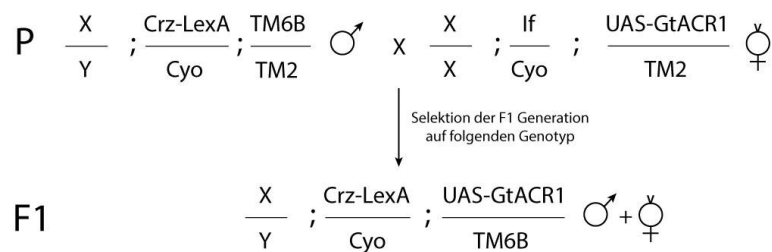
Schritt 5.2:



Schritt 6:

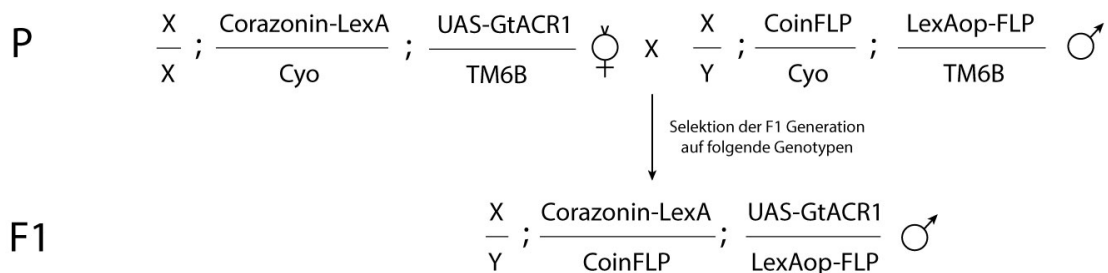
In einem nächsten Schritt können das Crz-LexA-Transgen sowie das UAS-GtACR1-Transgen in einer Fliege kombiniert werden, indem die beiden doppelt gebalancierten Fliegenlinien zueinander gekreuzt werden. Anschließend werden nur solche Männchen

sowie weibliche Jungfrauen der F1 Generation selektiert, welche ausschließlich die Balancer für Cyo (gebogene Flügel) sowie entweder TM6B (vermehrte Haare am oberen seitlichen Thorax sowie oftmals gedrungener Körper) oder TM2 (verkürzte und rundere Haltere (Schwingkölbchen)) aufweisen. Auch hier werden die gesammelten Männchen und weiblichen Jungfrauen des passenden Genotyps anschließend miteinander gekreuzt, um daraus eine stabile Fliegenlinie zu kreieren.



Schritt 7:

In diesem letzten Schritt werden entweder weibliche Jungfrauen der CoinFLP-Gal4 / LexAop-FLP Linie zu Männchen der Crz-LexA / UAS-GtACR1 Linie oder aber weibliche Jungfrauen der Crz-LexA / UAS-GtACR1 Linie zu Männchen der CoinFLP-Gal4 / LexAop-FLP Linie gekreuzt. Die männlichen Nachkommen der F1 Generation werden anschließend gegen das Vorhandensein von Balancer-Chromosomen selektiert und für mehrere Tage von Weibchen isoliert sowie Retinal-haltigem Futter exponiert. Im Anschluss daran können diese Männchen hinsichtlich ihrer genetischen Mosaikete getestet werden.



3.8. FRET-FLIM-Mikroskopie

Die Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) ist ein bildgebendes Verfahren, welches eine quantitative Aussage darüber erlaubt, welcher Anteil an FRET-Donor-Molekülen innerhalb eines räumlich auflösbaren Volumenelements mit FRET-Akzeptor-Molekülen interagiert (Liput et al., 2020; Verveer et al., 2000).

Die quantitative Aussagekraft dieses Verfahrens beruht dabei auf der Messung der Fluoreszenzlebensdauer. Wird ein Fluorophor, z.B. GFP, energetisch angeregt, so emittiert es die aufgenommene Energie entweder in Form eines Photons oder aber in Form von Vibration (Wärmeabgabe). Das energetisch angeregte Fluorophor emittiert die absorbierte Energie jedoch nicht sofort, sondern erst mit einer definierten Latenz. Diese Latenz, welche eine Fluorophorspezifische Eigenschaft ist, ist die Fluoreszenzlebensdauer τ (τ). Sie ist umgekehrt proportional zu der Zerfallsrate der strahlenden (Photonenabgabe, Γ) und nicht-strahlenden (Vibration, k_{NR}) Prozesse:

$$\tau_D = \frac{1}{k_{NR} + \Gamma}$$

Handelt es sich bei dem Fluorophor jedoch um einen FRET-Indikator, so hat das energetisch angeregte Donor-Fluorophor neben der Photonenaussendung und der Vibration eine weitere Möglichkeit, den energetischen Grundzustand wiederherzustellen. Die Energie kann mittels Förster-Resonanzenergietransfer auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen werden, wodurch sich die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors verkürzt:

$$\tau_D = \frac{1}{k_{NR} + \Gamma} > \frac{1}{k_{NR} + \Gamma + k_{FRET}} = \tau_{FRET}$$

Am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten FLIM-Indikators Camu α (S.-J. R. Lee et al., 2009) ist die Fluoreszenzlebensdauer von Camu α also niedriger, wenn es zwischen

dem FRET-Donor, monomeric enhanced green fluorescent protein (mEGFP), und dem FRET-Akzeptor, REACh, einer nicht-strahlenden YFP Variante, zu einem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) kommt. Dies ist dann der Fall, wenn die Kinase-Domäne von Camu α nicht exponiert ist, da sich dann der Akzeptor sowie der Donor in größerer räumlicher Nähe befinden, was das Auftreten von FRET begünstigt – ist CaMKII also inaktiv, so ist die Fluoreszenzlebensdauer des Indikators Camu α niedriger als bei aktiver CaMKII (S.-J. R. Lee et al., 2009).

Sowohl die Fluoreszenzlebensdauer des Donors als auch die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in der Interaktion mit dem Akzeptor (was FRET ermöglicht) ist vor dem Beginn der Messung bekannt. Werden also z.B. die Camu α -Moleküle in einem Crz-Neuron durch einen Laser energetisch angeregt, so wird ein Anteil a der Camu α -Moleküle Photonen nach der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_D und ein Anteil b Photonen nach der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_{DA} aussenden. Auf der Grundlage der gemessenen Photonenankunftszeiten und dem a-priori Wissen über die Fluoreszenzlebensdauern des Donors mit und ohne FRET kann somit der Anteil an Donor-Molekülen bestimmt werden, welcher über den FRET mit dem Akzeptor interagiert, auf dessen Grundlage man wiederum den Anteil an CaMKII-Molekülen ableiten kann, deren Kinase-Domäne aktiv ist.

Details zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer können im Appendix gefunden werden.

Da sich die Aussagekraft der FRET-FLIM-Messung auf den relativen Anteil der Moleküle bezieht, welcher FRET zeigt, ist diese sowohl von der Konzentration der Fluorophore als auch der Länge des Lichtpfades unabhängig (Bastiaens & Squire, 1999), welche schwer zu kontrollierende Parameter darstellen. Dies ermöglicht eine quantitative Aussage bezüglich des Anteils aktiver CaMKII-Moleküle, was die Aussagekraft unterschiedlicher Bildgebungsproben aufgrund besserer Vergleichbarkeit zwischen den Proben (z.B. im Vergleich zur intensitätsbasierten Kalziumbildgebung mittels GCaMP) deutlich erhöht.

3.9. Statistik

Alle Daten der vorliegenden Arbeit wurden einer rigorosen statistischen Analyse unterzogen. Bei der Auswahl und Durchführung der Analysen wurde der Verfasser von

Dr. Thornquist beraten und unterstützt. Die Skripte zur statistischen Analyse der Daten wurden von Dr. Thornquist geschrieben.

3.9.1. Prinzipielles Vorgehen

Die statistische Herangehensweise, welche bezüglich der Daten im Ergebnisteil dieser Arbeit gewählt wurde, beruht auf dem Ansatz der Bayesschen Statistik, da diese den von uns durchgeführten Inferenzverfahren eher entspricht. Aus diesem Grund entsprechen alle gezeigten Intervalle der Masse der Posterior-Verteilung für die abgeleiteten Modellparameter.

Dies ist darin begründet, dass der Bayessche Ansatz eher Rückschlüsse auf die Werte von Deskriptoren unseres Modells zulässt (z. B. in unseren Daten die Wahrscheinlichkeit der Beendigung der Paarung als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus) als dass er die Übereinstimmung eines Datensatzes mit einem bestimmten Wert, den das Modell annehmen könnte, bestimmt.

Aufgrund dieses Ansatzes ist es uns möglich, statistische Aussagen über unsere Einschätzung der Größenordnung der Effekte zu machen, anstatt ihre Abweichung von der Nullhypothese anzugeben. Da der frequentistische Ansatz jedoch gebräuchlicher ist, werden die Daten in einer Weise präsentiert werden, die so weit wie möglich mit der gängigen frequentistischen Berichterstattung und Hypothesenprüfung übereinstimmt. So werden nicht-informative a-priori-Verteilungen (Jaynes, 1968) verwendet, welche im Fall der Schätzung der Variabilität der Mittelwerte der üblichen zentralen Grenzwertstatistik entsprechen, welche sich jedoch bei der Einschätzung von Proportionen von dieser unterscheiden.

Da die in dieser Arbeit berichteten Effekte sehr groß sind, ist diesbezüglich festzuhalten, dass die angewandte statistische Herangehensweise die Ergebnisse bzw. deren Interpretation in keiner Weise beeinflusst, sodass dieser statistische Ansatz vor allen Dingen dem philosophischen Standpunkt des Labors entspricht, in dem diese Arbeit angefertigt wurde.

3.9.2. Glaubwürdigkeitsintervalle für Proportionen

Alle Proportionen werden als Bernoulli-Zufallsprozesse modelliert, wobei die Wahrscheinlichkeit durch p und die Stichprobenschätzung für die Proportion p als \hat{p}

ausgedrückt wird (dabei gilt $(\hat{p} = x/n$, x steht für die Anzahl der beobachteten „Erfolge“ und n für die Gesamtzahl der Beobachtungen; der „maximum likelihood estimate“ wurde anstelle des „maximum posterior estimate“ gewählt, um eine größere Konsistenz zwischen unserer Datenpräsentation und der Standard-Datenpräsentation herzustellen). Dieser so bestimmte Punkt wird durch ein 68% Glaubwürdigkeitsintervall umgeben, welches dadurch bestimmt wird, dass Stichproben aus der posterioren Verteilung mittels des „Metropolis-Hastings Algorithmus“ (Markov Chain Monte Carlo) und des nichtinformativen „Jeffreys Prior“ $\pi(p) = 1/\sqrt{p(1-p)}$ gezogen werden, sodass auf der Basis dieser statistischen Einschätzung der posterioren Verteilung ein 16-84% Intervall ermittelt werden kann. Der „Jeffreys prior“ wurde ausgewählt, da dieser sich auch bei Reparameterisierungen kaum ändert (Jeffreys, 1945), sodass dieser auch dann konsistente Ergebnisse bezüglich der posterioren Verteilungen liefert, wenn das Inferenzproblem invertiert oder transformiert wird. Das Intervall, welches auf diese Art und Weise bestimmt wird, ermöglicht auch eine numerische Einschätzung des 68% Konfidenzintervalls, wie es im Rahmen des gängigeren statistischen Vorgehens bestimmt wird.

3.9.3. Bestimmung eines lang andauernden und eines normal langen Paarungsaktes

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes experimentelles Paradigma zu einem lang andauernden Paarungsakt führt, wurde mit Hilfe eines hierarchischen Bayesschen Modells geschätzt:

Für einen bestimmten Zeitpunkt t wurde die posteriore Verteilung des Parameters p im Rahmen eines Bernoulli Prozesses geschätzt, was wiederum dazu genutzt wurde, jene posterioren Verteilungen auszuwählen, mit welchen man den Mittelwert und die Varianz der Gaußschen Verteilung ermitteln konnte, aus der die Kopulationsdauer einer einzelnen Fliege abgeleitet wurde:

$$x_n \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$$

$$\mu \sim \mathcal{N}\left(\bar{\mu}_k, \frac{\bar{\sigma}_k^2}{N_k}\right)$$

$$\sigma^2 \sim \bar{\sigma}_k^2 \chi_{N_k}^2$$

$$k \sim \text{Ber}(p_t)$$

Hier stellen $\bar{\mu}_0$ und $\bar{\sigma}_0^2$ den Durchschnitt und die Varianz der Experimente „ohne Licht“ dar und $\bar{\mu}_1$ und $\bar{\sigma}_1^2$ den Durchschnitt und die Varianz der Experimente mit „Licht von Beginn an“. N_k wiederum repräsentiert die Größe dieser Proben. Der Prior für p_t folgt einer Beta-Verteilung, wobei gilt, dass $\alpha=\beta=0,5$ (Jeffrey-Prior), wobei die Markov Chain Monte Carlo Simulation verwendet wurde, um die posteriore Verteilung von p_t zu schätzen. Daraufhin wurde das Maximum des *a posteriori* Werts für p_t sowie das 68% Glaubwürdigkeitsintervall geplottet.

Eine ähnliche Vorgehensweise wurde ebenfalls bei den „Disinhibitionsfenster“-Experimenten gewählt, in welchen die Inhibition mittels GtACR1 10 Minuten nach dem Beginn des Paarungsaktes aufgehoben wurde. Im Durchschnitt paaren sich diese Fliegen für weitere 18 Minuten, wobei Fliegen, deren Crz-Neurone eben jene Lockerung der Inhibition nach 10 Minuten nicht erfahren, sondern stattdessen weiter inhibiert werden, sich noch mindestens eine weitere Stunde lang paaren würden. Eben jene Fliegen, deren Inhibition nach 10 Minuten aufgehoben wurde, wurden dazu verwendet, den Prior für $\bar{\mu}_0$ und $\bar{\sigma}_0^2$ zu bestimmen (anstelle der Fliegen, welche gar keine Inhibition erfahren haben („ohne Licht“ Experimente)).

3.9.4. Hypothesentestung an Verhältnissen

Zur Testung der Hypothese, dass die Verhältnisse zweier Stichproben aus demselben Bernoulli-Prozess abgeleitet wurden, wurde der „Fisher’s exact test“ verwendet.

3.9.5. Glaubwürdigkeitsintervalle von Mittelwerten

Der Standardfehler des Mittelwerts zur Einschätzung der Variabilität eines Stichprobenmittelwerts wurde mittels der Formel $SEM = \hat{\sigma}/\sqrt{N}$ berechnet, wobei $\hat{\sigma}^2$ den unvoreingenommenen Schätzer der Stichprobenvarianz sowie N die Stichprobengröße repräsentiert, was dem 68% Glaubwürdigkeitsintervall des Stichprobenmittelwerts unter Verwendung des „improper uniform prior“ entspricht.

3.9.6. Hypothesentests an Verteilungen

Für Unterschiede in der Verteilung von Kopulations-Zeitspannen wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Dabei wurden unsere Kriterien für statistische Signifikanz mittels der Holm-Bonferroni Korrektur auf Mehrfachvergleiche korrigiert, wobei die Anzahl der Hypothesen der Anzahl der möglichen Vergleichspaare entspricht ($n(n - 1)/2$).

3.9.7. Evidenzakkumulation

Die Evidenzakkumulation mit dem Zyklus t wurde wie folgt definiert:

$$x_t = \alpha \zeta_t - \eta_t$$

Dabei repräsentiert ζ_t jene positive Evidenz, welche während der Dunkelphase (Unterbrechung der GtACR1 vermittelten Inhibition) akkumuliert ist. Die negative Evidenz, welche während der Helligkeitsphasen akkumuliert (GtACR1 vermittelte Inhibition), wird durch η_t repräsentiert. α stellt einen Skalierungsfaktor dar. Sowohl ζ_t als auch η_t weisen eine exponentielle Verteilung auf, wobei μ den Mittelwert von ζ_t und $\mu f / (1 - f)$ den Mittelwert von η_t darstellt, wobei f denjenigen durchschnittlichen Anteil eines Zyklus repräsentiert, während dessen das Licht an und daher eine GtACR1 vermittelte Inhibition gegeben ist.

Die Exponentialverteilungen wurden aus dem Grund gewählt, da sie, bei gegebenem Mittelwert, am meisten der Maximum-Entropie-Methode entsprechen und somit in gewissem Sinne maximal ungeordnet sind. Konkret bedeutet das:

$$p(\zeta_t = x) = \frac{1}{\mu} e^{-x/\mu}$$
$$p(\eta_t = x) = \frac{1-f}{\mu f} e^{-x/\mu \left(\frac{1-f}{f}\right)}$$

So hat die während eines Versuchs x_t akkumulierte Evidenz folgende Verteilung:

$$p(x_t = z) = \int_0^{\infty} p(\zeta_t = s) p(\eta_t = \alpha s - z) \Theta(\alpha s - z) ds$$

Wobei $\Theta(x)$ die "Heaviside theta function" $\Theta(x) = 0$ wenn $x < 0$ und andernfalls $\Theta(x) = 1$ repräsentiert. Die obige Formel kann ebenfalls so dargestellt werden:

$$\frac{1-f}{\mu^2 f} \int_0^{\infty} \Theta(\alpha s - z) e^{-s/\mu} e^{-\frac{\alpha s - z}{\mu} \left(\frac{1-f}{f}\right)} ds$$

Oder auch so:

$$\frac{1-f}{\mu^2 f} e^{\frac{z}{\mu} \left(\frac{1-f}{f}\right)} \int_0^{\infty} \Theta(\alpha s - z) e^{-s/\mu \left(1 + \alpha \left(\frac{1-f}{f}\right)\right)} ds$$

Falls nun $z < 0$, dann entspricht θ der Zahl 1, sodass sich daraus Folgendes ergibt:

$$p(x_t = z) = \frac{1-f}{\mu(f + \alpha(1-f))} e^{\frac{z}{\mu} \left(\frac{1-f}{f}\right)} \quad (z < 0)$$

Falls jedoch $z \geq 0$, so werden die Grenzen des Integrals geändert, sodass sich Folgendes ergibt:

$$p(x_t = z) = \frac{1-f}{\mu^2 f} e^{\frac{z}{\mu} \left(\frac{1-f}{f}\right)} \int_{z/\alpha}^{\infty} e^{-s/\mu \left(1 + \alpha \left(\frac{1-f}{f}\right)\right)} ds = \frac{1-f}{\mu(f + \alpha(1-f))} e^{-\frac{z}{\alpha\mu}} \quad (z \geq 0)$$

sodass

$$p(x_t = z) = \frac{1}{\mu \left(\alpha + \frac{f}{1-f}\right)} \begin{cases} e^{z/\mu \left(\frac{1-f}{f}\right)} & (z < 0) \\ e^{-\frac{z}{\alpha\mu}} & (z \geq 0) \end{cases}$$

Wenn nun φ als $\varphi = \frac{f}{1-f}$ definiert wird, so vereinfacht das die obige Funktion, welche nun so ausgedrückt werden kann:

$$(x_t = z) = \frac{1}{\mu(\alpha + \varphi)} \begin{cases} e^{\frac{z}{\mu} \varphi} & (z < 0) \\ e^{-\frac{z}{\alpha\mu}} & (z \geq 0) \end{cases}$$

Die Evidenzakkumulation folgt also folgendem Muster:

$$X_T = \begin{cases} x_t + X_{T-1} & \text{wenn } x_t + X_{T-1} \geq 0 \\ 0 & \text{andernfalls} \end{cases}$$

Wobei X_T die akkumulierte Evidenz zum Zeitpunkt T repräsentiert und x_t die unabhängig und identisch (i.i.d.) verteilten Zufallsvariablen darstellt.

Daraufhin wurde ein Schwellenwert θ festgelegt und die Verteilung der Zufallsvariablen $t_{\text{accum}} = \inf\{t \mid X_t \geq \theta\}$ dadurch numerisch abgeschätzt, dass für jede einzelne simulierte Fliege 1000 Werte für x_t generiert wurden, basierend auf der obig beschriebenen Wahrscheinlichkeitsverteilung und der Messung von t_{accum} pro Fliege.

Die simulierte Kopulationsdauer wurde dann wie folgt geschätzt:

$$d = 6 + t_{\text{accum}} + 18z$$

Wobei $z \sim \mathcal{N}(0,9)$ eine normale Zufallsvariable repräsentiert, welche auf Grundlage der Daten aus der Abbildung 44 geschätzt wurde (die Zahl 9 entspricht dem durchschnittlichen σ aus der Abbildung 44). Die Zahl 18 wiederum entspricht der mittleren Latenz zwischen der Eruption und der Beendigung des Paarungsvorgans und die Zahl 6 entspricht der Zeit, welche CaMKII ungefähr benötigt, um, nach Beginn der Paarung, wieder dessen Ausgangsaktivitätsniveau zu erreichen.

Generelles zu den Abbildungen: N-Werte sowie die statistischen Analysen sind im Appendix aufgelistet. Die Fehlerbalken, falls nicht anders angemerkt, entsprechen 68% Glaubwürdigkeitsintervallen, welche dem klassischen SEM ähneln.

4. Ergebnisteil

4.1. Die Corazonin-Neurone besitzen ein Äquivalent akkumulierter neuronaler Information auf Minutenebene

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit stellt das in der Einleitung beschriebene Phänomen des "Crz-Fensters" dar, also die Eigenschaft der Crz-Neurone, elektrische Aktivität mit einer definierten Verzögerung im Minuten-Bereich (60 bis 90 Sekunden) in ein Ausgabe-Signal zu verwandeln.

Da Neurone ihre elektrische Aktivität normalerweise auf Zeitskalen im Millisekundenbereich entfalten, stellte dieses für Neurone ungewöhnlich lange Aktivierungsintervall ein uns und der Literatur unbekanntes Phänomen dar. Das Studium dieses Phänomens wurde als Thema der vorliegenden Dissertation gewählt. Am Beginn der Arbeiten war es dafür notwendig, das von Dr. Thornquist beschriebene Crz-Fenster (Thornquist et al., 2020) näher zu charakterisieren

Eine der Konsequenzen der Aktivität der Crz-Neurone ist das Umlegen des motivationalen Schalters. Werden die Crz-Neurone während der gesamten Dauer der Paarung mittels GtACR1 durch grünes Licht inhibiert, so wird dieser motivationale Schalter nie umgeworfen, was zu langen Paarungsdauern von mindestens einer Stunde führt. Wird den Crz-Neuronen dagegen ein zeitgerechtes Umlegen des motivationalen Schalters erlaubt, werden die Crz-Neurone also nicht inhibiert, so dauern die Paarungen im Durchschnitt etwa 23 Minuten, nie jedoch länger als 35 Minuten an. Anhand der Paarungsdauer der Fliegen kann daher also entschieden werden, ob die Crz-Neurone aktiv geworden sind oder nicht.

Für die Messung der Dauer des Crz-Fensters wurde die GtACR1 vermittelte Inhibition für eine beliebige Zeitspanne nach Ablauf der CaMKII-Zeitmesser (beispielsweise 10 Minuten nach Beginn der Paarung) pausiert, die Crz-Neurone also disinhibiert und ihnen ermöglicht, für eine definierte Dauer elektrisch aktiv zu werden. Nach Ablauf dieser definierten Zeitspanne wurden die Crz-Neurone wieder für den Rest der Paarungsdauer inhibiert (**Abbildung 9**).

Wurde die elektrische Aktivität für weniger als 50 Sekunden zugelassen, so führte dies fast nie zu einem Umlegen des motivationalen Schalters, die Fliegen paarten sich also

für eine lange Zeit. Betrug das Disinhibitionsfenster dagegen mehr als 75 Sekunden, so wurde das Crz-Signal fast immer abgegeben, die Fliegen beendeten also die Kopulation mit einer Latenz von etwa 18 Minuten und damit innerhalb einer normalen Zeitspanne (**Abbildung 9**).

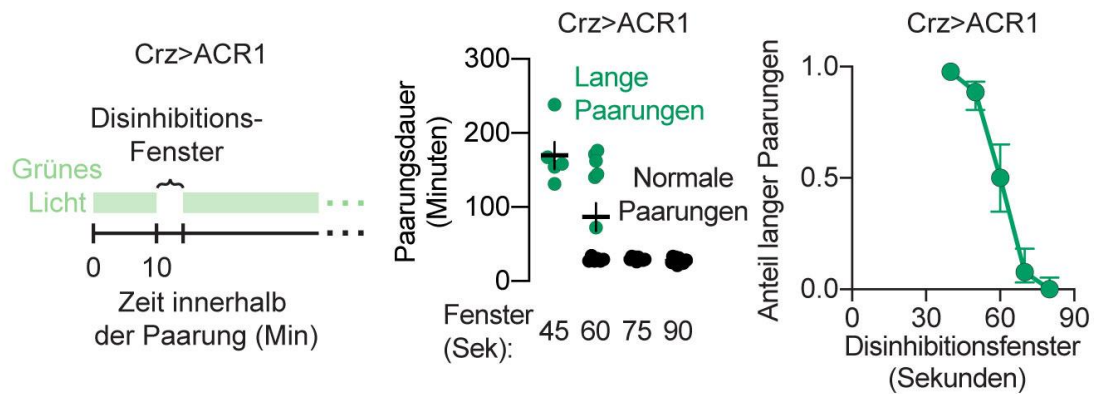


Abbildung 9. Charakterisierung des Corazonin-Fensters

Paarungsdauer jener Fliegen, deren Crz-Neurone Disinhibitionsfenster variabler Länge zum Zeitpunkt 10 Minuten nach Beginn der Paarung erfahren. Mit Ausnahme der Disinhibitionsfenster werden die Crz-Neurone für die gesamte Dauer der Paarung inhibiert (Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls links) Die abgebildeten Daten zeigen, dass die Crz-Neurone mindestens 60 – 75s Sekunden an elektrischer Aktivität benötigen, um die Paarungen zu einem normalen Zeitpunkt enden zu lassen (~23 Minuten). Wird ein kürzeres Disinhibitionsfenster appliziert, so ist die Paarungsdauer deutlich verlängert (>1 Stunde) (grün) (Mitte und rechts). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die Crz-Neurone benötigten also ein circa 70 Sekunden bemessendes Fenster an erlaubter elektrischer Aktivität, um den motivationalen Schalter umlegen zu können. Doch was ist das physiologische Korrelat dieser für Neurone extrem langen Zeitspanne?

Da sich das Crz-Fenster durch die benötigte Zeitdauer definiert, während derer die Crz-Neurone nicht elektrisch inhibiert sind, wäre eine naheliegende Möglichkeit, dass die Crz-Neurone während dieser Zeitspanne elektrische Aktivität akkumulieren. Um dies zu testen, wurden zwei Disinhibitionsfenster von 50 Sekunden Länge, welche durch eine 1-minütige Inhibitionsperiode getrennt waren, appliziert. Würden die Crz-Neurone während der einzelnen Fenster also elektrische Aktivität akkumulieren, so würde all jene elektrische Information, welche während des ersten 50 Sekunden Fensters akkumuliert wäre, durch die 1-minütige Inhibitionsperiode ausgelöscht werden. Die Akkumulation müsste zum Zeitpunkt des zweiten 50 Sekunden Fensters also von Neuem beginnen. Da jedes einzelne 50 Sekunden Fenster für sich genommen nicht ausreicht, um den

motivationalen Schalter umzulegen, wäre dementsprechend zu erwarten, dass alle Kopulationen lange andauern. Tatsächlich konnte jedoch das Gegenteil beobachtet werden, da alle Fliegen, welche zwei durch eine 1-minütige Inhibition getrennte 50 Sekunden andauernde Disinhibitionsfenster erfuhren, die Paarung zu einem normalen Zeitpunkt beendeten (**Abbildung 10**).

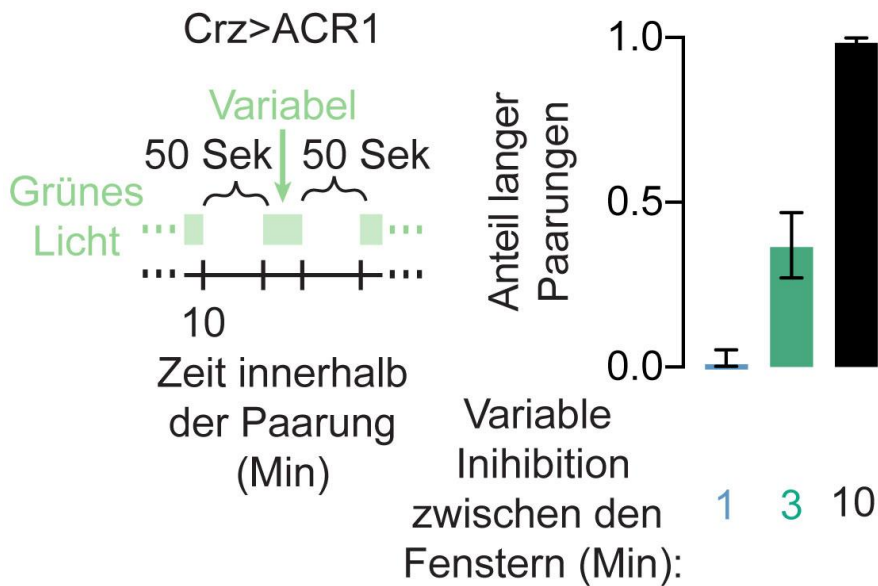


Abbildung 10. Die während eines Disinhibitionsfensters akkumulierte Information nimmt während einer Inhibition nur langsam ab

Links: Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls: Erneute Inhibition der Crz-Neurone für die gesamte Dauer der Paarung, mit Ausnahme zweier Disinhibitionsfenster von 50 Sekunden Länge. Die 50 Sekunden-Fenster sind von entweder 1 Minute (blau), 3 Minuten (grün) oder 10 Minuten (schwarz) an Inhibition voneinander getrennt. Aufgetragen ist derjenige Anteil der Fliegenpaarungen, deren Paarungsdauer als „lang“ klassifiziert werden kann (>1 Stunde).

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das funktionelle Korrelat des etwa 70 Sekunden bemessenden Disinhibitionsfensters nicht die kontinuierliche Akkumulation elektrischer Aktivität ist, sondern vermutlich eher in der Akkumulation und Speicherung biochemischer Information innerhalb der Crz-Neurone gefunden werden kann.

Die während des ersten 50 Sekunden Fensters akkumulierte Information schien dabei auch nach einer Ausdehnung der intermittierenden Inhibition auf 3 Minuten noch in

Teilen präsent zu sein, da auch dieses experimentelle Vorgehen in über der Hälfte der Fälle zu normalen Kopulationsdauern führte. Eine Ausweitung der intermittierenden Inhibition auf 10 Minuten dagegen führte zu ausschließlich langen Kopulationen, was bei zwei voneinander unabhängigen Disinhibitionsfenstern dieser Länge zu erwarten wäre (**Abbildung 10**).

Die Crz-Neurone sind also in der Lage, elektrische Aktivität in ein anderes, vermutlich biochemisches Äquivalent neuronaler Informationsspeicherung zu überführen, welches auch während einer Hyperpolarisation der Neurone für mehrere Minuten überdauert und damit eine Art neuronales Kurzzeitgedächtnis ausbildet.

4.2. Das Äquivalent akkumulierter neuronaler Information in den Corazonin-Neuronen ist cAMP

Mit dem Ziel, das Äquivalent eben jener neuronaler Informationsspeicherung zu identifizieren, wurde daher in der vorliegenden Arbeit ein optogenetischer Hochdurchsatz-Screening-Assay entwickelt, mittels dessen es möglich ist, täglich Dutzende genetische Manipulationen in den Crz-Neuronen durchzuführen und diese dem optogenetischen Test-Setup zuzuführen. Zweck des Screens war die Suche nach Genen, deren Überexpression oder Herunterregulation zu einer Verkürzung oder Verlängerung des notwendigen optogenetischen Disinhibitionsfensters führt (**Abbildung 11**).

Um eine Hochdurchsatztestung zu ermöglichen, wurde zunächst gezeigt, dass die Länge des Disinhibitionsfensters konstant ist, solange dieses nach dem Aktivitätsverlust von CaMKII, also etwa nach Minute 8 der Paarung appliziert wird (**Abbildung 11**).

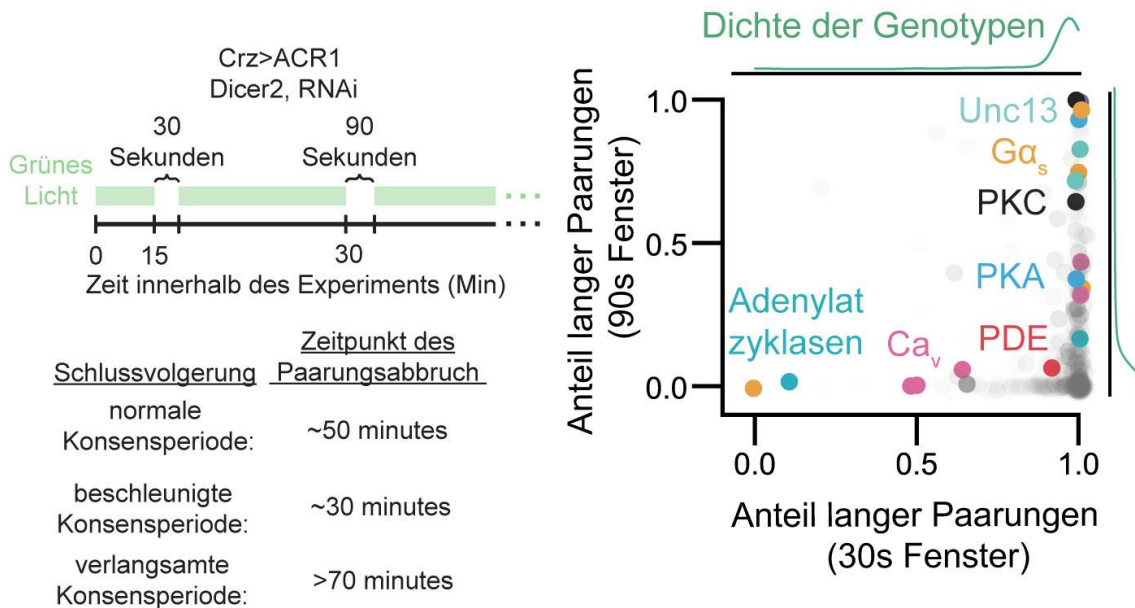


Abbildung 11. Der optogenetische Hochdurchsatz-Screen von 1388 genetischen Manipulationen in den Crz-Neuronen identifizierte circa 30 Hits in mehreren prominenten second messenger Signalwegen

Links: Screening-Protokoll, welches ermöglicht, sowohl auf eine Verkürzung als auch auf eine Verlängerung des benötigten Disinhibitionsfensters zu testen. Es wurden nur solche Paarungen hinsichtlich des 30 Sekunden Fensters gewertet, welche die Paarung mindestens 8 Minuten vor Beginn des 30 Sekunden Fensters begannen.

Rechts: Auftragung aller spezifisch in den Crz-Neuronen durchgeführten 1388 genetischer Manipulationen mittels eines grauen Punkts. Je dunkler die graue Farbe, desto mehr Punkte befinden sich übereinander. Genetische Manipulationen, welche zu einer Verkürzung des benötigten Disinhibitionsfensters führen, sind auf der rechten Abbildung unten links zu finden, da diese auch bei sonst nicht ausreichenden 30 Sekunden-Fenstern (X-Achse) zu normal langen Paarungen führen. Solche Manipulationen, welche zu einer Verlängerung des benötigten Disinhibitionsfensters führen, sind dagegen oben rechts zu finden, da diese auch bei sonst immer ausreichenden 90 Sekunden-Fenstern (Y-Achse) lange Kopulationsdauern aufweisen. Der Großteil aller Manipulationen, welcher sich unten rechts befindet, zeigt jedoch keine wesentliche Veränderung des Disinhibitionsfensters. Einige, für diese Arbeit besonders relevante, Screening-Hits sind farblich hervorgehoben und markiert.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Auf dieser Beobachtung aufbauend konnten daraufhin dutzende individuelle Fliegenpärchen (je ein Männchen und ein Weibchen) in kleine Kammern platziert werden, woraufhin ein großer Anteil dieser Fliegen, etwa 70%, innerhalb weniger Minuten mit der Paarung beginnt. Hierzu ist anzumerken, dass die einzelnen Kammern von ihrer Unterseite aus mit weißem Licht illuminiert werden, die Hyperpolarisation der Crz-Neurone also bereits vor dem Beginn der Paarung begonnen wird, was zwar keinen

nachweisbaren Einfluss auf die Eigenschaften dieser Neurone zu haben scheint (Thornquist et al., 2020), jedoch zugleich sicherstellt, dass der motivationale Schalter ausschließlich während der applizierten Disinhibitionsfenster umgelegt werden kann.

Etwa 15 Minuten nachdem die Fliegenpaare in die Kammern platziert wurden, wurde für alle diese Paare gleichzeitig das Licht für eine Dauer von 30 Sekunden abgeschaltet, was es den Crz-Neuronen erlaubt, für eine Zeitdauer von 30 Sekunden elektrisch aktiv zu werden, eine Zeitspanne, die normalerweise niemals ausreicht, um daraufhin den Paarungsakt zu beenden.

Die Hypothese ist jedoch, dass eine genetische Manipulation in den Crz-Neuronen, welche zu einer gesteigerten Signalakkumulation führt, durchaus dazu in der Lage wäre, die Fliegen frühzeitig, d.h. etwa 18 Minuten nach dem 30 Sekunden bemessenden Disinhibitionsfenster, die Paarung terminieren zu lassen. Da dies jedoch im Regelfall nicht zu erwarten ist, erfahren alle anderen Fliegen etwa 30 Minuten nach Versuchsbeginn ein weiteres, dieses Mal 90 Sekunden bemessendes Disinhibitionsfenster, welches normalerweise fast immer ausreichend ist, die Paarung innerhalb der nächsten ~18 Minuten zu beenden. Paart sich ein Fliegenpärchen jedoch auch 25 Minuten nach Applikation des 90 Sekunden Fensters noch, so wird angenommen, dass dies auf eine genetische Interaktion zurückzuführen ist, welche zu einer langsameren Signalakkumulation führt (**Abbildung 11**).

Mittels dieses neuartigen optogenetischen Screening-Ansatzes war es möglich, 1388 genetische Manipulationen spezifisch in den Crz-Neuronen vorzunehmen und dabei 22538 Fliegenpaare auf Veränderungen der Signalakkumulationsgeschwindigkeit zu testen. Die genetischen Manipulationen bestanden dabei zu einem Großteil aus RNAi vermittelten Gen-Stilllegungen und der Überexpression einzelner Gene, wobei präferenziell solche Gene bezüglich einer möglichen Rolle getestet wurden, welchen eine Funktion in der akuten Signaltransduktion zugeschrieben wird, z.B. Ionenkanäle, Kinasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, kalziumbindende Proteine, G-Proteine, synaptische Strukturproteine und viele mehr.

Von all diesen genetischen Manipulationen führten nur etwa 30 zu einer nennenswerten Veränderung der Signalakkumulation, wobei sich ein Großteil dieser Manipulationen dadurch auszeichnete, dass sie die Synthese, den Abbau, oder die Bindung des ubiquitär vorhandenen second messengers cAMP beeinflussen (**Abbildung 12**).

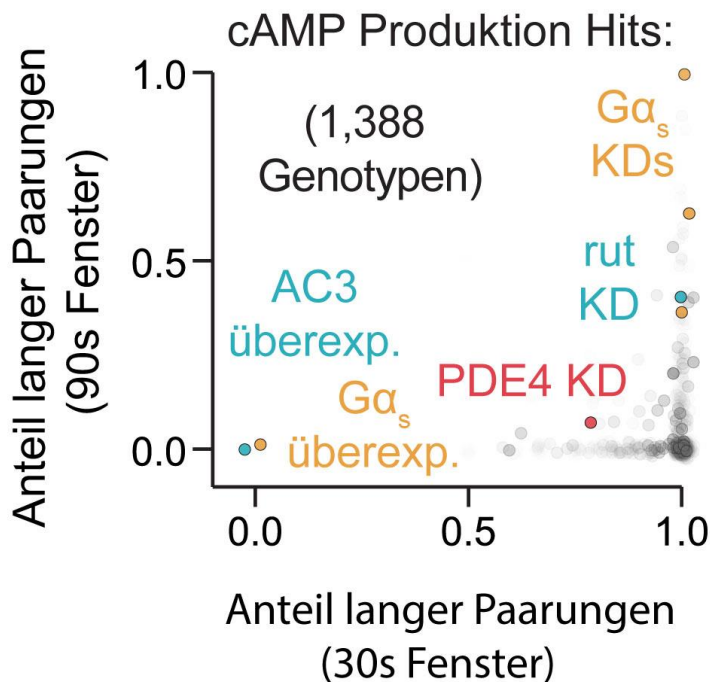


Abbildung 12. Beeinflussung des Crz-Fensters durch genetische Manipulationen im cAMP-Signalweg

Alle spezifisch in den Crz-Neuronen durchgeführten 1388 genetischen Manipulationen sind mittels eines grauen Punkts aufgetragen. Je dunkler die graue Farbe, desto mehr Punkte überlagern sich. Diejenigen genetischen Manipulationen, welche Auswirkungen auf den cAMP-Signalweg besitzen, sind farblich hervorgehoben und markiert: ($G\alpha_s$ = stimulatorische alpha-G-Protein-Untereinheit, rut = rutabaga (Adenylatzyklase), PDE4 = Phosphodiesterase 4, AC3 = Adenylatzyklase 3)

Genetische Manipulationen, welche zu einer Verkürzung des benötigten Disinhibitionsfensters führen, sind unten links zu finden, da diese auch bei sonst nicht ausreichenden 30 Sekunden-Fenstern (X-Achse) zu normal langen Paarungen führen. Diejenigen Manipulationen, welche zu einer Verlängerung des benötigten Disinhibitionsfensters führen, sind dagegen oben rechts zu finden, da diese auch bei sonst immer ausreichenden 90 Sekunden-Fenstern (Y-Achse) lange Kopulationsdauern aufweisen. Der Großteil aller Manipulationen, welcher sich unten rechts befindet, zeigt jedoch keine wesentliche Veränderung des Disinhibitionsfensters. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

cAMP wird durch Adenylatzyklasen aus ATP gebildet und durch Phosphodiesterasen abgebaut (Willoughby & Cooper, 2007), wobei die Aktivität der Adenylatzyklasen typischerweise durch die $G\alpha_s$ -Untereinheit stimuliert wird.

Solche Genmanipulationen, welche entweder die Degradation von cAMP vermindern oder die cAMP-Synthese steigern, führten zu kürzeren benötigten Disinhibitionsfenstern

und damit einer schnelleren Signalakkumulation. Genmanipulationen, welche die cAMP-Synthese vermindern oder den cAMP-Abbau befördern, führten dagegen zu längeren benötigten Disinhibitionsfenstern und damit einer langsameren Signalakkumulation (**Abbildung 13**).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse leitete sich die Vermutung ab, dass der second messenger cAMP das gesuchte Äquivalent der neuronalen Informationsspeicherung sowie Akkumulation auf Minutenebene darstellen könnte.

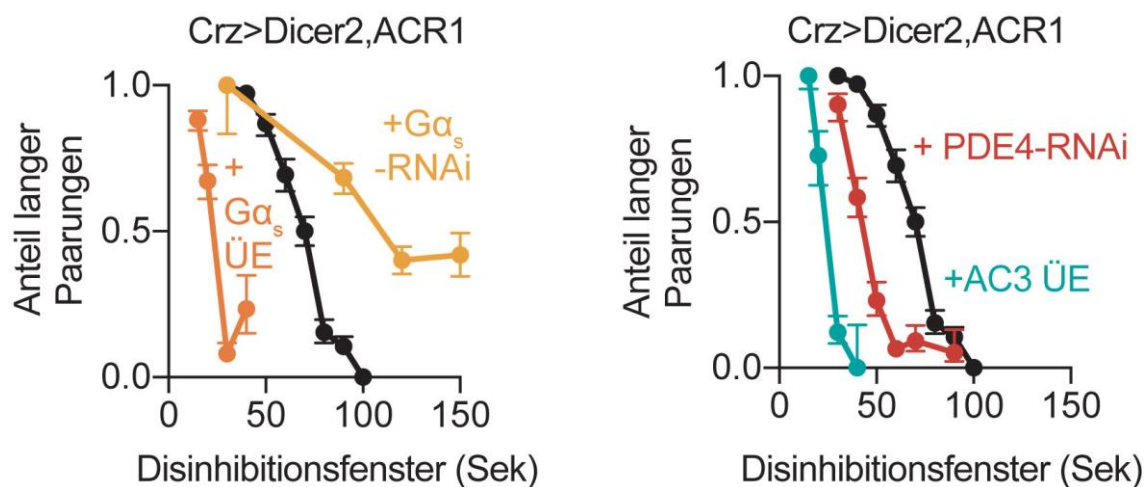


Abbildung 13. Charakterisierung der cAMP-Signalweg Manipulationen

Links: genauere Charakterisierung der Auswirkungen einer Überexpression (ÜE) sowie RNAi vermittelten Verminderung der Gα_s-Untereinheit auf die Länge des für eine normale Paarungsdauer benötigten Disinhibitionsfensters. Die Überexpression der Gα_s-Untereinheit führt zu einer Verkürzung des maximal benötigten Disinhibitionsfensters (da cAMP-Produktion↑) (orange), die Verminderung der Gα_s-Untereinheit mittels RNAi dagegen zu einer Verlängerung des maximal benötigten Disinhibitionsfensters (da cAMP-Produktion ↓) (gelb).

Rechts: genauere Charakterisierung der Auswirkungen einer Überexpression (ÜE) der Adenylatzyklase 3 (blau) sowie einer RNAi vermittelten Verminderung der Phosphodiesterase 4 (rot) auf die Länge des für eine normale Paarungsdauer benötigten Disinhibitionsfensters. Beide Manipulationen führen zu einer Verkürzung des maximal benötigten Disinhibitionsfensters, da entweder der Abbau bereits angehäuften cAMPs verringert (PDE4 RNAi) oder die Produktion von cAMP gesteigert (AC3 Überexpression) wird. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Um ein tieferes Verständnis bezüglich der Rolle akuter cAMP Veränderungen in den Crz-Neuronen während der Paarung zu erlangen, wurde daraufhin die durch blaues Licht aktivierbare Adenylatzyklase bPAC in den Crz-Neuronen exprimiert, (Stierl et al., 2011)

(Abbildung 14), welche es ermöglicht, mittels Lichtapplikation eine akute cAMP-Konzentrationserhöhung in den Crz-Neuronen zu erreichen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Screens, führte die bPAC-Aktivierung und die damit einhergehende cAMP-Erhöhung zur Stimulation der Crz-Neurone, was u.a. daran erkannt werden kann, dass isolierte männliche Fliegen als Reaktion auf die Blaulicht-Exposition ejakulierten, ein Verhalten, welches typischerweise nach einer Stimulation der Crz-Neurone auftritt. (Abbildung 14).

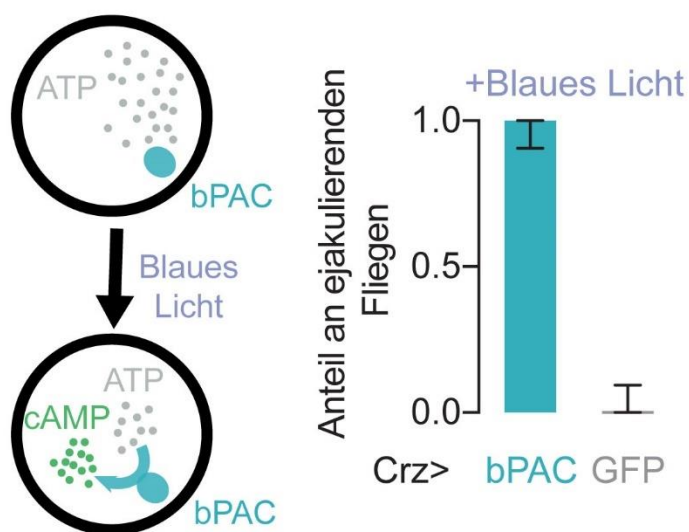


Abbildung 14. Die akute optogenetische Erhöhung der cAMP-Spiegel aktiviert die Corazonin-Neurone

Links: Die Expression der bakteriellen Photoadenylatzyklase bPAC in einer Zelle ermöglicht die Produktion von cAMP auf einen blauen Lichtstimulus hin.

Rechts: Die optogenetische Induktion der cAMP-Produktion in den Crz-Neuronen führt zu spontanen Ejakulationen in sich nicht paarenden Männchen (blau), was auf eine akute Aktivierung der Crz-Neurone durch cAMP hindeutet.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die erfolgreiche akute Beeinflussung der Crz-Neurone durch die optogenetische cAMP-Erhöhung stellt eine wichtige Information dar, da die genetischen Modifikationen des cAMP-Signalwegs im Rahmen des Hochdurchsatz-Screens konstitutiver Natur sind, also während der gesamten neuronalen Lebensdauer präsent sind, sodass die Effekte der cAMP-Manipulationen auf das Disinhibitionsfenster im Prinzip auch entwicklungsbedingt

hätten sein können. Basierend auf der Hypothese, dass die Akkumulation von cAMP dem 70 Sekunden Disinhibitionsfenster zugrunde liegt, wurden in einem weiteren Experiment die intrazellulären cAMP-Spiegel in den Crz-Neuronen bereits vor der Applikation eines Disinhibitionsfensters mittels bPAC angehoben, in der Erwartung, dass dadurch das minimal benötigte Disinhibitionsfenster deutlich verkürzt sein sollte, da bereits eine gewisse Menge an cAMP in den Zellen vorliegt. Tatsächlich bestätigte sich diese Erwartung und das Disinhibitionsfenster wurde durch die vorgelagerte bPAC-Stimulation deutlich verkürzt, was weiterhin zeigt, dass sich das cAMP, welches durch bPAC erzeugt wird, mit dem endogen synthetisierten cAMP addiert (**Abbildung 15**). Bemerkenswert ist jedoch, dass eine bPAC vermittelte cAMP-Akkumulation dennoch nur dann zu einem Umlegen des motivationalen Schalters führt, wenn für eine gewisse Zeitspanne die elektrische Inhibition der Crz-Neurone aufgehoben wird, was in **Abbildung 15** daran zu erkennen ist, dass bei einem Disinhibitionsfenster von 0 Sekunden Länge 100% der Kopulationen eine lange Dauer aufweisen. Der stimulatorische Effekt cAMPs auf die Crz-Neurone scheint daher durch spannungsabhängige Prozesse vermittelt zu sein und keinen direkten Einfluss auf die Neurotransmitterausschüttung zu haben.

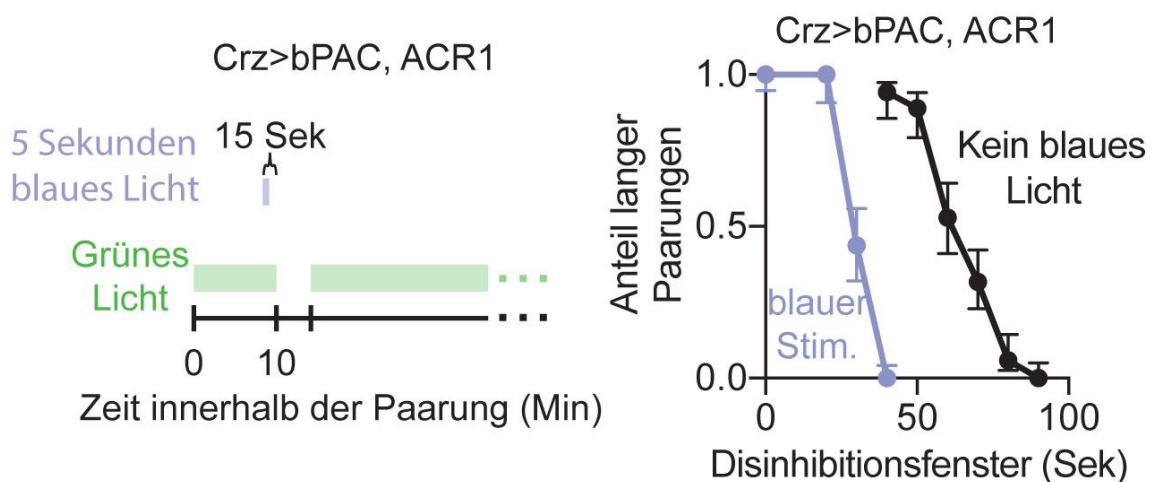


Abbildung 15. Die optogenetische Erzeugung von cAMP verkürzt die benötigte Dauer elektrischer Aktivität während des Disinhibitionsfensters, hebt jedoch die Notwendigkeit dieser nicht auf

Links: Experimentelles Protokoll: 15 Sekunden vor der Applikation von Disinhibitionsfenstern variabler Länge wird bPAC für eine Dauer von 5 Sekunden mittels blauen Lichts stimuliert. Dadurch werden in den Crz-Neuronen bereits vor dem Disinhibitionsfenster die cAMP-Spiegel erhöht.

Rechts: Eine optogenetisch induzierte cAMP-Produktion in den Crz-Neuronen 10 Sekunden vor Beginn des Disinhibitionsfensters verkürzt die für eine normale Paarungsdauer benötigte Länge des Disinhibitionsfensters deutlich (violett). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Um auszuschließen, dass eine akute Erhöhung cAMPs mittels bPAC prinzipiell zu einer Stimulation neuronaler Aktivität führt, wurde bPAC außerdem in einer anderen neuronalen Population, den Drive-Integrating-Neurons (DINs) (Thornquist & Crickmore, 2020), exprimiert und stimuliert, wobei sich in dieser Neuronengruppe kein Hinweis auf eine bPAC vermittelte Verhaltensänderung finden ließ, wohingegen eine Stimulation dieser Neurone mittels CsChrimson (Klapoetke et al., 2014) zum Abbruch der Paarung führt (**Abbildung 16**). Die Stimulation von bPAC führt also nicht grundsätzlich zu einem Anstieg neuronaler Aktivität.

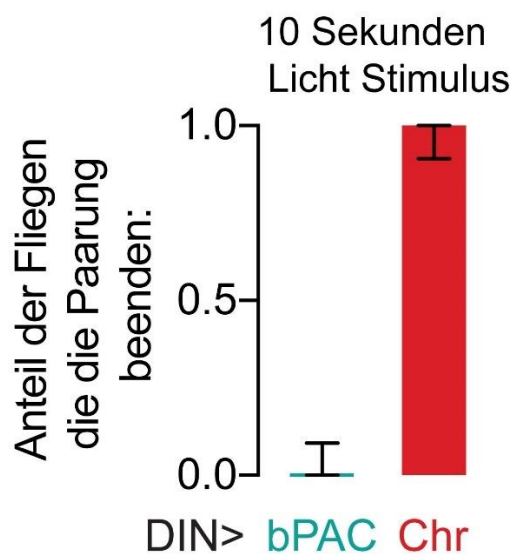


Abbildung 16. Eine cAMP-Erhöhung in den DINs durch bPAC-Stimulation beeinflusst das Paarungsverhalten nicht

Die elektrische Stimulation der DINs (Thornquist & Crickmore, 2020) mittels CsChrimson führt zur sofortigen Beendigung der Paarung (rot), wohingegen eine Stimulation mit bPAC zu keiner derartigen Aktivierung der Neurone führt (blau). (Durchführung des Experiments durch Dr. Stephen Thornquist). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

4.3. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel führt über eine Aktivierung der Proteinkinase A zum spannungsabhängigen Einstrom von Kalzium-Ionen

Die akute Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel mittels bPAC führt zu einer dramatischen Verkürzung, jedoch nicht gänzlichen Aufhebung des minimal benötigten Disinhibitionsfensters, was darauf hinweist, dass zusätzliche spannungsabhängige Prozesse eine Rolle spielen. Eine Analyse dieser nachgelagerten Prozesse ist daher für

das weitere Verständnis der Signalakkumulation auf Intervallzeitskalen von großer Bedeutung, um zu verstehen, wie im Rahmen dieses Prozesses ein Schwellenwert generiert werden kann, der letztlich entscheidet, wann genau der Akkumulationsprozess beendet ist und somit ein Signal abgegeben werden kann.

Klassischerweise führt das Überschreiten einer kritischen Menge an cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Walsh et al., 1968). Die Proteinkinase A ist ein Tetramer aus zwei katalytischen Untereinheiten, welche im inaktiven Zustand an zwei regulatorische Untereinheiten gebunden sind (**Abbildung 17**). Bindet jedoch cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A, so löst sich diese Bindung auf, und die so befreiten katalytischen Untereinheiten können ihre Zielproteine phosphorylieren (**Abbildung 17**).

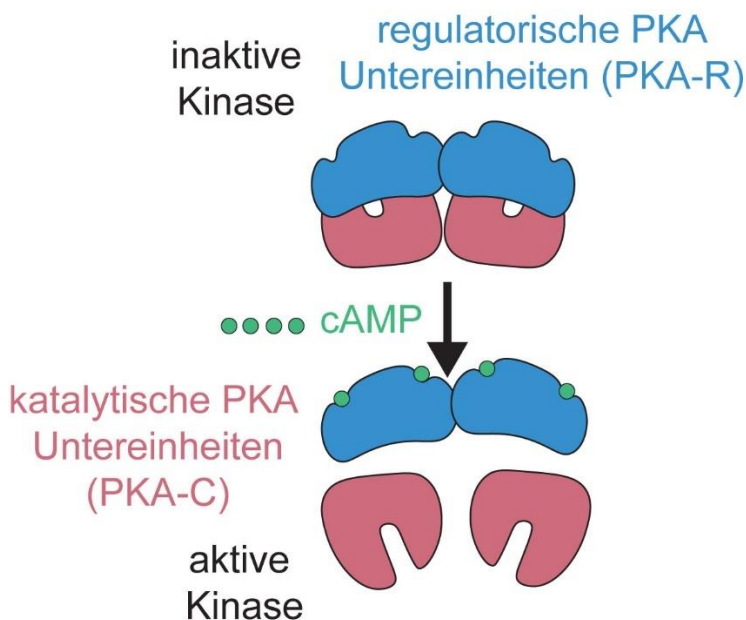


Abbildung 17. Schema der Proteinkinase A-Aktivierung

Schema, welches die Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP-Bindung an die regulatorischen Untereinheiten (PKA-R, blau) und die damit einhergehende Befreiung der katalytischen Untereinheiten (PKA-C, rot) zeigt. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Sollte die akkumulierte Menge an cAMP in den Crz-Neuronen durch die Proteinkinase A ausgelesen werden, so würde man erwarten, dass eine Gen-Stillegung der Proteinkinase A den Signalakkumulationsprozess während des Disinhibitionsfensters verlangsamen sollte, die minimal benötigte Länge des Disinhibitionsfensters also zunehmen sollte. Um dies zu testen, wurde daher eine RNAi gegen die katalytische Untereinheit 1 der Proteinkinase A in den Crz-Neuronen exprimiert und tatsächlich

verlängerte sich das für den motivationalen Schalter minimal benötigte Disinhibitionsfenster (**Abbildung 18**), was einen ersten Hinweis auf eine möglichen Rolle der Proteinkinase A darstellte.

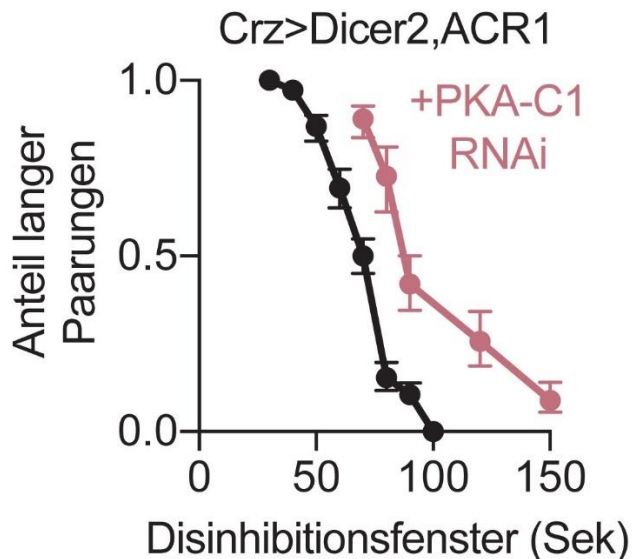


Abbildung 18. Eine RNAi-vermittelte Genstilllegung der PKA-C1 verlängert das benötigte Disinhibitionsfenster

Die Herunterregulation der katalytischen Proteinkinase A Untereinheit Typ 1 (PKA-C1) mittels RNAi in den Crz-Neuronen führt zu einer Verlängerung des für eine normale Paarungsdauer benötigten Disinhibitionsfensters (rot). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Um jedoch einen noch stärkeren Loss-of-function-Effekt der Proteinkinase A zu erzielen, wurde eine dominant negativ wirkende regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A, auch PKA-R* genannt (Li et al., 1995) in den Crz-Neuronen exprimiert, was zur Folge hatte, dass das benötigte Disinhibitionsfenster derart stark verlängert wurde, dass die absolute Paarungsdauer auf durchschnittlich über 2 Stunden verlängert wurde (**Abbildung 19**). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die in großer Menge vorliegenden regulatorischen PKA-R* Untereinheiten die Befähigung zur cAMP-Bindung verloren haben, sodass diese die katalytischen Untereinheiten auch dann nicht freigeben, wenn die intrazellulären cAMP-Spiegel die sonst kritische Aktivierungsmenge erreicht haben.

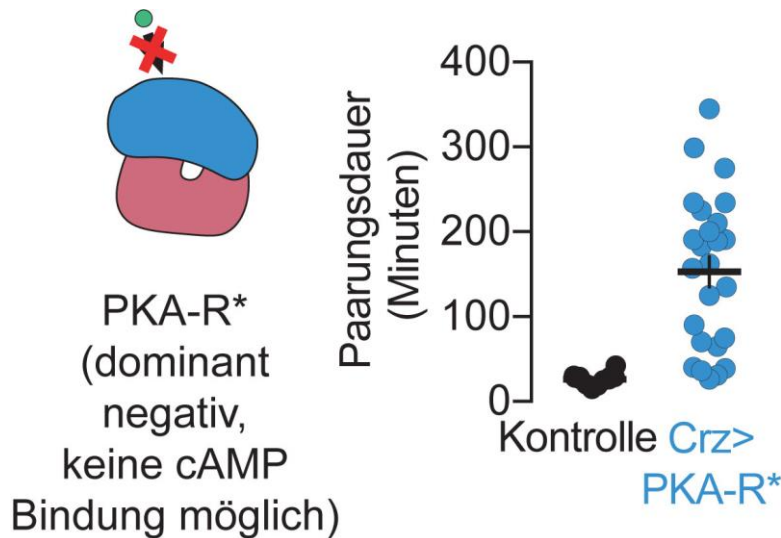


Abbildung 19. Die Expression der dominant negativen PKA-R* in den Crz-Neuronen verlängert das Disinhibitionsfenster und die Paarungsdauer dramatisch

Die Expression der dominant negativen regulatorischen Proteinkinase A Untereinheit PKA-R* in den Crz-Neuronen führt zu deutlich verlängerten Paarungsdauern (blau). Die PKA-R* Untereinheiten haben die Fähigkeit zur cAMP-Bindung verloren und geben daher die katalytischen Untereinheiten auch bei hohen intrazellulären cAMP-Spiegeln nicht frei, was zur Inhibition der Proteinkinase A führt. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die aus dieser genetischen Interaktion resultierende starke Verlängerung der Paarungsdauer macht deutlich, dass die Aktivität der Proteinkinase A für das Umlegen des motivationalen Schalters und damit für eine zeitgerechte Beendigung der Kopulationen von kritischer Bedeutung ist. Gleichzeitig konnte experimentell belegt werden, dass eine zusätzliche optogenetische Stimulation der Crz-Neurone vor dem Hintergrund einer Überexpression von PKA-R* zu normalen Kopulationsdauern führt. Die Crz-Neurone sind, von ihrem Verlust der Proteinkinase A-Aktivität einmal abgesehen, also funktionsfähig (**Abbildung 20**).

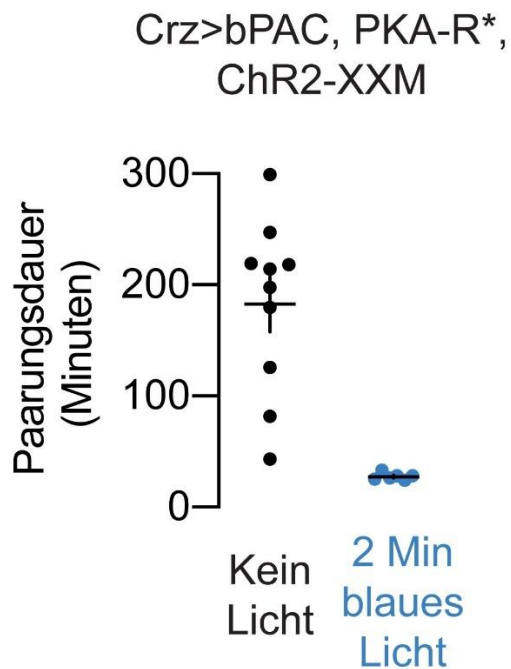


Abbildung 20. Die ChR2-XXM-Stimulation PKA-R* exprimierender Crz-Neurone hebt den paarungsverlängernden Effekt der PKA-R*-Überexpression auf

Die Kopulationsdauer von Fliegen, deren Crz-Neurone die dominant negative regulatorische PKA Untereinheit PKA-R* exprimieren, ist deutlich verlängert. Werden die Crz-Neurone jedoch zusätzlich mittels des optogenetischen Aktivators ChR2-XXM stimuliert, so hebt dies den Effekt von PKA-R* auf (blau). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Wird also das Auslesen der cAMP-Spiegel durch eine Blockade der PKA-Aktivität verhindert, so kommt der gesamte Signalakkumulationsprozess während des Disinhibitionsfensters zum Erliegen. Ein gegensätzlicher Gain-of-function-Effekt wurde wiederum durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven katalytischen PKA-Untereinheit, kurz PKA-mC* (Li et al., 1995), erreicht, durch die sich die minimal benötigte Dauer des Disinhibitionsfensters deutlich verkürzte (**Abbildung 21**). Die Überexpression einer unveränderten oder katalytisch inaktiven katalytischen Untereinheit führte dagegen zu keiner Verkürzung des Disinhibitionsfensters (**Abbildung 21**).

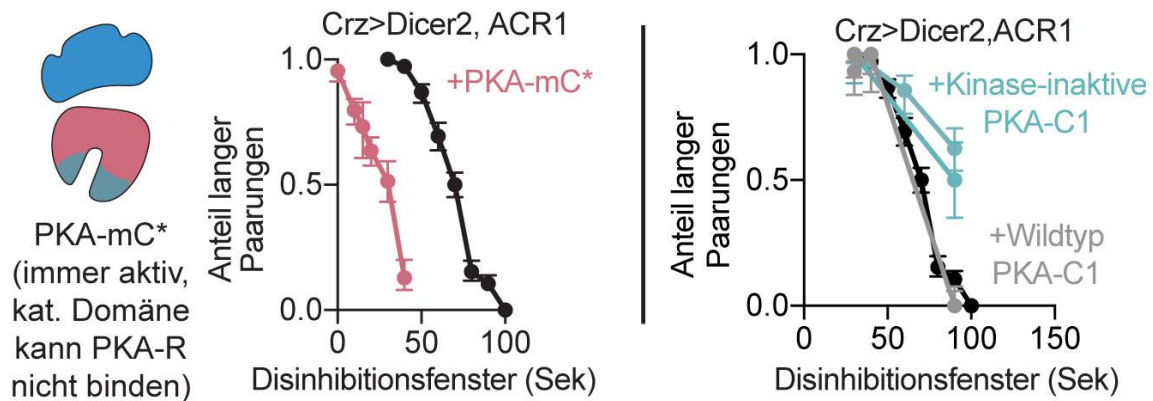


Abbildung 21. Die Expression der konstitutiv aktiven PKA-mC* verkürzt das benötigte Disinhibitionsfenster

Links: Schematische Darstellung einer konstitutiv aktiven katalytischen Untereinheit der PKA (=PKA-mC*).

Mitte: Die Überexpression der PKA-mC* in den Crz-Neuronen verkürzt das für eine normale Kopulationsdauer benötigte Disinhibitionsfenster deutlich (rot).

Rechts: Die Überexpression sowohl einer wildtypischen katalytischen Untereinheit (grau) als auch einer katalytisch inaktiven Untereinheit (hellblau) führen dagegen zu keiner derartigen Verkürzung des Disinhibitionsfensters.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die kritische Bedeutung der Proteinkinase A bezüglich der Übersetzung erhöhter cAMP-Spiegel in neuronale Aktivität lässt sich dabei nicht nur in vivo mittels einer Beeinflussung des Disinhibitionsfensters zeigen, sondern auch im Rahmen einer explantierten Gehirn-Präparation, bei der das ventrale Nervensystem der Fliege entnommen und unter einem Mikroskop untersucht wird. So konnte zunächst durch den Kooperationspartner Dr. Thornquist mittels des Kalzium-Sensors GCaMP6s (T.-W. Chen et al., 2013) gezeigt werden, dass eine Stimulation von bPAC zu einer starken und lang andauernden Kalzium-Erhöhung in den Crz-Neuronen führt. Da eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration die Neurotransmission erhöht, unterstreicht dies die in vivo beobachtete stimulierende Wirkung einer bPAC-Aktivierung auf die Crz-Neurone (**Abbildung 14**). Wird dagegen zusätzlich zur bPAC-Stimulation die dominant negative regulatorische PKA Untereinheit PKAR* in den Crz-Neuronen exprimiert, so ist der bPAC-induzierte Kalzium-Anstieg deutlich reduziert (**Abbildung 22**).

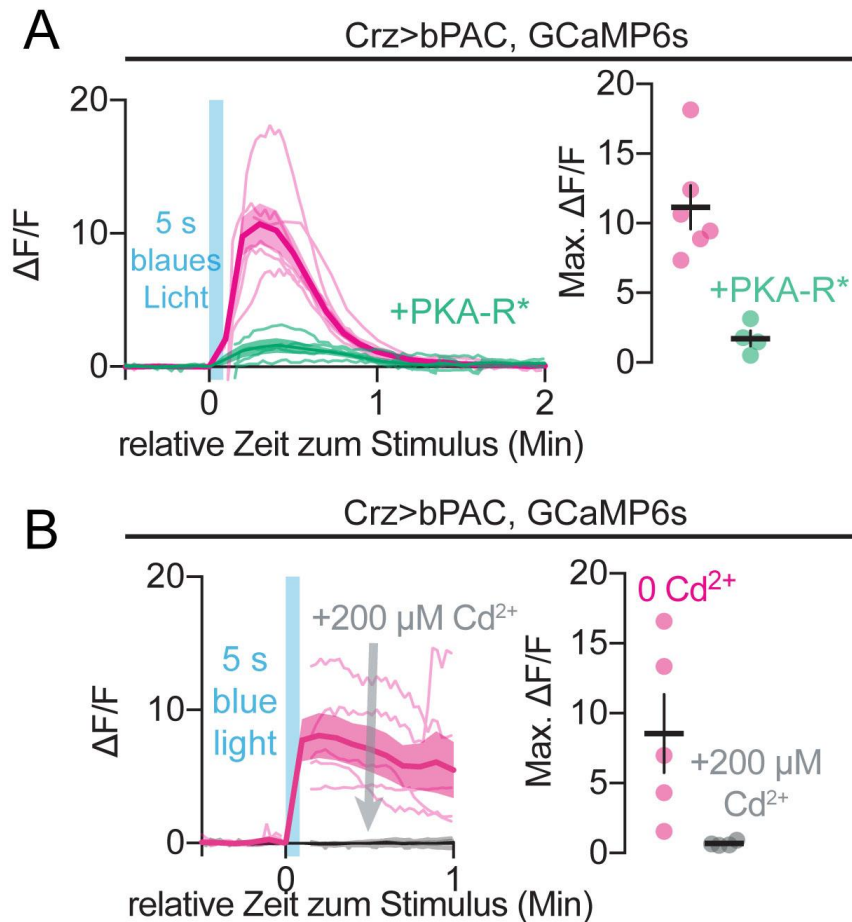


Abbildung 22. Ein bPAC vermittelter cAMP-Anstieg in den Crz-Neuronen führt zu einem massiven Kalzium-Einstrom, der von der Aktivität der PKA sowie von Kalziumkanälen abhängig ist.

Messung der Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentrationen in Folge einer bPAC vermittelten optogenetischen cAMP-Produktion in den Crz-Neuronen. Die Änderung der Fluoreszenz des Kalzium-Sensors GCaMP6s wird im Rahmen einer ex vivo Präparation gemessen.

A: Die optogenetische Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel führt zu einer starken Kalzium-Erhöhung in den Crz-Neuronen (pink). Wird jedoch zusätzlich die dominant negative regulatorische Proteinkinase A Untereinheit PKA-R* exprimiert, reduziert sich der cAMP-induzierte Kalziumanstieg deutlich (grün). Jede abgebildete Linie repräsentiert ein individuelles Crz-Neuron aus unterschiedlichen Fliegen.

B: Die Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Spiegel als Folge einer bPAC-Stimulation ist zumindest zum Teil von dem Einstrom von Kalzium-Ionen aus dem Extrazellulärraum abhängig, da die extrazelluläre Applikation des Kalzium-Kanal-Blockers Cadmium die durch die bPAC-Stimulation hervorgerufene Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration blockiert (grau). (Dr. Thornquist)

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der massive Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytosol zumindest in Teilen vom Einstrom freier Kalzium-Ionen aus dem

Extrazellulärraum durch Kalzium-Kanäle in der Plasmamembran abhängt, da eine Zugabe von Cadmium, welches Kalzium-Kanäle blockiert, ebenfalls den massiven cAMP induzierten Kalzium-Anstieg zu verhindern vermag (**Abbildung 22**).

Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch Kalzium-Ionen aus anderen Quellen, beispielsweise aus dem endoplasmatischen Retikulum, zu diesem massiven Kalzium-Anstieg beitragen, da die Kalzium-Ionen aus dem Extrazellulärraum den Ausstrom von Kalzium-Ionen aus intrazellulären Kalziumspeichern triggern könnten (Fabiato, 1983).

Dennoch befindet sich das Cadmium-Ergebnis im Einklang mit dem Ergebnis einer Gen-Stillegung der β -Untereinheit spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle in den Crz-Neuronen von Fliegen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden. Analysen des Paarungsaktes zeigten, dass, wie bei einer Beteiligung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen bei der Übersetzung des cAMP-Signals in ein Kalzium-Signal zu erwarten wäre, das minimal benötigte Disinhibitionsfenster verlängert war (**Abbildung 23**).

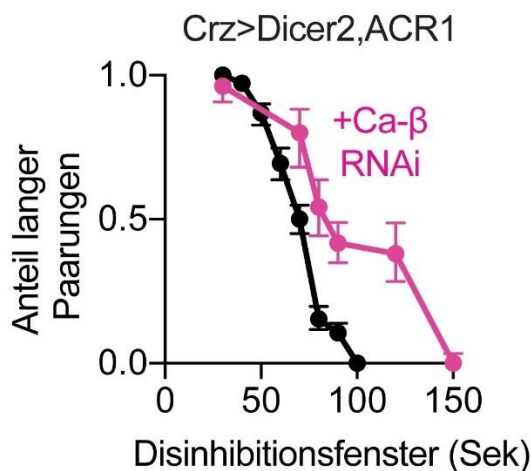


Abbildung 23. Die Herunterregulation der Ca- β -Untereinheit verlängert das Crz-Disinhibitionsfenster

Die RNAi vermittelte Herunterregulation der Beta-Untereinheit spannungsgesteuerter Kalzium-Kanäle (pink) in den Crz-Neuronen verlängert das für eine normale Paarungsdauer benötigte Disinhibitionsfenster. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die Zusammenschau der Ergebnisse, dass die bPAC-Stimulation nur dann zur Umlegung des motivationalen Schalters führt, wenn gleichzeitig keine Hyperpolarisation der Neurone vorliegt (**Abbildung 15**), eine Zugabe von Cadmium das durch eine bPAC-

Stimulation hervorgerufene starke Kalzium-Signal in den Crz-Neuronen unterdrückt, und eine Gen-Stilllegung der β -Untereinheit spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle zu einer Verlängerung des Disinhibitionsfensters führt, legt nahe, dass spannungsabhängige Kalzium-Kanäle den Effekt akkumulierender cAMP-Spiegel auf den massiven Kalziumeinstrom ins Zytosol vermitteln. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, dass eine Modifikation spannungsgesteuerter Kanäle durch PKA beschrieben (Bunemann et al., 1999; Sang et al., 2016) ist, wobei der nur moderate Effekt der Herunterregulation der β -Untereinheit spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle auf das Disinhibitionsfenster darauf hindeutet, dass wohl mehrere unterschiedliche Kanäle für diesen Prozess von Bedeutung sind.

Zusammengefasst legen die bisher dargelegten Daten nahe, dass es während des 70 Sekunden andauernden Disinhibitionsfensters über die Stimulation der stimulatorischen Untereinheit der G-alpha Proteine und der nachfolgenden Aktivierung von Adenylatzyklasten zu einer Akkumulation von cAMP kommt, welche zu einer Befreiung katalytischer Untereinheiten der Proteinkinase A führt, die wiederum über eine Phosphorylierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu einem Einstrom von Kalzium und damit letztendlich zur Neurotransmission führt.

In Übereinstimmung mit dieser Theorie der akkumulierenden cAMP-Spiegel hin zu einem Schwellenwert lässt sich dieser Prozess auch im Rahmen einer ex vivo Präparation darstellen. Wie in **Abbildung 22** gezeigt, führt eine starke, 5 Sekunden andauernde, bPAC-Stimulation zum massiven Einstrom von Kalzium-Ionen ins Zytosol, was, so die Überlegung, jenem Kalzium-Signal entspricht, das zur Abgabe des Crz-Signals führt. Wird dagegen, wie von Dr. Thornquist mittels GCaMP6s demonstriert, bPAC nur für etwa 500 Millisekunden stimuliert, so führen diese schwächeren cAMP-Anstiege nur zu einem geringen Einstrom von Kalzium-Ionen ins Zytosol. Trifft jedoch die Hypothese zu, dass cAMP in den Crz-Neuronen über eine lange Zeit hinweg hin zu einem Schwellenwert akkumuliert, dann wäre zu erwarten, dass die durch mehrere schwache bPAC-Stimulationen angehäuften cAMP-Anstiege letztlich auch den cAMP-Schwellenwert erreichen, was zu demselben massiven Kalzium- Einstrom führen sollte, welcher bei einer einzelnen, langen bPAC-Stimulation zu beobachten ist. Tatsächlich konnte genau dies beobachtet werden, da nach etwa 3 bis 5 bPAC-Stimuli, welche durch eine Stimulationspause von 100 Sekunden Länge voneinander getrennt wurden, ein massiver Kalziumeinstrom ausgelöst werden konnte (**Abbildung 24**).

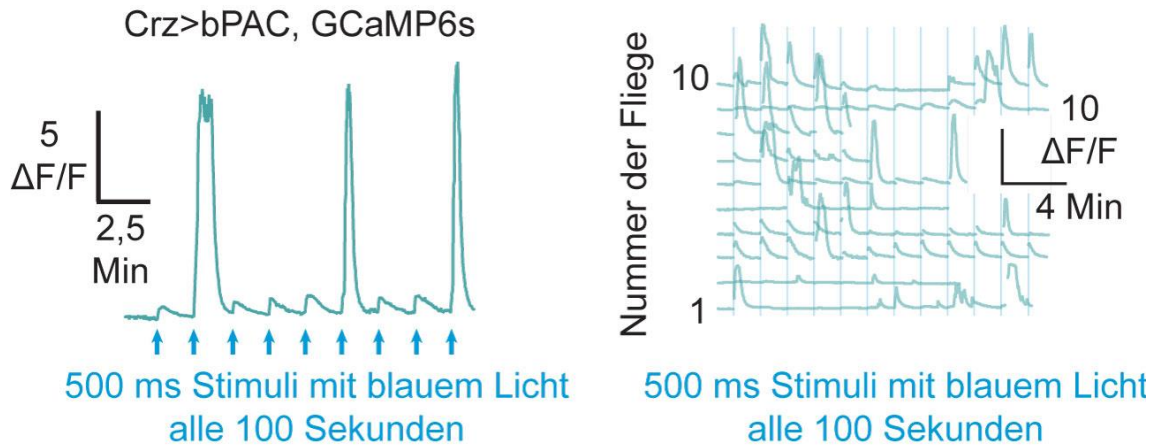


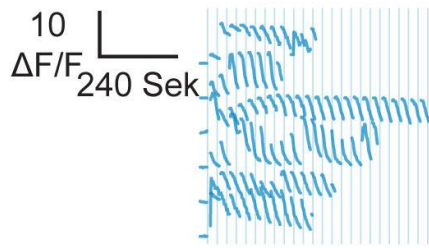
Abbildung 24. Werden kurze bPAC-Stimulationen alle 100 Sekunden wiederholt, so kommt es nach mehreren Stimuli zu einem massiven Kalzium-Einstrom in die Crz-Neurone

Links: Individuelle Beispielkurve wie eine alle 100 Sekunden wiederholte 500ms dauernde bPAC-Stimulation und die damit einhergehende Akkumulation von cAMP zu einem massiven Kalziumeinstrom in ein Crz-Neuron führt.

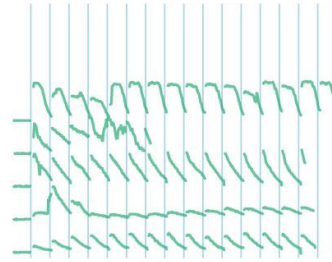
Rechts: 10 weitere Beispiele von Crz-Neuronen aus unterschiedlichen Fliegen, welche im Rahmen der cAMP-Akkumulationsexperimente (mehrfache 500ms dauernde bPAC-Stimulationen alle 100 Sekunden) die massiven Kalzium-Signale zeigen. (Dr. Thornquist)

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

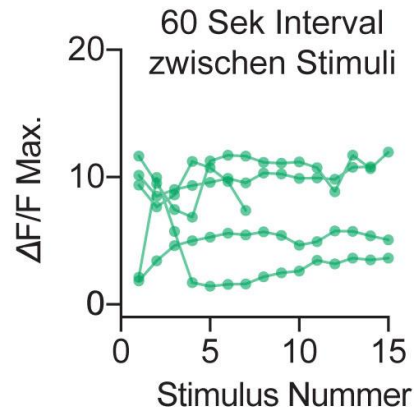
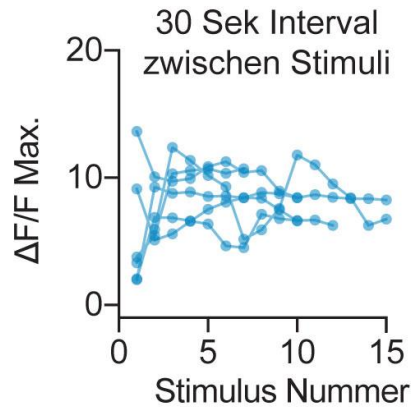
Wird das Paradigma aus kurzen bPAC-Stimulationen nach dem Auslösen eines derartigen massiven Kalziumeinstroms wiederholt, so kann erneut nach einer ungefähr ähnlichen Anzahl an bPAC-Stimulationen ein Kalzium-Einstrom von vergleichbarer Stärke ausgelöst werden, was für einen physiologischen Prozess und gegen beispielsweise einen durch den cAMP-Anstieg ausgelösten Zelltod spricht (**Abbildung 24**). Ein Verkürzen des Abstandes zwischen den einzelnen bPAC-Stimulationen führte zu der häufigeren Induktion des massiven Kalziumeinstroms, wohingegen eine Vergrößerung des Inter-Stimulus-Abstands auf mehrere Minuten zu deutlich selteneren derartigen Ereignissen führte (**Abbildung 25**), wobei die Zeitskalen sowie das non-lineare Output-Konzept den Eigenschaften des Disinhibitionsfensters sehr ähneln (siehe **Abbildung 10**). Dies bekräftigt außerdem ebenso die Hypothese, dass es sich um einen Akkumulationsprozess mit einem langsamen Verlust des akkumulierten Signals über eine Zeitspanne von mehreren Minuten handelt (**Abbildung 25**). Wären die massiven Kalzium-Signale nämlich zufällige Ereignisse, so wäre die Wahrscheinlichkeit, pro bPAC-Stimulus ein massives Kalzium-Signal auszulösen, dieselbe, ganz gleich ob die bPAC-Stimuli in kurzem oder weiten Abstand aufeinander folgen.



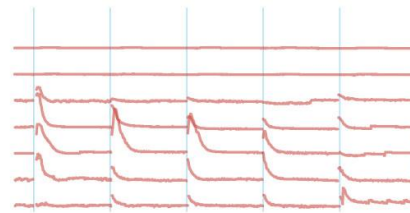
500 ms Stimuli mit blauem Licht alle 30 Sek



500 ms Stimuli mit blauem Licht alle 60 Sek



500 ms Stimuli mit blauem Licht alle 160 Sek



500 ms Stimuli mit blauem Licht alle 240 Sek

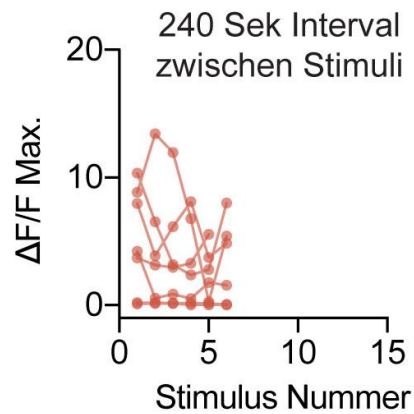
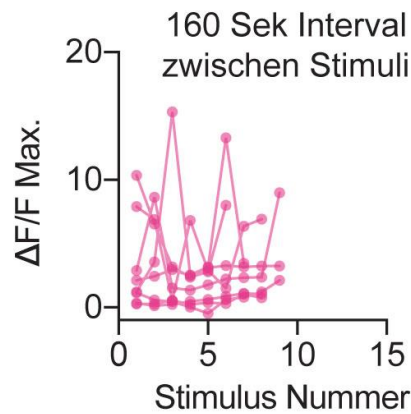


Abbildung 25. Wird der Abstand zwischen den bPAC-Stimulationen verlängert, so werden die massiven Kalziueinströme in die Crz-Neurone seltener

Applikation von 500ms bPAC-Stimulationen im Rahmen einer ex vivo Präparation der Crz-Neurone in unterschiedlichen Abständen: 30 Sekunden (blau), 60 Sekunden (grün), 160 Sekunden (pink) sowie 240 Sekunden (hellrot). Jeweils oben aufgetragen sind die Einzelverläufe der relativen Fluoreszenzänderungen von GCaMP6s und somit die relative Änderung der Kalzium-Spiegel gegen die jeweils durch ein Intervall voneinander getrennten bPAC-Stimuli. Jeweils unten aufgetragen ist die maximale relative Fluoreszenzänderung pro bPAC-Stimulus.

Je weiter die bPAC-Stimulationen und damit cAMP-Erhöhungen auseinanderliegen, desto seltener können die massiven Kalziumsignale beobachtet werden, was für ein zugrundeliegendes akkumulatives Phänomen spricht. Aufeinander folgende massive Kalziumsignale weisen darüber hinaus eine vergleichbare Höhe auf, was dafür spricht, dass bei Erreichen des cAMP abhängigen Schwellenwertes eine immer gleiche, nicht lineare, Reaktion getriggert wird.

Abgebildet sind sowohl die Einzelverläufe der Kalzium-Entwicklung in den unterschiedlichen Neuronen als auch darunter eine Auftragung der Entwicklung der maximalen Änderung der GCaMP6s Fluoreszenz je bPAC-Stimulus. (Dr. Thornquist). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Zusammengefasst zeigen die bisher dargelegten Daten, dass die Crz-Neurone die Akkumulation von cAMP nutzen, um über eine Zeitspanne von mehreren Minuten hinweg ein Äquivalent neuronaler Information zu generieren, welches zwar als Folge vergangener elektrischer Aktivität entsteht, jedoch auch bei intermittierender Hyperpolarisation nur langsam an Informationsgehalt verliert. Über eine Zeitspanne von etwa 70 Sekunden hinweg akkumuliert cAMP dabei hin zu einem definierten Schwellenwert, ab dem die erhöhte Menge an cAMP über eine Befreiung der katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A zu einem starken Kalziueinstrom über spannungsabhängige Kalzium-Kanäle führt, was zu einer Aktivierung der Crz-Neurone und infolgedessen zu einem Umlegen des motivationalen Schalters führt.

All dies wirft die Frage auf, wozu die Crz-Neurone den dargelegten Mechanismus der Akkumulation von neuronaler Information auf Intervallzeitebene nutzen könnten. Im Prinzip würde der dargelegte Mechanismus eine Form des Kurzzeitgedächtnisses ermöglichen, jedoch erscheint diese Deutung aufgrund der Funktion der Crz-Neurone während des Paarungsaktes unzureichend. Wird das Prinzip eines Kurzzeitgedächtnisses, welches eine Informationsspeicherung auf Intervallzeitskalen inkludiert, jedoch um das dynamische Konzept der Evidenzakkumulation erweitert, so

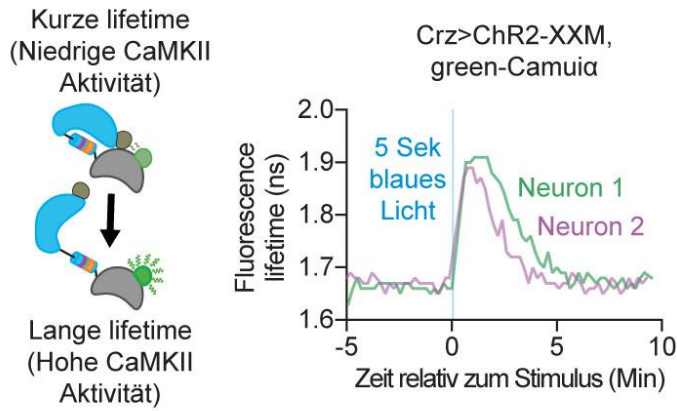
könnte die Akkumulation von cAMP eine Form biochemischer, intrazellulärer Evidenz darstellen, welche nicht nur Information auf langen Zeitskalen speichert, sondern zugleich selbst die Substanz der Informationsverarbeitung darstellt, ein Konzept, für das in dieser Dissertation der Begriff der „computational currency“ geprägt wurde.

Die Akkumulation von Evidenz ist immer dann nötig, wenn eine Entscheidung getroffen werden soll. Betrachtet man die Crz-Neurone aus dieser Perspektive, so messen diese nicht nur die ersten ~6 Minuten der Paarung ab, sondern sie entscheiden auch, zu welchem konkreten Zeitpunkt diese Zeit erreicht ist. Basierend auf dieser Überlegung soll im Weiteren die Bedeutung der cAMP-Akkumulation während des 70-Sekunden-Disinhibitionsfensters für den Entscheidungsprozess der Crz-Neurone aufgezeigt werden.

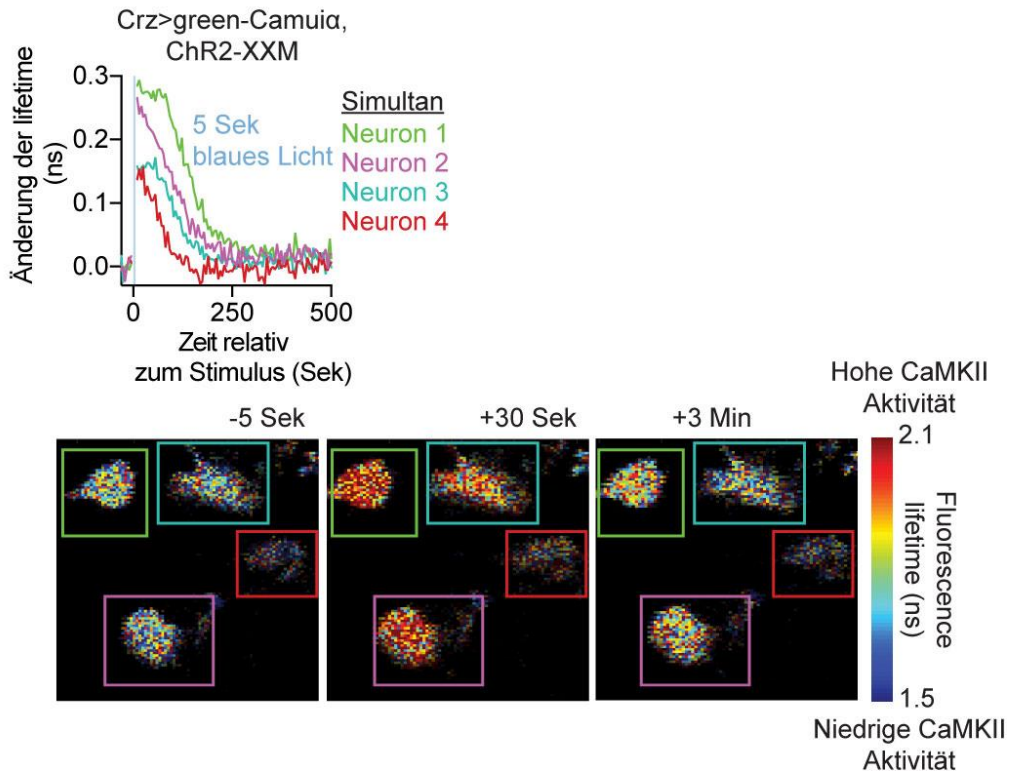
4.4. Der Zeitpunkt des Corazonin-Signals ist das Produkt einer netzwerkweiten Evidenzakkumulation

Die Crz-Neurone besitzen die Funktion eines Intervallzeitmessers (Thornquist et al., 2020). Ihr Output legt fest, wann die ersten ~6 Minuten der Paarung verstrichen sind, wobei die zell-intrinsische und selbsterhaltende Aktivität der CaMKII das zu messende Zeitintervall festlegt (Thornquist et al., 2020). Thornquist et al. 2020 konnten dabei zeigen, dass die in vivo abnehmende Aktivität der CaMKII im Rahmen einer explantierten Gehirn-Präparation durch eine Aktivierung der Crz-Neurone mittels des Kalzium-permeablen Channelrhodopsins ChR2-XXM (Scholz et al., 2017) und der Expression des FRET-FLIM Reporters green-Camuid (S.-J. R. Lee et al., 2009) nachgeahmt werden kann. Wird jedoch die Dauer des CaMKII-Aktivitätsabfalls in allen vier Crz-Neuronen gleichzeitig gemessen (**Abbildung 26**), so konnte Dr. Thornquist in neuen Experimenten zeigen, dass diese eine große Variabilität zwischen den individuellen Neuronen aufweisen. Die individuellen Crz-Neurone scheinen also, zumindest auf der Ebene ihrer CaMKII-Zeitmesser, eine voneinander abweichende Konzeption von der verstrichenen Zeit zu besitzen.

A



B



C

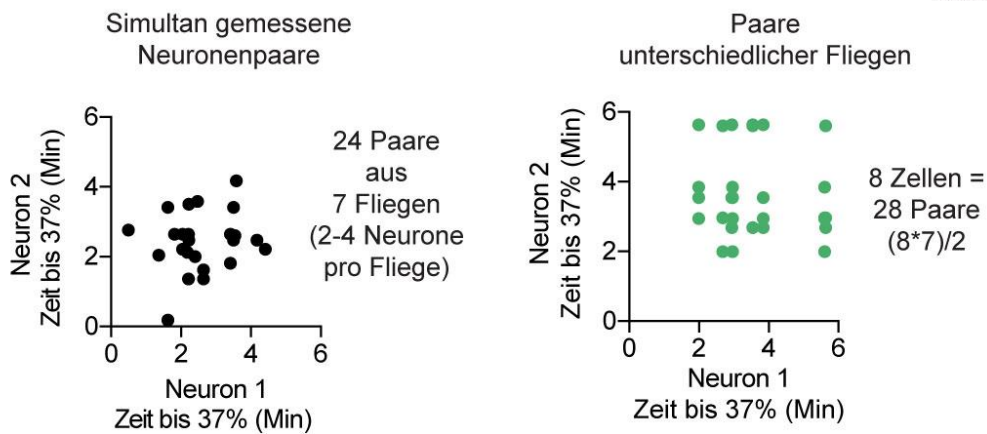


Abbildung 26. Die simultane Camui α -Messung in allen 4 Crz-Neuronen zeigt, dass die Aktivität der CaMKII-Zeitmesser in den individuellen Neuronen unterschiedlich schnell abfällt

A: Mittels des CaMKII-Aktivitätsindikators green-Camui α (linkes Schema) wird die CaMKII-Aktivität zweier Neurone nach einer Chr2-XXM Stimulation gleichzeitig gemessen. Diese zeigen zwar einen ähnlichen CaMKII-Aktivitäts-Anstieg, der Abfall der CaMKII-Aktivität weist jedoch eine beträchtliche Variabilität auf.

B: Simultane CaMKII-Aktivitätsmessung in allen 4 Crz-Neuronen nach vorangegangener ChR2-XXM Stimulation. Das Bild aller 4 Neurone zeigt beispielhaft eine simultane Messung.

C: Vergleich der jeweiligen Crz-Neurone hinsichtlich der Zeitdauer, bis die jeweilige CaMKII-Aktivität auf 37% der maximalen Aktivität abgefallen ist. Die Variabilität der individuellen CaMKII-Zeitmesser innerhalb einer Fliege (links) ist vergleichbar groß wie die Variabilität zwischen individuellen Fliegen (rechts). Dies spricht dafür, dass jeder CaMKII-Zeitmesser eine voneinander unabhängige Länge besitzt.

Durchführung durch Dr. Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Auf der Grundlage der zuvor aufgestellten Hypothese, dass das 70-Sekunden-Disinhibitionsfenster einen Evidenzakkumulationsprozess im Rahmen eines Entscheidungsprozesses bezüglich der verstrichenen Zeit beinhaltet, war daher zu vermuten, dass das Disinhibitionsfenster jenen Zeitraum darstellen könnte, während dessen sich die einzelnen Crz-Neurone mit ihren jeweils unterschiedlichen CaMKII-Zeitmessern bezüglich der zu messenden Zeit einigen könnten. Die Crz-Neurone könnten dabei die netzwerkweit gesammelte Evidenz bezüglich der abgelaufenen Zeit in Form von cAMP akkumulieren.

Um den Nachweis zu erbringen, dass das Crz-Signal das Produkt eines Informationsaustausches zwischen den vier Crz-Neuronen ist, wurde daher in der vorliegenden Arbeit zunächst die vor kurzem publizierte Coin-FLP-Technik etabliert (Bosch et al., 2015). Dieses Verfahren beruht auf einer Rekombinase-Aktivität sowie einer Kombination unterschiedlicher FRT sites (Flippase recognition targets) und führt dazu, dass jedes Neuron eine 50%ige Wahrscheinlichkeit besitzt, den Transkriptionsfaktor Gal4 zu exprimieren. Dies erlaubte es, während eines Paarungsaktes entweder 0, 1, 2, 3 oder aber alle vier Crz-Neurone mittels GtACR1 zu inhibieren (**Abbildung 27**) (Für Details bezüglich der Generierung der Crz-Coin-FLP-GtACR1-Fliegen siehe Material und Methoden).

Wäre unter den vier Crz-Neuronen nur ein besonderes Neuron dazu in der Lage, den motivationalen Schalter umzulegen, so wären lange Kopulationsdauern in 50% der genetisch so veränderten Fliegen zu erwarten, was der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass dieses eine Neuron GtACR1 exprimiert. Wäre dagegen jedes einzelne Neuron

unabhängig voneinander dazu in der Lage, den motivationalen Schalter umzulegen, was dazu führen würde, dass das Neuron mit dem schnellsten CaMKII-Zeitmesser dominiert, so sollten lange Kopulationsdauern nur in 6,25% der getesteten Fliegen beobachtet werden, da dies der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass alle vier Neurone GtACR1 exprimieren ($0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 = 0,0625$). Wenn dagegen die kollektive Aktivität aller vier Neurone vonnöten ist, so wäre zu erwarten, dass nur 6,25 % aller getesteten Fliegen normal lange Kopulationsdauern vorweisen, was der Wahrscheinlichkeit entspricht, dass keines der Crz-Neurone GtACR1 exprimiert (ebenfalls $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 = 0,0625$).

Tatsächlich konnte jedoch beobachtet werden, dass sich von 315 getesteten Fliegen mit GtACR1 Expression unter Coin-Flp Kontrolle 100 Fliegen für eine lange Zeit paarten, was einem Anteil von 31,75% entspricht (**Abbildung 27**). Dies entspricht fast genau dem Anteil, den man erwarten würde, wenn eine Inhibierung von drei beliebigen Crz-Neuronen (25%), oder allen vier Crz-Neuronen (6,25%) zu langen Kopulationsdauern führt, wohingegen eine Inhibierung von 2 oder weniger Neuronen zu Paarungsdauern von normaler Länge führt (**Abbildung 27**).

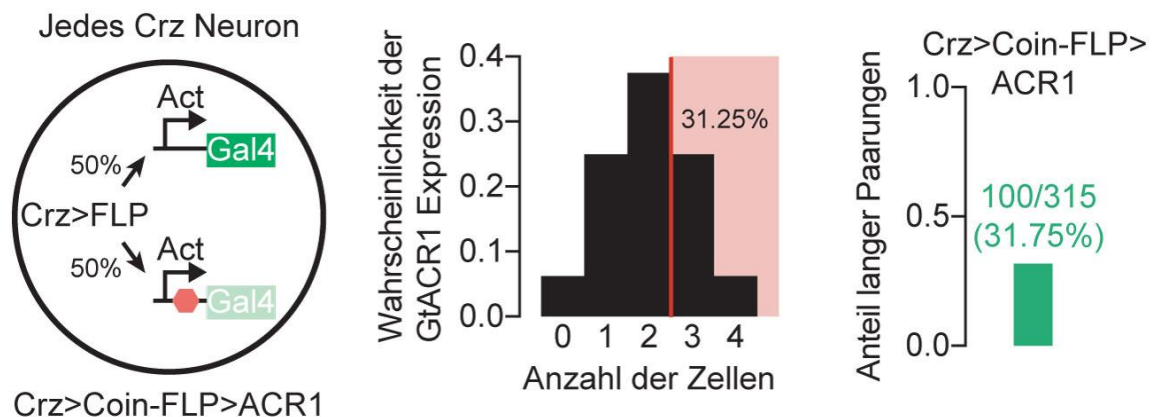


Abbildung 27. Die Testung genetischer Crz-GtACR1-Mosaik mittels der Coin-FLP-Technik zeigt, dass mindestens 2 Neurone für das Umlegen des motivationalen Schalters elektrisch aktiv sein müssen

Links: Schema zur Funktionsweise der Coin-FLP-Technik. Jedes Crz-Neuron wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% inhibiert.

Mitte / Rechts: Von 315 getesteten Fliegen paarten sich daraufhin 100 Fliegen (31,75%) für eine lange Zeit (>35 Minuten) (Rechts), was in etwa dem Anteil entspricht, den man erwarten würde, wenn eine Inhibition von 3 oder allen 4 Corazonin-Neuronen zu langen Paarungsdauern führen würde (Mitte).

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Dieses Ergebnis spricht also dafür, dass kein einzelnes Neuron dazu in der Lage ist, für sich allein den motivationalen Schalter umzulegen, sondern dass mindestens zwei Neurone für diese Aufgabe aktiv sein müssen, was für die Notwendigkeit einer Kommunikation zwischen den Crz-Neuronen spricht. Die Möglichkeit eines direkten Informationsaustausches zwischen den Crz-Neuronen wird weiterhin durch die Anatomie der Crz-Neurone gestützt, da diese stark überlappende Fortsätze mit zahlreichen positiven Markern für dendritische (Denmark) sowie synaptische (SytGFP) Berührungspunkte aufweisen (**Abbildung 28**).

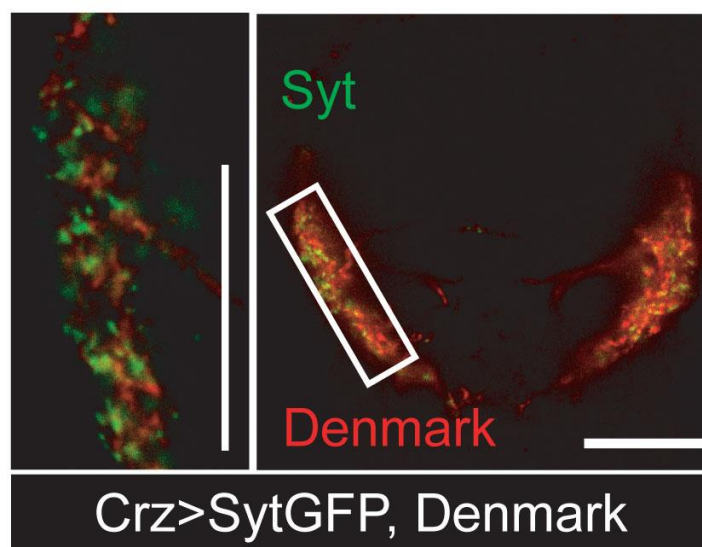


Abbildung 28. Synaptische und dendritische Immunfluoreszenzfärbungen weisen auf anatomische Verknüpfungen innerhalb des Crz-Netzwerks hin

Synaptische (Synaptotagmin::GFP (Syt)) Marker in grün sowie dendritische Marker (Denmark) in rot stehen in den Crz-Neuronen in engem Kontakt, was auf synaptische Verbindungen zwischen den einzelnen Crz-Neuronen hinweisen könnte. Die Vergrößerung auf der linken Seite stammt aus der Region, welche durch das weiße Viereck umschlossen ist. (Durchgeführt von Dr. Thornquist). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Zur direkteren Testung eines möglichen Informationsaustausches innerhalb des Crz-Netzwerks wurde daraufhin durch den Verfasser dieser Arbeit ein weiteres Mosaik-Experiment durchgeführt, in welchem eine schwache, durch Hitze induzierbare Flippase (hsFLP) (Nern et al., 2015) durch kurze Hitzeexpositionen vorübergehend in den Crz-Neuronen exprimiert wurde. Dies erlaubte es, in einer zufälligen Anzahl an Crz-Neuronen ein STOP-Codon, welches von FRT sites flankiert ist, zu entfernen, was die

Expression des optogenetischen Aktivators CsChrimson ermöglicht. Da gleichzeitig in allen Crz-Neuronen der Kalzium-Sensor GCaMP6s exprimiert wurde, konnte Dr. Thornquist, nachdem die Fliegen durch den Verfasser dieser Arbeit in vivo auf die Präsenz von CsChrimson in den Crz-Neuronen getestet wurden, die Nervensysteme dieser männlichen Fliegen entnehmen und in einer ex-vivo Präparation mittels roten Lichts jenen Teil der Crz-Neurone, welche eine CsChrimson Expression aufwiesen, stimulieren, und zugleich die Veränderungen der intrazellulären Kalziumspiegel in allen vier Neuronen messen (**Abbildung 29**). Als Folge der optogenetischen Stimulation einzelner CsChrimson positiver Neurone konnten dabei deutliche Kalzium-Anstiege auch in jenen Neuronen beobachtet werden, welche selbst gar keine CsChrimson Expression aufwiesen, was für die Befähigung der Crz-Neurone zur wechselseitigen Stimulation und damit Kommunikation spricht (**Abbildung 29**).

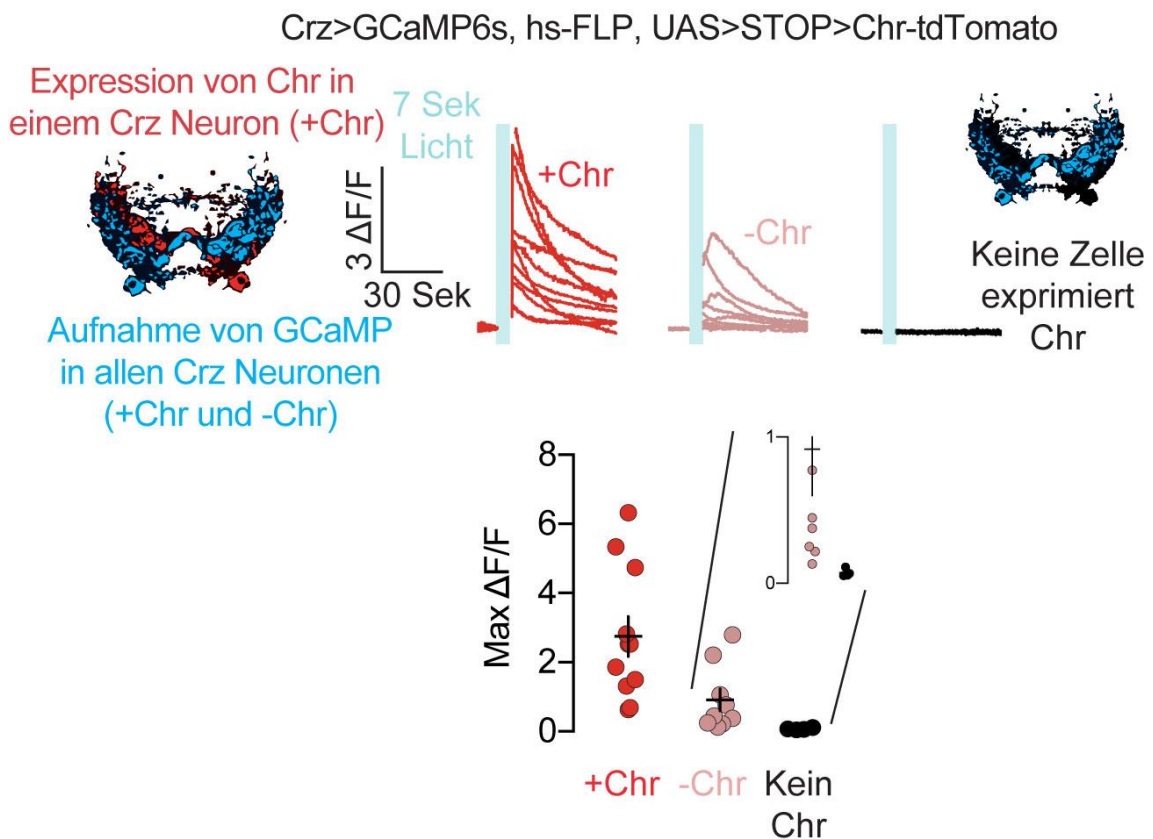


Abbildung 29. Die optogenetische Stimulation einzelner Crz-Neurone führt auch zu einem Anstieg der Kalzium-Spiegel in nicht optogenetisch stimulierten Crz-Neuronen

Die optogenetische Stimulation eines einzelnen Crz-Neurons (dunkelrote GCaMP6s Verläufe) führt auch in den anderen, nicht CsChrimson exprimierenden, Crz-Neuronen zu einem Kalziumanstieg (hellrote GCaMP6s Verläufe). Eine derartige gegenseitige Aktivierung könnte auf eine funktionelle Rekurrenz innerhalb des Corazonin-Netzwerks hinweisen.

Genetik und in vivo Testung durch Maximilian Pitsch, Bildgebung durch Dr. Thornquist.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Wenn also zwei beliebige Crz-Neurone gemeinsam einen funktionierenden Zeitmesser bilden können, so macht dies wahrscheinlich, dass im Prinzip jedes einzelne Crz-Neuron dazu in der Lage ist, das Signal für das Umlegen des motivationalen Schalters abzugeben. Um dieses Szenario zu testen wurden Fliegen erzeugt, die den optogenetischen Aktivator CsChrimson in mindestens einem Neuron exprimieren, wohingegen der inhibitorische Kaliumkanal Kir2.1 in allen vier Neuronen exprimiert wurde (Baines et al., 2001). In Übereinstimmung mit der Idee, dass jedes der vier Crz-Neurone, sofern es ausreichend stimuliert wird, das Crz-Signal abgeben kann, konnten immer dann normal lange Kopulationsdauern gemessen werden, wenn mindestens eines der Neurone CsChrimson exprimierte (**Abbildung 30**), was im Anschluss an die in vivo Kopulationsexperimente mittels Immunhistochemie gezeigt werden konnte.

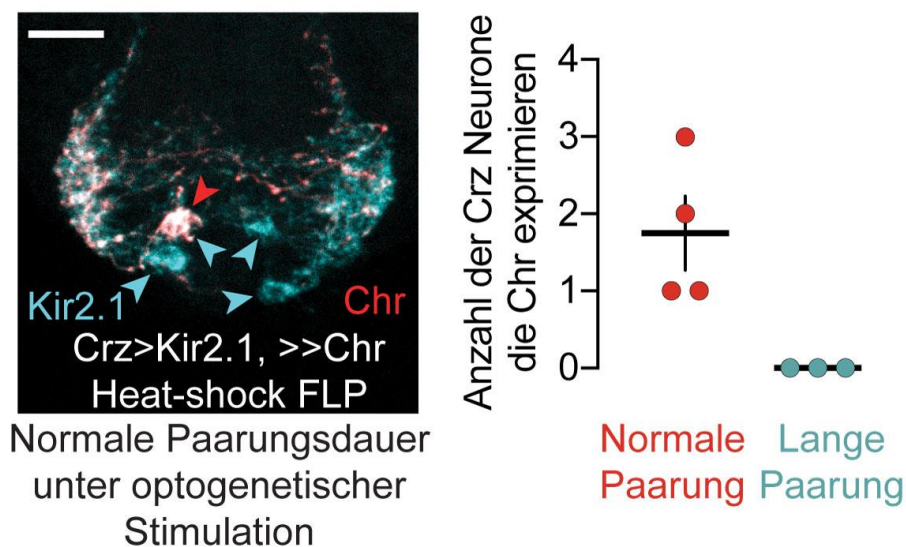


Abbildung 30. Die durch eine konstitutive Inhibition aller vier Crz-Neurone induzierte Verlängerung der Paarungsdauer kann durch die zusätzliche optogenetische Stimulation eines einzelnen Crz-Neurons aufgehoben werden

Links: Darstellung der CsChrimson-Expression einer getesteten Fliege. Kir2.1 wird konstitutiv in allen 4 Crz-Neuronen exprimiert. Alle rechts in vivo getesteten Fliegen wurden auf diese Weise bezüglich der CsChrimson-Expression untersucht.

Rechts: Bestimmung der Kopulationsdauer der später auf die Anzahl der CsChrimson exprimierenden Crz-Neurone getesteteten Fliegen. Daraufhin Zuordnung von Kopulationsdauer und Anzahl der CsChrimson exprimierenden Neurone.

Werden alle 4 Crz-Neurone während der Paarung mittels Kir2.1 (fusioniert mit EGFP, dargestellt in Zyan) inhibiert, so führt die starke optogenetische Stimulation eines einzigen Crz-Neurons mittels CsChrimson (fusioniert mit tdTomato, dargestellt in rot) dennoch zu normal langen Paarungsdauern. Dies zeigt, dass selbst ein einzelnes Crz-Neuron prinzipiell dazu in der Lage ist, das Output-Signal des gesamten Corazonin-Netzwerks abzugeben. Die Expression des optogenetischen Aktivators CsChrimson in nur einem einzelnen Neuron wird dadurch erreicht, dass die Fliege für eine zeitlich begrenzte Dauer gegenüber einer erhöhten Temperatur (etwa 30 °C) exponiert wird. Diese Hitzeeinwirkung führt zu der Expression einer Hitze-abhängigen Flippase (Nern et al., 2015), welche ein STOP-Codon vor dem CsChrimson Transgen entfernt, welches in der Folge exprimiert wird. Da die Hitzeeinwirkung nur kurz und die Flippase nur schwach ist, gelingt die Entfernung des STOP-Codons nur in seltenen Fällen.

(Genetik und Verhaltensdurchführung durch Maximilian Pitsch, Bildgebung und Immunhistochemie durch Dr. Stephen Thornquist). (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Ein einzelnes Crz-Neuron ist also unter der Voraussetzung einer optogenetischen Stimulation prinzipiell dazu in der Lage, den motivationalen Schalter auch allein umzulegen. Während eines natürlichen Paarungsaktes scheint jedoch eine gegenseitige Stimulation durch mindestens 2 Neurone notwendig zu sein, damit diese ein ausreichend hohes Aktivitätsniveau erreichen können, um das Crz-Signal abgeben zu können.

In Zusammenschau stützen die gezeigten Ergebnisse daher die Hypothese, dass der Zeitpunkt des Crz-Signals ein Produkt der rekurrenten Aktivität und damit der Kommunikation innerhalb des Crz-Netzwerks ist. Eben jene rekurrente Aktivität innerhalb des Crz-Netzwerks könnte wiederum die Grundlage des 70-Sekunden Disinhibitionsfensters darstellen, da cAMP während dieser Zeitspanne nur dann akkumuliert, wenn die Neurone während dieser Zeit nicht inhibiert sind (daher ja auch der Name Disinhibitionsfenster). Um zu zeigen, dass die Akkumulation von cAMP tatsächlich eine Konsequenz elektrischer Aktivität in und zwischen den Crz-Neuronen ist, bzw. dass eine positive Rückkopplungsschleife zwischen cAMP und neuronaler Aktivität besteht, stimulierte Dr. Thornquist alle Crz-Neurone im Rahmen einer ex vivo Präparation und führte zugleich eine Messung der cAMP-Dynamiken mittels des FRET/FLIM-cAMP-Sensors cADDi_{GreenDown} (Tewson et al., 2016) in den Crz-Neuronen durch. Tatsächlich führte eine CsChrimson vermittelte Stimulation der Crz-Neurone zu einer Fluoreszenzabnahme von cADDi_{GreenDown}, was einer Zunahme intrazellulären cAMPs entspricht (**Abbildung 31**).

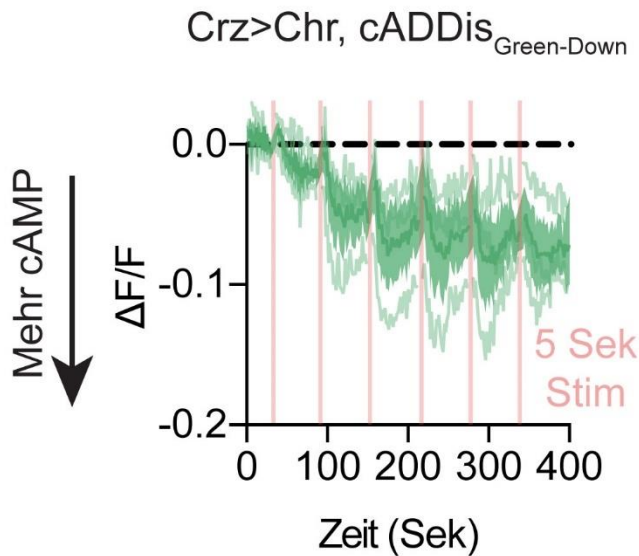


Abbildung 31. Die cAMP-Bildgebung bei wiederholter elektrischer Stimulation des Crz-Netzwerks zeigt einen Anstieg der cAMP-Spiegel

CsChrimson vermittelte elektrische Stimulation der Crz-Neurone (rote Balken) bei gleichzeitiger Messung der Auswirkungen dieser Stimulation auf die Veränderung der cAMP-Spiegel mittels des cAMP-Sensors cADDIS_{Green-Down} in den Crz-Neuronen (grüner Verlauf). Eine Abnahme der relativen cADDIS_{Green-Down} Fluoreszenz (grün) entspricht einer Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Durchführung durch Dr. Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Werden mehrere optogenetische Stimulationen nacheinander durchgeführt, so führt dies wiederum zu einer stetigen Zunahme an akkumuliertem cAMP (**Abbildung 31**).

Da in den Crz-Neuronen eine Herunterregulation der stimulatorischen $G\alpha$ -Protein-Untereinheit mittels RNAi zu einem verlängerten Disinhibitionsfenster führte (**Abbildung 13**), wohingegen eine Überexpression der $G\alpha_s$ zu einer Verkürzung des benötigten Disinhibitionsfensters führte (**Abbildung 13**), könnte die rekurrente elektrische Aktivität zwischen den Crz-Neuronen über eine Neurotransmitter-vermittelte Stimulation von $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren zu einer vermehrten Akkumulation von cAMP führen. Der Anstieg an cAMP wiederum könnte über die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A und der Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zu vermehrter rekurrenter Aktivität führen. Es entstünde eine positive Rückkopplungsschleife.

Trifft dieses Modell zu, so wäre zu erwarten, dass als Ergebnis der positiven Rückkopplungsschleife aus cAMP-Akkumulation und rekurrenter Aktivität alle Crz-Neurone trotz ihrer ungleichen CaMKII-Zeitmesser gleichzeitig das Crz-Signal abgeben. Um dies zu testen, wiederholte Dr. Thornquist das bPAC-Akkumulationsexperiment aus **Abbildung 24**, es wurde also alle 500 Millisekunden die Photoadenylatzyklase bPAC stimuliert, wobei die einzelnen bPAC-Stimuli von 100 Sekunden andauernden Stimulationspausen voneinander getrennt wurden. Diesmal jedoch wurde das GCaMP6s Signal aller 4 Neurone gleichzeitig aufgezeichnet, sodass Aussagen bezüglich der Synchronität des massiven Kalziumeinstroms getroffen werden können. Tatsächlich konnte eine fast perfekte Synchronität des massiven Kalziumsignals beobachtet werden (**Abbildung 32**), wobei der Verfasser dieser Arbeit für das massive synchronisierte Kalziumsignal und dem zugrundeliegenden Konzept der netzwerkweiten Evidenzakkumulation hin zu einem Alles-oder-Nichts-Schwellenwertes den Namen „Eruption“ vorschlug.

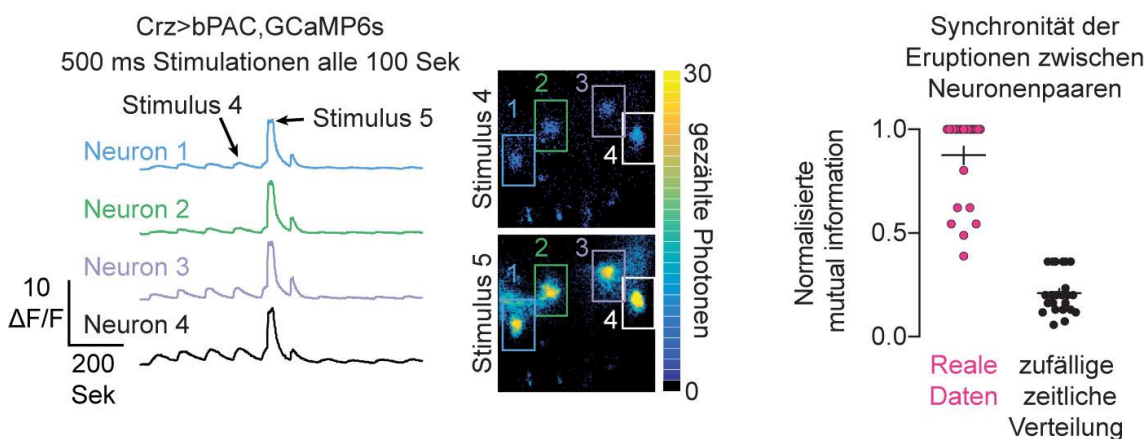


Abbildung 32. Die synchrone Kalzium-Bildgebung aller vier Crz-Neurone zeigt, dass die bei einem cAMP-Akkumulationsexperiment auftretenden massiven Kalziumeinströme in allen Crz-Neuronen synchron auftreten

Links: Simultane Messung der Kalzium-Dynamiken in allen 4 Crz-Neuronen einer Fliege mittels GCaMP6s. Die durch bPAC-Stimulationen ausgelösten massiven Kalzium-Signale sind in allen 4 Crz-Neuronen synchron.

Rechts: Vergleich der normalisierten mutual information der real gemessenen Daten mit einer zufälligen zeitlichen Verteilung (für mehr Informationen siehe Anhang)).

Durchführung durch Dr. Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die Eruption entspricht dabei dem Ende des 70-Sekunden Disinhibitionsfensters, was zum Umlegen des motivationalen Schalters sowie zur Initiierung der Ejakulation führt.

Um zu zeigen, dass die Rückkopplungsschleife aus cAMP und rekurrenter Aktivität tatsächlich die Grundlage synchronisierter Eruptionen darstellt, wurden daraufhin durch den Verfasser dieser Arbeit Fliegen generiert, welche sowohl bPAC in den Crz-Neuronen exprimieren, als auch eine Herunterregulation solcher Gene in den Crz-Neuronen aufweisen, welche für die positive Rückkopplungsschleife von kritischer Bedeutung sein müssten, in der Erwartung, dass derartige Manipulationen einen Einfluss auf die Eruption haben sollten.

Tatsächlich verhindert eine Herunterregulation der stimulatorischen $G\alpha$ -Untereinheit die durch wiederholte bPAC-Stimulationen ausgelösten Eruptionen (**Abbildung 33**). Dies liegt vermutlich daran, dass die Fähigkeit der rekurrenten Aktivität, eine cAMP-Akkumulation auszulösen, vermindert ist.

Auch eine Verminderung der rekurrenten Aktivität selbst, vermittelt durch die Herunterregulation des synaptischen Proteins Unc13 (Dittman & Ryan, 2019), für das ebenfalls eine Rolle im Rahmen des Disinhibitionsfensters hatte gezeigt werden können (**Abbildung 11**), führte zu einer Blockade der durch wiederholte bPAC-Stimulationen ausgelösten Eruptionen (**Abbildung 33**).

In beiden Fällen wurde also die positive Rückkopplungsschleife aus cAMP und rekurrenter Aktivität unterbrochen, was zur Blockade von Eruptionen führte. Würde man jedoch diese Crz-Neurone deutlich länger und stärker mit bPAC stimulieren, um so künstlich das Endprodukt der Rückkopplungsschleife, nämlich deutlich erhöhte cAMP-Spiegel, zu erreichen, so sollte man erwarten, dass in diesem Fall dennoch Eruptionen erreichbar sein sollten. Dies konnte auch tatsächlich so beobachtet werden, obgleich die Eruptionen oftmals etwas kleiner waren (**Abbildung 33**), was vermutlich auf die fehlende rekurrente Aktivität zurückzuführen ist.

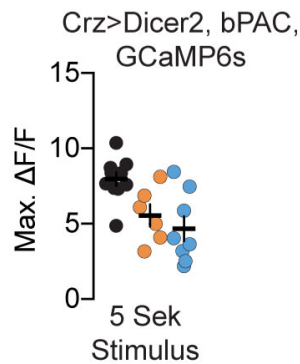
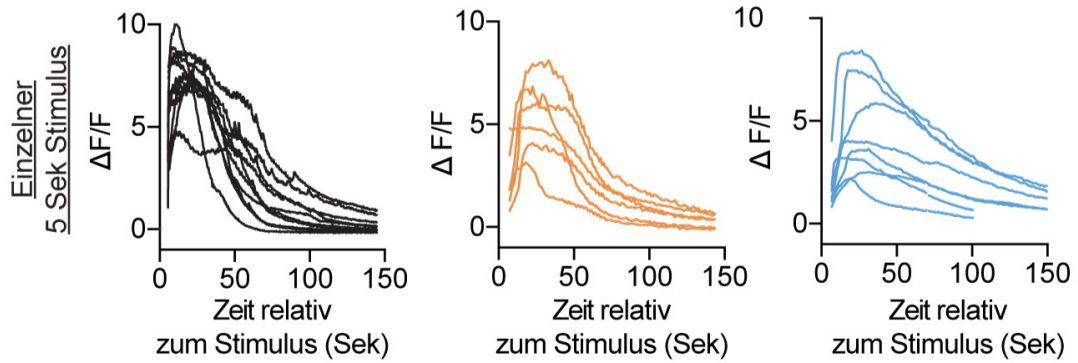
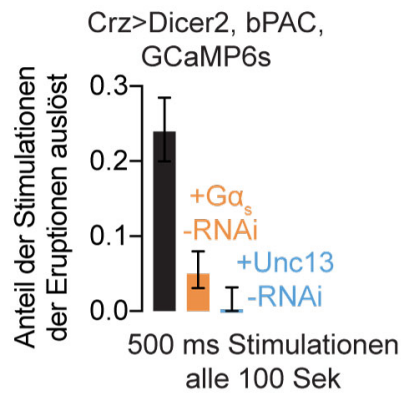
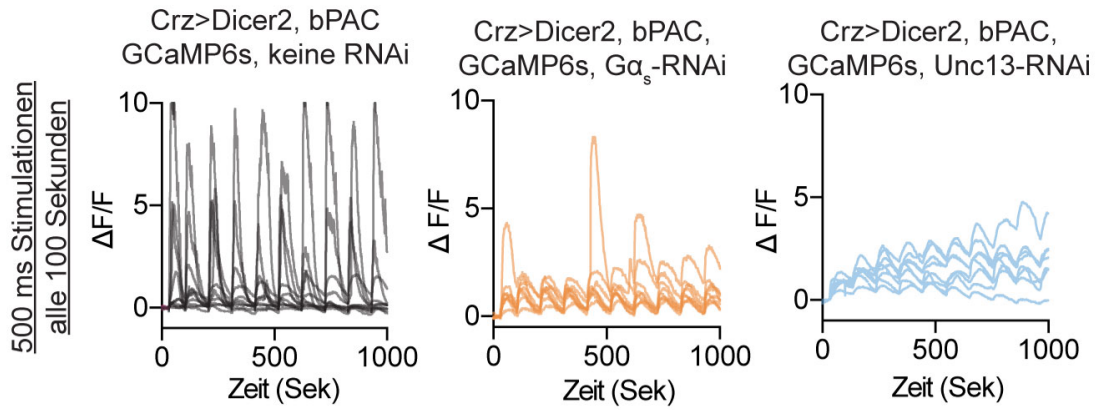


Abbildung 33. bPAC-Stimulation und Kalzium-Bildgebung der Crz-Neurone bei unterbrochener Rückkopplungsschleife

Oben (Zeile 1 und 2): Ohne eine gezielte Herunterregulation spezifischer Gene in den Crz-Neuronen löst etwa jede vierte 500 Millisekunden dauernde bPAC-Stimulation eine Eruption aus (dargestellt in schwarz). Wird hingegen die Expression der stimulatorischen G-Protein-alpha-Untereinheit G_{α_s} in den Crz-Neuronen mittels RNAi verringert, so führt nur noch ein Bruchteil dieser bPAC-Stimulationen zu Eruptionen (dargestellt in orange). Dies könnte auf eine Entkopplung der rekurrenten Aktivität von der cAMP-Produktion zurückzuführen sein. Eine RNAi vermittelte Herunterregulation des synaptischen Proteins Unc13 (dargestellt in blau) führt zu einer fast gänzlichen Blockade typischer Eruptionen, was wiederum auf eine Blockade der rekurrenten Kommunikation zwischen den Crz-Neuronen zurückzuführen sein könnte.

Unten (Zeile 3 und 4): Eine bPAC-Stimulation von 5 Sekunden Länge, welche im Vergleich zu obigen 500 Millisekunden dauernden Stimulationen zu einer deutlich stärkeren cAMP-Akkumulation führt, führt auch im Falle einer Unc13 oder G_{α_s} Herunterregulation zu normal ausgebildeten Eruptionen. Eine ausreichend starke optogenetisch induzierte cAMP-Akkumulation scheint also die cAMP-Produktion als Folge der rekurrenten Aktivität zwischen den Crz-Neuronen ersetzen zu können.

Genetik durch Maximilian Pitsch, Bildgebung durch Dr. Stephen Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Zusammengefasst stützen diese Ergebnisse die These, dass es sich bei Eruptionen um ein netzwerkweites Phänomen handelt, welches auf der Grundlage einer netzwerkinternen Kommunikation und der Akkumulation biochemischer, zellintrinsischer Informationsäquivalente entsteht.

Die während einer Eruption massiv erhöhten Kalzium-Spiegel könnten auch dahingehend für das Crz-Netzwerk von Bedeutung sein, als dass die Crz-Neurone neuropeptiderg sind, und für die Freisetzung neuropeptiderger Dense Core Vesicles oftmals deutlich erhöhte Kalziumspiegel vonnöten sind (Bospoort et al., 2012; Fulop et al., 2005; Shakiryanova et al., 2005). Auf dieser Grundlage könnte spekuliert werden, dass für die Kommunikation innerhalb des Netzwerkes klassische Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin Anwendung finden könnten (eigene Recherchen mittels des Single Cell Sequencing Atlas ergaben, dass die Crz-Neurone die Cholin-Acetyltransferase ChAT exprimieren (Allen et al., 2020)), wohingegen es im Rahmen einer Eruption zu einer Ko-Transmission von klassischen Neurotransmittern und Neuropeptiden kommen könnte.

Trotz ausgiebiger Versuche (**Abbildung 11**) gelang es jedoch nicht, durch genetische Manipulationen auch nur einen einzigen Neurotransmitter oder ein einziges Neuropeptid zu bestimmen, welches für den Output der Crz-Neurone von kritischer Bedeutung wäre. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass, wie von vielen neuropeptidergen Neuronen bekannt, mehrere Neurotransmitter gleichzeitig freigesetzt werden (van den

Pol, 2012). Dies wirft die Möglichkeit funktioneller Redundanz in den Crz-Neuronen auf, lässt jedoch ebenso die Tür für ungewöhnlichere Theorien wie die Sekretion von cAMP selbst offen (Rosenberg, 1992).

Auch wenn nicht klar ist, auf welche Weise das Crz-Netzwerk mit nachgeschalteten Netzwerken kommuniziert, so erklärt das Phänomen der Eruption doch, wie die einzelnen Neurone innerhalb des Netzwerks einen Konsens bezüglich der zu bemessenden Zeit finden. Zugleich stellt die Eruption sicher, dass keines der Neurone dazu in der Lage ist, das Output-Signal zu senden, bevor nicht eben dieser Konsens hergestellt ist (**Abbildung 34**).

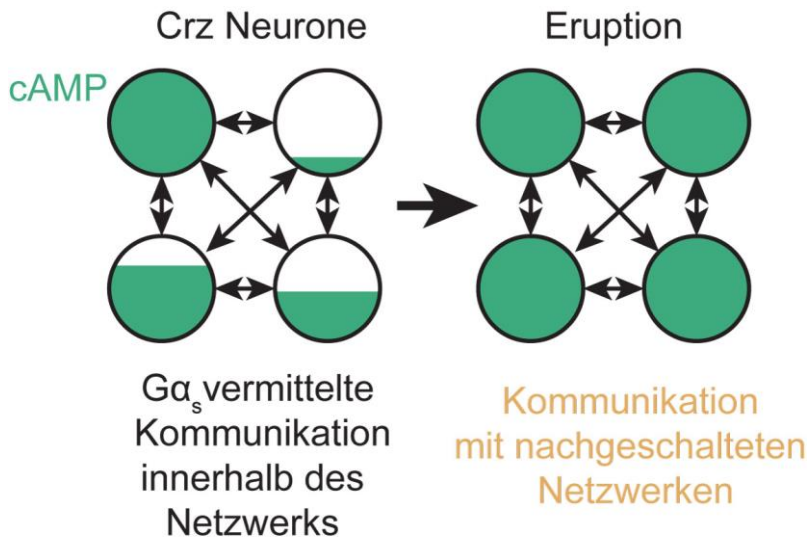


Abbildung 34. Modell der Kommunikation und cAMP-Akkumulation innerhalb des Corazonin-Netzwerks

Schema, welches die positive Rückkopplungsschleife zwischen cAMP und elektrischer Aktivität illustriert. Sobald die intrazellulären cAMP-Konzentrationen einen definierten Schwellenwert überschreiten und dadurch die Eruption auslösen, kommunizieren die Crz-Neurone nicht nur innerhalb ihres eigenen Netzwerks sondern auch mit nachgeschalteten Netzwerken. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

4.5. CaMKII unterdrückt Eruptionen

Die Eruption des Crz-Netzwerks ist das Ergebnis der positiven Rückkopplungsschleife aus der rekurrenten Aktivität zwischen den vier Crz-Neuronen und der Akkumulation von cAMP hin zu einem Schwellenwert. Sie erklärt, wie vier Crz-Neurone mit jeweils

unterschiedlich langen CaMKII-Zeitmessern zu einem Konsens über die verstrichene Zeit gelangen, was zu einer synchronisierten Abgabe des Crz-Signals und zur Umlegung des motivationalen Schalters zu einem zwischen den Neuronen gemittelten Zeitpunkt führt.

Thornquist et al. 2020 war es gelungen, zu zeigen, dass die Crz-Neurone erst dann den motivationalen Schalter umlegen können, wenn die Aktivität der CaMKII ausreichend abgenommen hat. Dies legt nahe, dass eine hohe CaMKII-Aktivität die Aktivität der Crz-Neurone supprimiert, jedoch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CaMKII die elektrische Erregbarkeit der Crz-Neurone nur in sehr geringem Maße beeinflusst (Thornquist et al., 2020). Der Mechanismus, wie die Abnahme der CaMKII-Aktivität die neuronale Aktivität der Crz-Neurone beeinflusst, ist daher nicht bekannt und das Verständnis der Zeitmessfunktion des ersten beschriebenen Intervallzeitmessers CaMKII unvollständig.

Mittels des Hochdurchsatzscreens (**Abbildung 11**) konnte durch den Verfasser dieser Arbeit gezeigt werden, dass zahlreiche Komponenten des cAMP-Signalwegs wie etwa Phosphodiesterasen, die stimulatorische G α -Protein-Untereinheit, Adenylatzyklen, die Proteinkinase A und spannungsabhängige Kalziumkanäle für die Aktivitätsdynamiken der Crz-Neurone von entscheidender Bedeutung sind. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die CaMKII ihre Zeitmessfunktion dadurch umsetzen könnte, dass sie die für eine Eruption notwendige cAMP-Akkumulation verlangsamen oder eine der nachgelagerten Signalwegkomponenten blockieren könnte.

Dieser Hypothese folgend würde das bedeuten, dass die absolute CaMKII-Aktivität als Abschätzung bezüglich der verstrichenen Zeit fungiert, wohingegen die Menge an akkumuliertem cAMP die innerhalb des Crz-Netzwerks gemittelte Evidenz dafür darstellt, dass die zu bemessende Zeit abgelaufen ist.

In diesem Modell würden Neurone mit rasch abfallender CaMKII-Aktivität das Netzwerk zu einer stärkeren Akkumulation von cAMP drängen, wohingegen Neurone mit einer länger erhöhten CaMKII-Aktivität die Akkumulation von cAMP und damit die Eruption verzögern. Zu einem definierten Zeitpunkt wäre die netzwerkweite CaMKII-Aktivität dann nicht mehr dazu in der Lage, die cAMP-Akkumulation in ausreichendem Maße zu unterdrücken, woraufhin die Crz-Neurone sich hinsichtlich der zu bemessenden Zeit abstimmen und synchronisiert „eruptieren“ können.

Im Folgenden werden Ergebnisse vorgestellt, welche diese These untermauern sollen:

Wird ein Disinhibitionsfenster zu einer Zeit appliziert, zu der die vormals erhöhte CaMKII-Aktivität wieder ihr Ausgangsniveau erreicht hat (also z.B. 10 Minuten nach Beginn der Paarung), so ist eine Zeitspanne von 90 Sekunden für eine Akkumulation von cAMP bis hin zu einer Eruption völlig ausreichend (**Abbildung 35**).

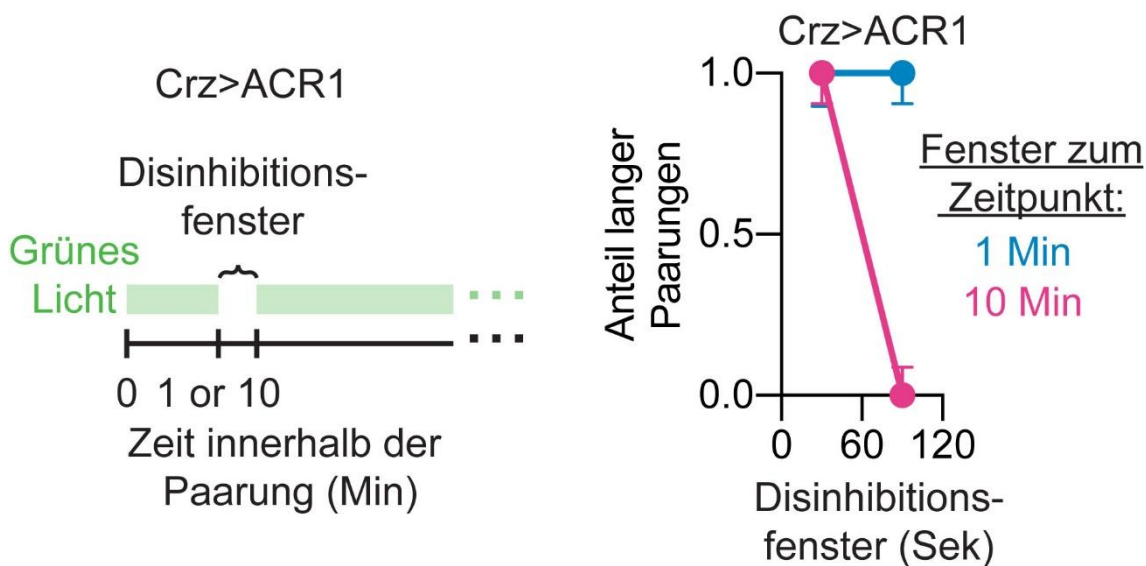


Abbildung 35. Ein zu einem späteren Zeitpunkt ausreichendes Disinhibitionsfenster kann zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität den motivationalen Schalter nicht umlegen

Links: Schema zum Ablauf des rechts durchgeführten Experiments. Es wird entweder bei Minute 1 oder bei Minute 10 ein Disinhibitionsfenster von definierter Länge appliziert.

Rechts: Anteil der langen Paarungen bei Applikation unterschiedlich langer Disinhibitionsfenster 1 Minute nach Beginn der Paarung (blau, hohe intrinsische CaMKII-Aktivität) sowie 10 Minuten nach Beginn der Paarung (rot, niedrige intrinsische CaMKII-Aktivität).

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Wird dagegen ein solches Disinhibitionsfenster zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität, also z.B. 1 Minute nach Beginn des Paarungsaktes, appliziert, so ist dies für eine Eruption niemals ausreichend (**Abbildung 35**).

Interessanterweise konnte diese Unterdrückung von Eruptionen während der ersten Minuten der Paarung selbst dann nicht umgangen werden, wenn zusätzlich mittels blauen Lichts die Photoadenylatzyklase bPAC in den Crz-Neuronen stimuliert wurde, also auf artifizielle Art und Weise die intrazellulären cAMP-Spiegel zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität erhöht wurden (**Abbildung 36**).

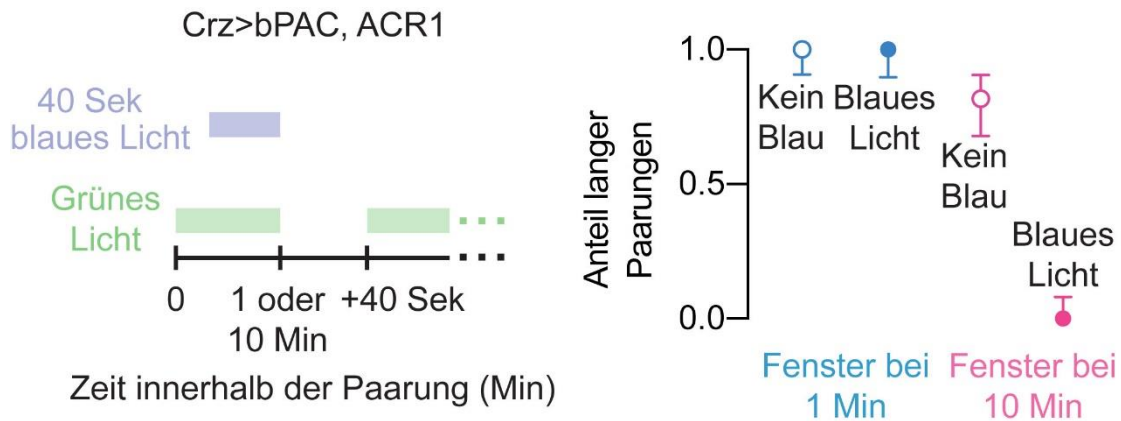


Abbildung 36. Eine bPAC-Stimulation zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität kann keine Eruption induzieren

Links: Schema zum Ablauf des Experiments: Applikation eines 40 Sekunden bemessenden Disinhibitionsfensters 1 Minute (in der rechten Abbildung blau, hohe intrinsische CaMKII-Aktivität) oder 10 Minuten (in der rechten Abbildung rot, niedrige intrinsische CaMKII-Aktivität) nach Beginn der Paarung. Weiterhin wird vor der Gabe des 40 Sekunden Disinhibitionsfensters die Photoadenylylzyklase bPAC für 40 Sekunden stimuliert.

Rechts: Das durch bPAC produzierte cAMP kann in Kombination mit dem 40 Sekunden bemessenden Disinhibitionsfenster nur bei Minute 10 (rot), nicht aber bei Minute 1 (blau) eine Eruption auslösen und damit eine Beendigung der Paarung zu einem normalen Zeitpunkt induzieren. Dies legt nahe, dass die bei 1 Minute nach Beginn der Paarung hohe intrinsische CaMKII-Aktivität die cAMP-Signalkaskade unterdrücken könnte.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine hohe CaMKII-Aktivität entweder, z.B. über eine Aktivierung von Phosphodiesterasen, eine massive Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel induziert, oder aber die CaMKII die Entstehung von Eruptionen auch an solchen Stellen des cAMP-Signalwegs blockiert, welche der Produktion von cAMP nachgeschaltet sind.

Noch deutlicher wurde die supprimierende Rolle der hohen CaMKII-Aktivität auf den cAMP-Eruption-Signalweg, als die konstitutiv aktive CaMKII-Mutante CaMKII-T287D in den Crz-Neuronen exprimiert und bPAC 10 Minuten nach Beginn der Paarung stimuliert wurde, also zu einem Zeitpunkt, an dem die endogene CaMKII-Aktivität niedrig ist. Selbst dutzende Sekunden an bPAC-Stimulation führten nicht regelhaft zu einer Verkürzung der CaMKII-T287D vermittelten Verlängerung der Kopulationsdauer (**Abbildung 37**), die hohe CaMKII-Aktivität verhinderte also erneut, dass das durch bPAC produzierte cAMP eine Eruption auslösen konnte.

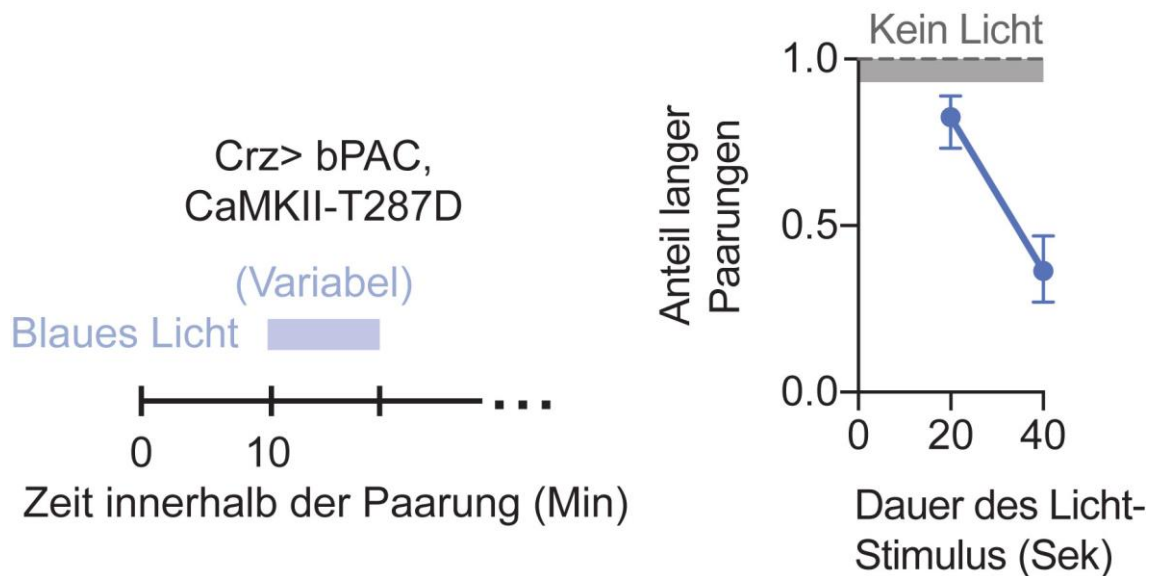


Abbildung 37. Die durch eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII in den Crz-Neuronen verlängerten Paarungsdauern können auch durch bPAC-Stimuli nur teilweise normalisiert werden

Links: Schema zum Ablauf des Experiments: Applikation von bPAC-Stimulationen von variabler Länge zum Zeitpunkt 10 Minuten nach Beginn der Paarung, also zu einem Zeitpunkt niedriger endogener CaMKII-Aktivität. Zusätzlich wird eine konstitutiv aktive Form der CaMKII (CaMKII-T287D) in den Crz-Neuronen überexprimiert.

Rechts: Wird eine konstitutiv aktive Form der CaMKII (CaMKII-T287D) in den Crz-Neuronen überexprimiert, so können selbst lange bPAC-Stimulationen, welche zu einem Zeitpunkt normalerweise niedriger endogener CaMKII-Aktivität appliziert werden, nicht regelhaft eine Eruption triggern und damit zu normalen Paarungsdauern führen.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Nachdem die Überexpression einer konstitutiv aktiven CaMKII nur geringen Einfluss auf die elektrische Stimulierbarkeit der Crz-Neurone besitzt (Thornquist et al., 2020), legt die Zusammenschau dieser Ergebnisse also nahe, dass die CaMKII den Output der Crz-Neurone über eine Supprimierung des cAMP-Signalwegs blockiert.

Um den Einfluss der CaMKII auf den cAMP-Signalweg besser quantifizieren zu können, nutzte Dr. Thornquist im Folgenden die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie, da diese Bildgebungstechnik eine quantitative Abschätzung (Yellen & Mongeon, 2015) der intrazellulären cAMP-Spiegel, und damit auch einen Vergleich der cAMP-Konzentrationen zwischen verschiedenen Fliegen erlaubt.

Wird so mittels des Indikators cADDi_{Green-Down} die Menge an intrazellulärem cAMP mit und ohne Überexpression von konstitutiv aktivem CaMKII in den Crz-Neuronen

verglichen, so kann festgestellt werden, dass die Fluoreszenzlebensdauer bei einer konstitutiv erhöhten CaMKII-Aktivität deutlich geringer ist. Eine hohe CaMKII-Aktivität geht also mit niedrigen cAMP-Spiegeln einher (**Abbildung 38**).

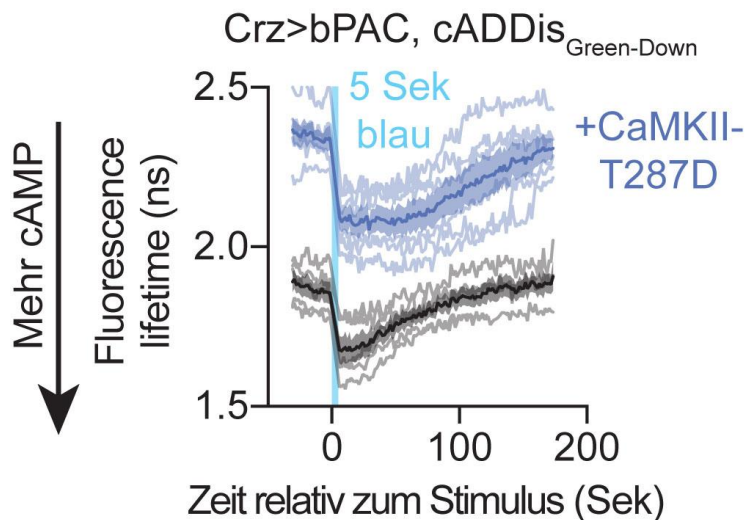


Abbildung 38. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII verringert die basalen cAMP-Spiegel in den Crz-Neuronen so stark, dass selbst mit einer bPAC-Stimulation die normalerweise gemessenen cAMP-Spiegel nicht erreicht werden.

Messung der absoluten intrazellulären cAMP-Konzentration in Crz-Neuronen mit (blau) und ohne (schwarz) Expression der konstitutiven aktiven CaMKII-Mutante T287D nach einer bPAC-Stimulation von 5 Sekunden Länge. Die hohe gemessene Fluoreszenzlebensdauer der CaMKII-T287D exprimierenden Crz-Neurone zeigt niedrige intrazelluläre cAMP-Konzentrationen an, welche selbst bei starker bPAC-Stimulation nicht die basalen, unstimulierten cAMP-Konzentrationen jener Neurone erreichen, welche kein CaMKII-T287D exprimieren. Durchführung durch Dr. Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Zugleich verhinderte eine konstitutiv aktive CaMKII-Überexpression nicht, dass cAMP durch eine bPAC-Stimulation gebildet wird, jedoch sind die durch bPAC-Stimulation erreichbaren cAMP-Spiegel sogar auch dann noch niedriger, als es die cAMP-Spiegel ohne CaMKII-T287D Überexpression und ohne bPAC-Stimulation sind (**Abbildung 38**).

Eine erhöhte CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen könnte also verhindern, dass eine, für die Freisetzung der katalytischen Domäne der Proteinkinase A ausreichende, definierte intrazelluläre cAMP-Konzentration erreicht wird, was den Schwellenwert für die Eruption darstellen und gleichzeitig die Funktionsweise des CaMKII-Zeitmessers erklären könnte.

In Übereinstimmung mit dieser These konnte durch Dr. Thornquist im Rahmen einer ex vivo Präparation mittels einer Überexpression des Proteinkinase A-FLIM-Sensors FLIM-AKAR (Y. Chen et al., 2014a) gezeigt werden, dass eine Überexpression konstitutiv aktiven CaMKIIs zur Folge hat, dass eine bPAC vermittelte cAMP-Produktion zu keinem Aktivitätsanstieg der Proteinkinase A führt (**Abbildung 39**).

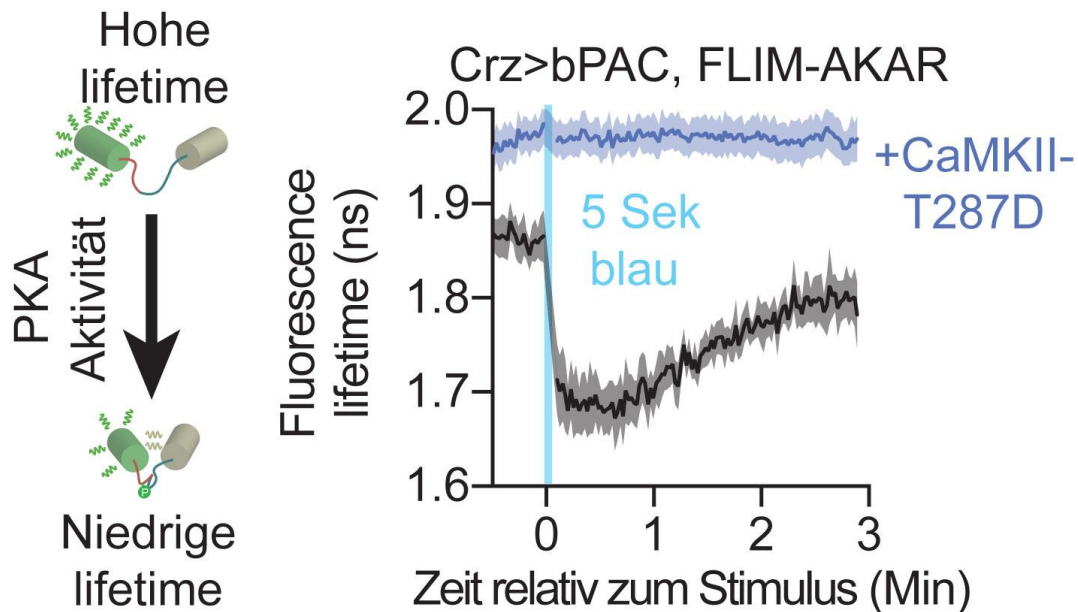


Abbildung 39. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII verringert die basalen cAMP-Spiegel in den Crz-Neuronen so stark, dass selbst mit einer bPAC-Stimulation die PKA-Aktivität nicht gesteigert werden kann.

Links: Schema der Funktionsweise des FLIM-AKAR-Sensors. Ist die PKA-Aktivität hoch so ist die gemessene Fluoreszenzlebensdauer (Fluorescence lifetime) niedrig.

Rechts: Messung der Proteinkinase A-Aktivität mittels FLIM-AKAR in Crz-Neuronen mit (blau) und ohne (schwarz) CaMKII-T287D Expression nach optogenetischer bPAC-Stimulation. Der fehlende Abfall der Fluoreszenzlebensdauer der CaMKII-T287D exprimierenden Neurone (blau), welcher ein Ausbleiben der PKA-Aktivierung auch nach bPAC-Stimulation anzeigt, bestätigt die in **Abbildung 38** gezeigten Ergebnisse, dass eine erhöhte CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen mit drastisch erniedrigten basalen cAMP-Spiegeln einhergeht. Es werden trotz bPAC-Stimulation keine ausreichenden cAMP-Spiegel erreicht, um die PKA-Aktivität zu erhöhen.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Konsequenterweise führt dies dann in diesen Präparationen ebenfalls dazu, dass selbst starke bPAC-Stimulationen keine Eruptionen auslösen, solange die CaMKII-Aktivität erhöht ist (**Abbildung 40**).

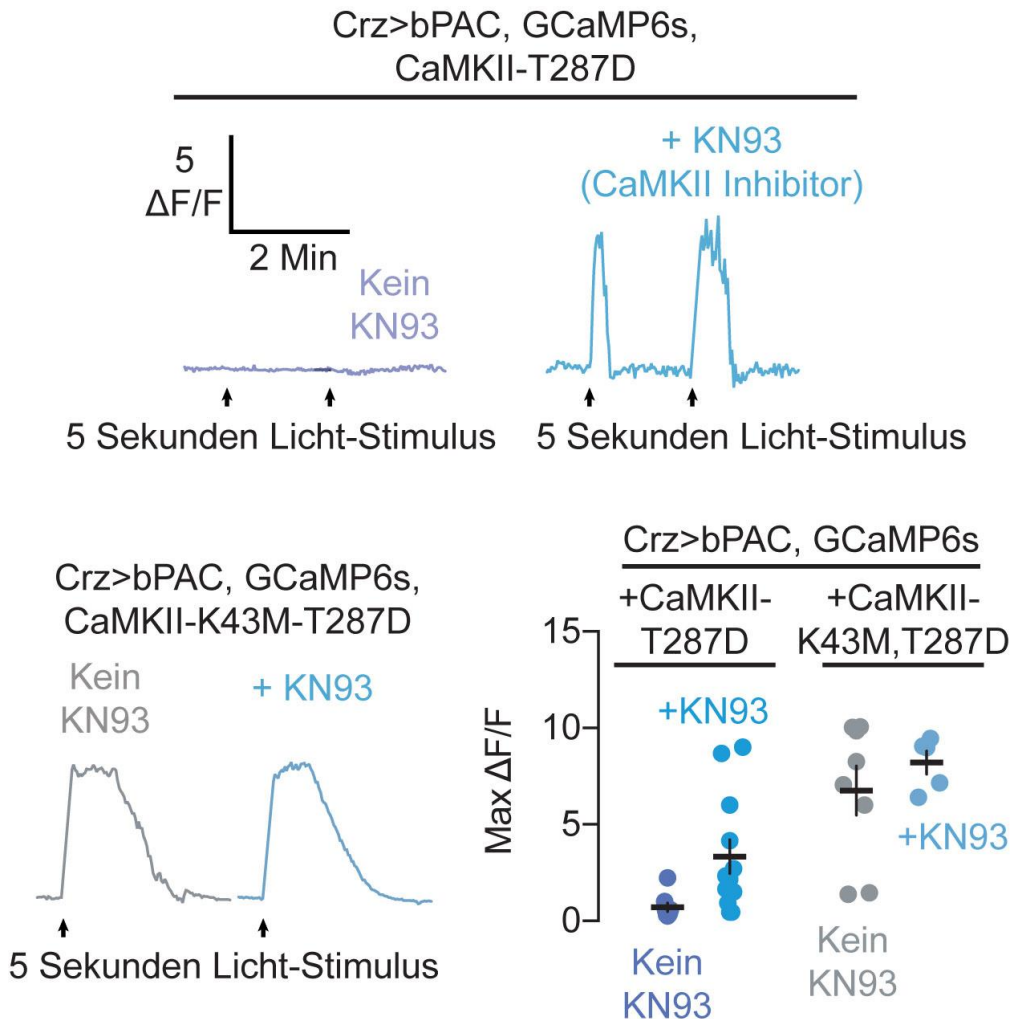


Abbildung 40. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII in den Crz-Neuronen verhindert das Auftreten der durch bPAC-Stimulationen ausgelösten Eruptionen.

Oben links: Wird CaMKII-T287D in den Crz-Neuronen exprimiert, so führt ein 5 Sekunden andauernder bPAC-Stimulus, welcher ohne CaMKII-T287D Expression eine Eruption auslösen würde, zu keinerlei Veränderung der intrazellulären Kalziumspiegel (Beispielkurve eines individuellen Neurons).

Oben rechts: Wird zusätzlich ein pharmakologischer CaMKII-Inhibitor (KN93) in die Perfusionslösung appliziert, so können erneut Eruptionen beobachtet werden (Beispielverlauf eines Neurons).

Unten links: Individuelle Beispielkurven: Wird eine Form der CaMKII überexprimiert, welche zwar aufgrund der T287D Mutation prinzipiell konstitutiv aktiv sein sollte, welche jedoch aufgrund einer K43M Mutation kein ATP hydrolysieren kann, so werden bPAC induzierte Eruptionen nicht unterdrückt (schwarz). Die CaMKII vermittelte Suppression von Eruptionen ist also auf die Kinase-Aktivität CaMKIIs zurückzuführen. Weiterhin

führt eine pharmakologische Inhibition endogenen CaMKIIs zu keiner Formveränderung der bPAC induzierten Eruptionen (blau).

Unten rechts: Quantifizierung der beschriebenen Experimente anhand mehrerer Nervensysteme

Durchführung durch Dr. Thornquist. (Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Wird jedoch die CaMKII-Aktivität in der ex vivo Präparation durch ein Hinzufügen des pharmakologischen CaMKII-Inhibitors KN93 in die, dem Nervensystem umgebende, Saline supprimiert, so kann eine bPAC-Stimulation erneut Eruptionen auslösen (**Abbildung 40**). Das 6 Minuten Intervall, das die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Paarung und der Ejakulation sowie dem motivationalen Schalter festlegt, wird also durch den Zeitmesser CaMKII dadurch implementiert, dass aktives CaMKII die Akkumulation von cAMP solange unterdrückt, bis die CaMKII-Aktivität, gemittelt über alle vier Neurone, soweit abgefallen ist, dass es der netzwerkweiten cAMP-Akkumulation gelingt, den für eine Eruption notwendigen Schwellenwert, vermutlich repräsentiert durch PKA, zu erreichen. Die Eruption selbst ist synchronisiert und führt zur Abgabe des Crz-Output-Signals. (**Abbildung 41**).

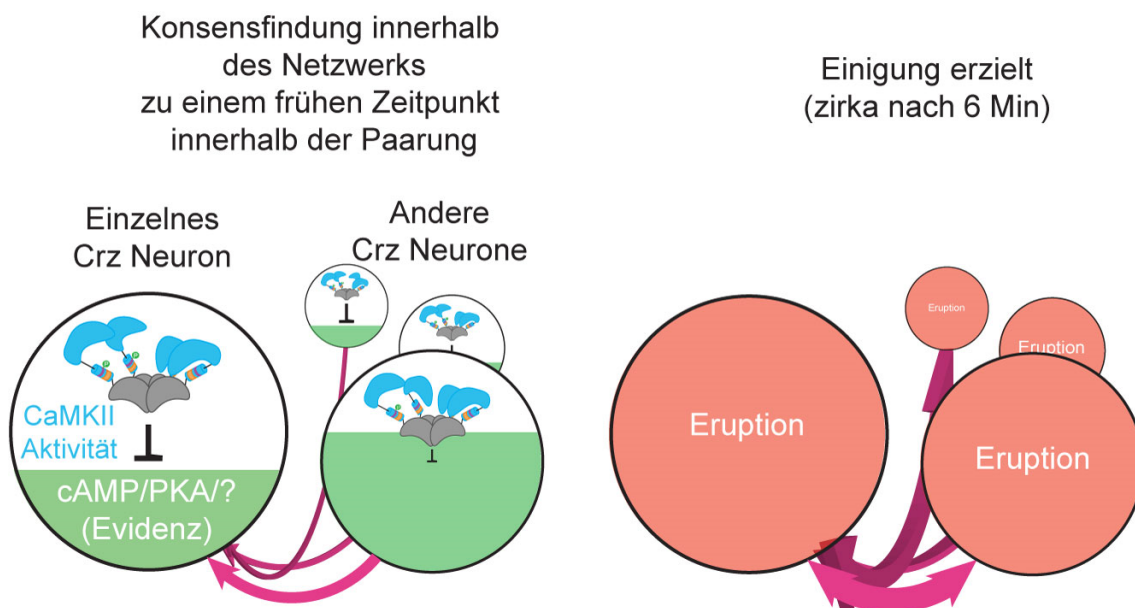


Abbildung 41. Funktionsschema des CaMKII-Zeitmessers

Links: Schema, welches illustriert, wie CaMKII durch eine Blockade der cAMP Signalkaskade Eruptionen hinauszögert.

Rechts: Schema, welches die Synchronität der Eruptionen in allen 4 Crz-Neuronen illustriert, welche auf die rekurrente Aktivität innerhalb des Crz-Netzwerks zurückzuführen ist.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Bezüglich des genauen Mechanismus, wie die CaMKII die Reduktion der cAMP-Spiegel erreicht, kann zwar auf Grundlage der gezeigten Ergebnisse keine sichere Aussage getroffen werden, jedoch ist bekannt, dass die Phosphodiesterase 4 (dunce), deren Herunterregulation im Rahmen des Hochdurchsatz-Screens zu einem verkürzten Disinhibitionsfenster führte (**Abbildung 11**), in ihrer Aktivität durch CaMKII beeinflusst werden kann (Mika et al., 2015). Die PDE4 (dunce) könnte daher das Verbindungselement zwischen CaMKII und cAMP darstellen (**Abbildung 42**).

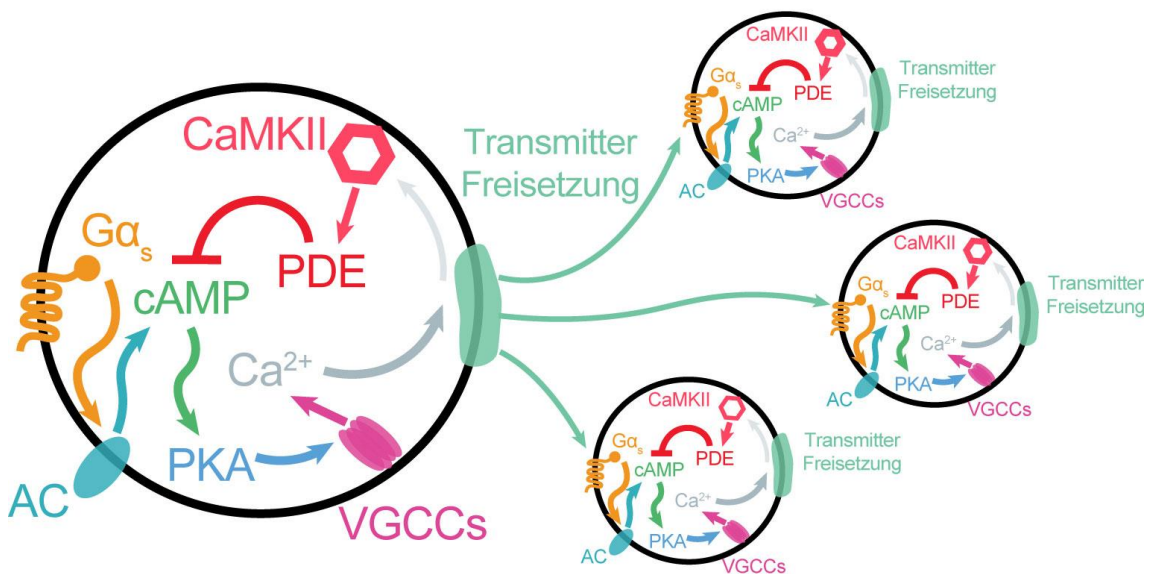


Abbildung 42. Zusammenfassendes Modell der Crz-Neurone

Schema, welches zeigt, wie die Crz-Neurone mittels des cAMP-Signalwegs sowie rekurrenter Aktivität einen Konsens erreichen können und wie CaMKII diese positive Rückkopplungsschleife unterdrücken könnte. Die Aktivierung der stimulatorischen G-alpha-Untereinheit führt zu einer Aktivierung von Adenylatzyklasen, welche daraufhin cAMP produzieren. Erhöhte cAMP-Spiegel führen wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, was zu einem verstärkten Einstrom von Kalzium-Ionen durch spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle führt. Die Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt wiederum zur Ausschüttung von Neurotransmittern, was eine rekurrente Kommunikation zwischen den Crz-Neuronen ermöglicht und wiederum die cAMP-Akkumulation verstärkt. Eine erhöhte CaMKII-Aktivität könnte diese positive Rückkopplungsschleife über eine Stimulation der PDE4 und damit einer Verringerung der cAMP-Spiegel unterdrücken.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

4.6. Die Corazonin-Neurone sind dazu in der Lage, Evidenz über einen langen Zeitraum hinweg zu akkumulieren

Das Prinzip der Evidenzakkumulation ist ein wesentlicher Bestandteil zahlreicher neuronaler Vorgänge, welche dadurch charakterisiert sind, dass Informationen unterschiedlicher Valenz über einen definierten Zeitraum hinweg gesammelt und miteinander verglichen werden. Wie in der Einleitung dieser Arbeit diskutiert, sind die mechanistischen Äquivalente der Evidenzakkumulation, vor allem wenn diese eine Zeitdauer von einigen Sekunden überschreitet, bisher nur in Ansätzen verstanden. Da, wie in **Abbildung 10** bereits gezeigt, die Crz-Neurone positive wie negative Information über eine Zeitdauer von vielen Sekunden netzwerkweit mittels einer Veränderung der cAMP-Spiegel integrieren können, wurde durch den Verfasser dieser Arbeit, mit Unterstützung durch Charlotte Auth, eben jene Informationsintegration näher charakterisiert. Dabei wurde sich auf die Modellierungen von Dr. Thornquist gestützt (s. Methoden), welche eine recht genaue Abschätzung bezüglich des Zeitpunktes der Eruption ermöglichen, da die Paarung zweier Fliegen circa 18 Minuten nach der Eruption endet (**Abbildung 43**).

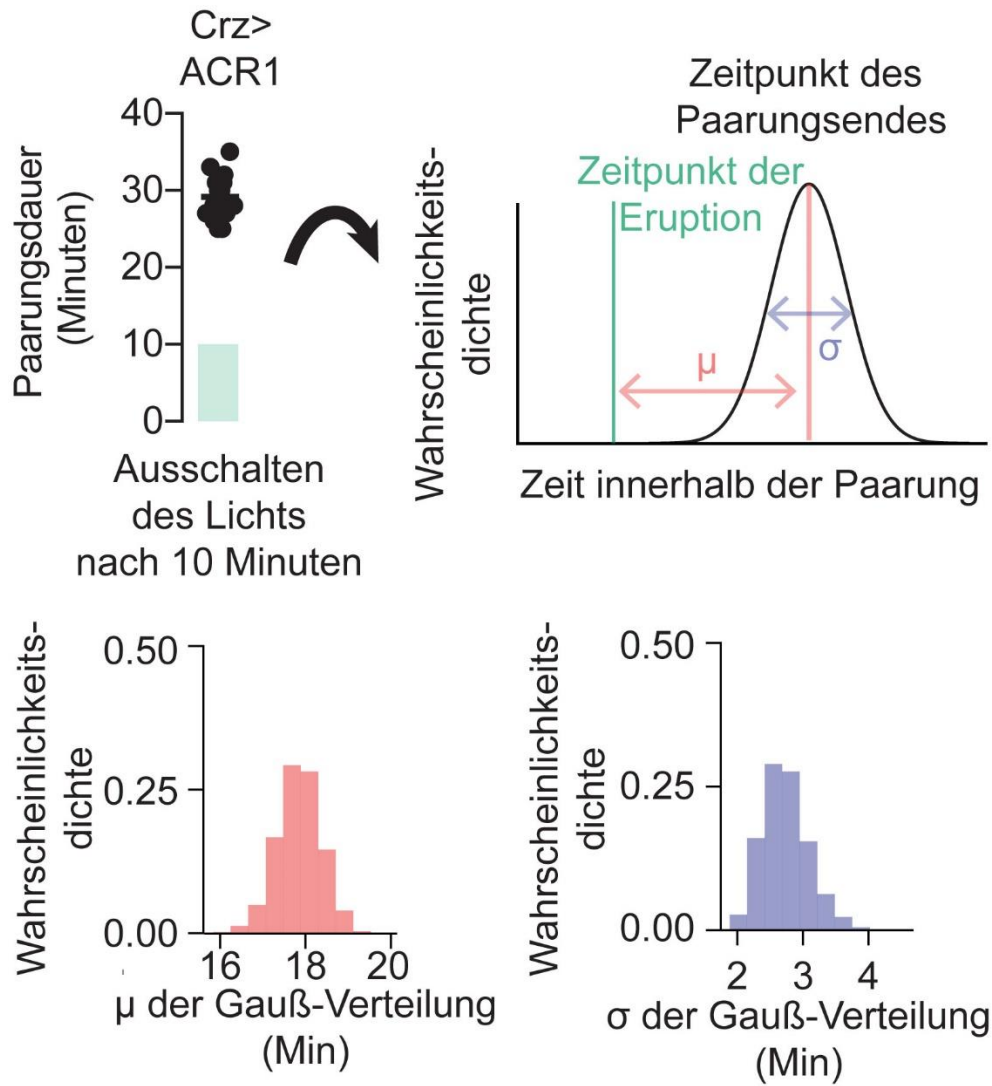


Abbildung 43. Modell der Latenz zwischen Eruption und Paarungsende

Die Zeitspanne, welche zwischen einer Eruption und einer erfolgreichen Beendigung der Paarung liegt, wurde mittels einer Gauß'schen Zufallsvariable modelliert. Im abgebildeten Fall wurden die Crz-Neurone für die ersten 10 Minuten der Paarung inhibiert, sodass etwa zu Minute 11 der Paarung mit einer Eruption gerechnet werden kann (10 Minuten Inhibition + Dauer des Disinhibitionsfenster (ca. 70 Sekunden)), wobei sich die Zeitpunkte der Paarungsbeendigung um den Zeitpunkt 29 Minuten herum verteilen. Die posterioren Verteilungen der Fit-Parameter sind unten links (rot) und unten rechts (violett) abgebildet. Die Latenz von etwa 18 Minuten zwischen der Eruption und der Beendigung der Paarung wurde so auch bei zahlreichen anderen initialen Inhibitionsdauern beobachtet.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Um die Kinetik der Evidenzakkumulation in den Crz-Neuronen zu untersuchen, wurden die Crz-Neurone für eine Zeitdauer von 10 Minuten nach dem Beginn des Paarungsaktes inhibiert. Anschließend wurde die Inhibition der Crz-Neurone für definierte Zeitspannen

intermittierend aufgehoben, also eine Akkumulation positiver Information ($cAMP^{\uparrow}$) ermöglicht, und wiederhergestellt, was einer Integration negativer Information ($cAMP^{\downarrow}$) entspricht. Es wurden also Zyklen positiver wie negativer Evidenzakkumulation von definierter Länge miteinander abgewechselt.

Die Modifikation der Inhibitions- wie Disinhibitions-Zeitspannen führte zu unterschiedlich langen Kopulationsdauern, welche von normalen Kopulationsdauern von etwa 24 Minuten Länge bis hin zu Kopulationsdauern von mehreren Stunden Länge reichten. Jedes definierte Disinhibitions-/Inhibitionsparadigma für sich zeigte jedoch eine robuste Länge, wobei solche Paradigmen, in denen die Inhibitionsblöcke zwischen den einzelnen Disinhibitionsblöcken kürzer waren, zu einer früheren Beendigung der Paarung führten, was auf eine frühere Eruption zurückzuführen ist (**Abbildung 44**).

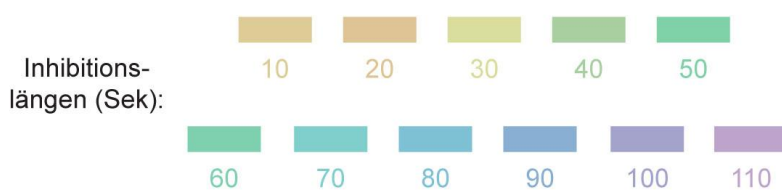
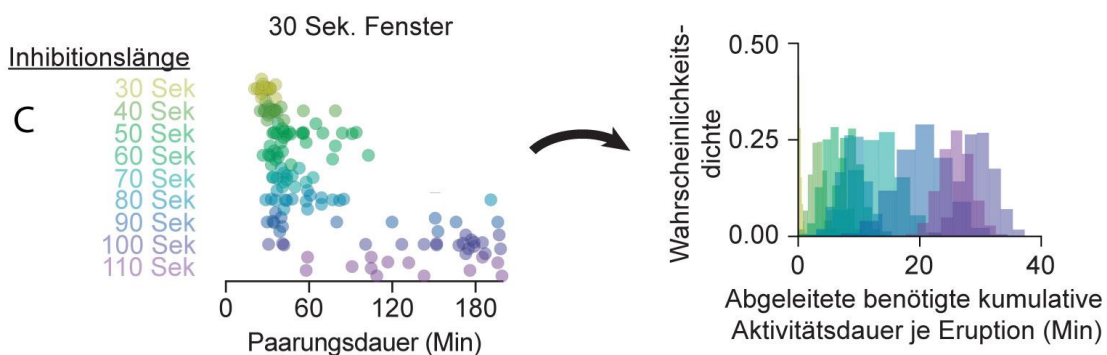
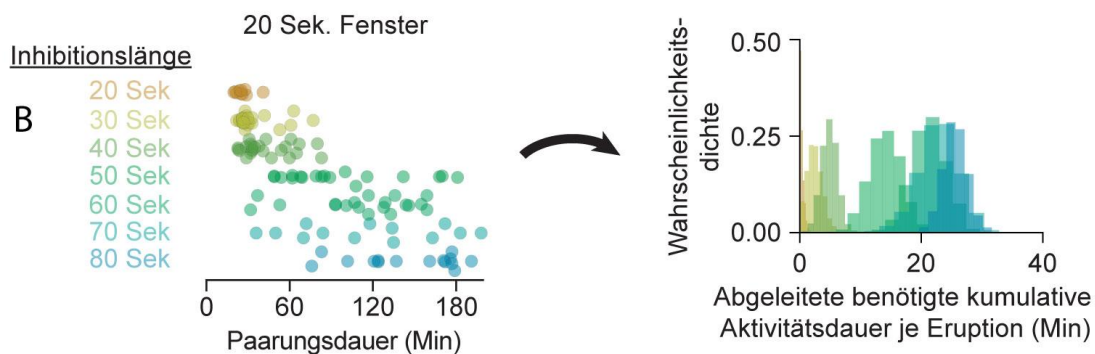
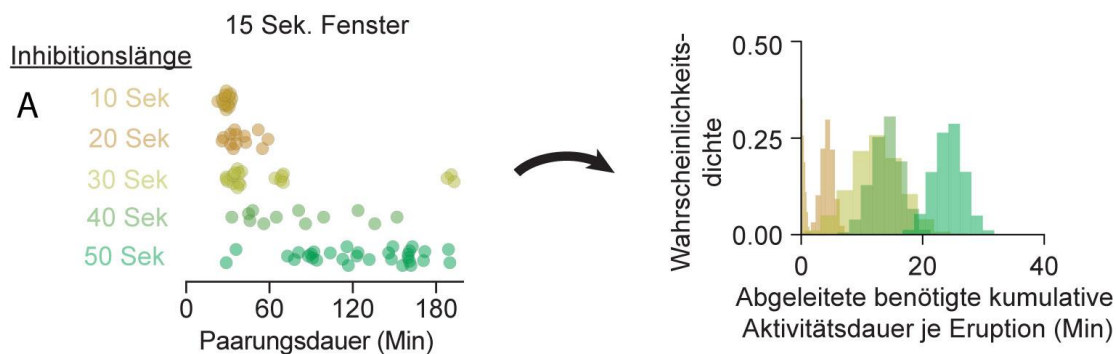
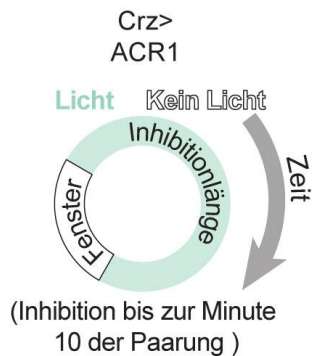


Abbildung 44. Vermessung der Kinetik der Evidenzakkumulation

Oben: Schema, welches die experimentelle Vorgehensweise illustriert. Fliegen, deren Crz-Neurone GtACR1 exprimieren, werden für die ersten 10 Minuten der Paarung durch Exposition gegenüber grünem Licht inhibiert. Diese primäre, 10 Minuten andauernde, Inhibition überbrückt den Zeitraum hoher endogener CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen sicher. Im Anschluss an diese initiale Inhibition wechseln sich definierte Perioden der Disinhibition (Licht aus, im Schema als weißes Fenster abgebildet) mit definierten Perioden der Inhibition (Licht an, im Schema grün markiert) ab. Während der Perioden der Disinhibition akkumulieren die Crz-Neurone cAMP, während der Perioden der Inhibition erfolgt ein Abbau des akkumulierten cAMPs. Erreichen die intrazellulären cAMP-Spiegel den Eruptionsschwellenwert, so wird der motivationale Schalter umgelegt und die Paarung endet mit einer Latenz von etwa 18 Minuten (siehe **Abbildung 43**).

A: Festlegung der wiederkehrenden Disinhibitionsfenster auf eine Länge von 15 Sekunden. Daraufhin Festlegung der intermittierenden Inhibitionsperioden auf eine definierte Länge. So werden in der obersten Reihe Disinhibitionsfenster von 15 Sekunden Länge mit 10-sekündiger Inhibition alterniert, wohingegen in der untersten Reihe die intermittierenden Inhibitionsperioden auf 50 Sekunden ausgedehnt wurden (das 15 Sekunden andauernde Disinhibitionsfenster bleibt gleich). Anhand der gemessenen Kopulationsdauern (X-Achse) zeigt sich, dass sich die Kopulationsdauern proportional zu der Länge der intermittierenden Inhibitionsdauer verlängern (von initial fast normalen Kopulationsdauern auf Kopulationsdauern von über 2 Stunden Länge). Auf dieser Grundlage kann mittels des Modells aus **Abbildung 43** geschätzt werden, wie viele Disinhibitionsfenster nötig waren, damit genug cAMP akkumulieren konnte, um den Eruptionsschwellenwert zu erreichen (siehe Methoden für genauere Beschreibung des Vorgehens). Dieser Schätzwert kann den Abbildungen auf der rechten Seite entnommen werden, welche auf der X-Achse die kumulative benötigte Aktivitätsdauer je Eruption anzeigen.

B: Festlegung der immer wiederkehrenden Disinhibitionsfenster auf eine Länge von 20 Sekunden. Sonst Vorgehensweise wie in A.

C: Festlegung der immer wiederkehrenden Disinhibitionsfenster auf eine Länge von 30 Sekunden. Sonst Vorgehen wie in A.

Unten: Farblgende bezüglich der Längen der intermittierenden Inhibitionsperioden

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Interessanterweise kristallisierte sich über alle Paradigmen hinweg eine konstante Regel heraus: Die positive Evidenz ($cAMP^{\uparrow}$), welche sich während einer Sekunde an erlaubter elektrischer Aktivität ansammelt, wird durch eine Inhibition von vier Sekunden Länge ausgelöscht ($cAMP^{\downarrow}$), ganz gleich, ob die Evidenzblöcke bei Minute 10 oder Minute 60 appliziert werden (**Abbildung 45**).

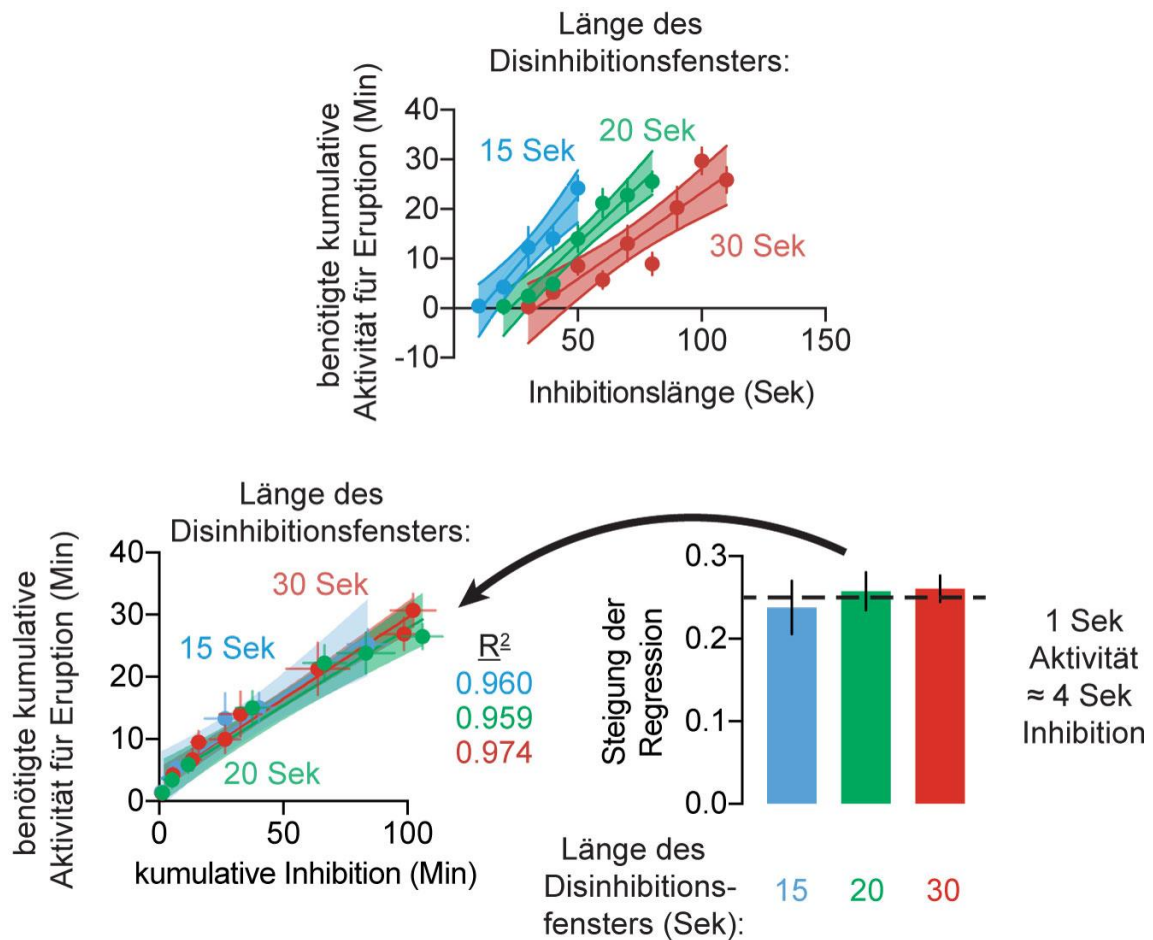


Abbildung 45. Die Analyse der Evidenzakkumulationskinetik zeigt, dass die Evidenz, die während einer Sekunde akkumuliert, nach vier Sekunden an Inhibition vollständig ausgelöscht ist

Oben: Die kumulative Aktivität (Y-Achse), welche je festgelegtem Disinhibitionsfenster (15 Sekunden (blau), 20 Sekunden (grün) und 30 Sekunden (rot)) benötigt wird, um eine Eruption auszulösen, steigt mit zunehmender Inhibitionslänge zwischen den Disinhibitionsfenstern (X-Achse) linear an. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass während der Disinhibitionsfenster cAMP akkumuliert, welches zum Teil während der intermittierenden Inhibition wieder degradiert wird. Je länger die Dauer der intermittierenden Degradation, desto weniger akkumuliertes cAMP pro Disinhibitionsfenster erreicht das nächste Disinhibitionsfenster. Insgesamt werden also mehr Disinhibitionsfenster für die Induktion einer Eruption benötigt (Y-Achse).

Unten links: Auftragung des Verhältnisses zwischen der kumulativen Zeit der Inhibition (X-Achse) und der für eine Eruption benötigten kumulativen Zeit der Aktivität (Y-Achse). Über alle drei definierten Disinhibitionsfenster hinweg zeigt sich eine vergleichbare Steigung von etwa 1:4. Dies bedeutet, dass die während 1 Sekunde an erlaubter elektrischer Aktivität akkumulierte Menge an cAMP (und weiterer Signalweg Komponenten) während einer Inhibition von 4 Sekunden Länge vollständig degradiert wird. Interessanterweise ist die Gültigkeit dieser Regel zu scheinbar jedem Zeitpunkt der Akkumulation gegeben, also sowohl zu Beginn der Akkumulation als auch zu Zeitpunkten kurz vor der Eruption.

Rechts: Auftragung der Steigung der Regression aus den Daten der Abbildung unten links sowie Vergleich der jeweiligen Fenster-Paradigmen (15 Sekunden (blau), 20 Sekunden (grün), 30 Sekunden (rot)).

Genetik, Verhaltensexperimentdurchführung und erste Datenanalyse durch Maximilian Pitsch und Charlotte Auth, finale Datenanalyse und Modellierung der Daten durch Dr. Thornquist

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Die erstaunliche Linearität sowie zeitliche Flexibilität der Informationsintegration in den Crz-Neuronen, sowie die Robustheit des Netzwerk-intrinsischen Schwellenwertes legen nahe, dass der cAMP-Signalweg, in der Form wie er in den Crz-Neuronen Anwendung findet, einen universellen Mechanismus darstellen könnte, wie einzelne Zellen aber auch ganze neuronale Netzwerke Evidenz akkumulieren, speichern, vergleichen und schlussendlich das Ergebnis mit anderen Netzwerken kommunizieren.

5. Diskussion

Diesem Projekt lagen drei Fragestellungen zugrunde, welche in dieser Arbeit experimentell untersucht wurden und die, bevor sie in der nachfolgenden Diskussion im Detail erörtert und eingeordnet werden, an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden sollen.

Zunächst stellte sich die Frage, was das neuronale Äquivalent akkumulierter Evidenz in den Crz-Neuronen darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der second messenger cAMP als biochemisches Äquivalent neuronal akkumulierter Evidenz in den Crz-Neuronen identifiziert werden.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, wie die vier Crz-Neurone ein diskretes Output-Signal hervorbringen können. Dabei wurde das Phänomen der Eruption als zugrundeliegender Mechanismus einer konsensuellen Alles-oder-Nichts-Entscheidung ermittelt.

Weiterhin stellte sich die Frage, wie die CaMKII ihre Zeitmessfunktion in den Crz-Neuronen erreicht. Es konnte gezeigt werden, dass die CaMKII für die Dauer des zu messenden Zeitintervalls die Aktivität der Crz-Neurone unterdrückt, indem es die intrazellulären cAMP-Spiegel niedrig hält.

5.1. Intervall-Zeit-Messung

Die Art und Weise, wie die Abnahme der CaMKII-Aktivität ein beliebiges Zeitintervall vermessen und festlegen kann, erinnert sehr an die Funktionsweise antiker Sand- oder Wasseruhren, da innerhalb einer Zelle das intrazelluläre biochemische Milieu derart angepasst werden kann (Thornquist et al., 2020), dass die Abnahme der CaMKII-Aktivität über die gewünschte Zeitdauer erfolgt, genau wie das von einer Wasseruhr gemessene Zeitintervall durch die Befüllung der Wasseruhr mit einer definierten Menge an Wasser festgelegt werden kann. Während jedoch das Zeitintervall, welches z.B. durch eine Sanduhr vermessen wird, sehr einfach anhand des letzten Sandkorns, welches die Engstelle der Sanduhr passiert, bestimmt werden kann, stellt sich die Bestimmung eines konkreten Endpunktes des CaMKII-Zeitmessers als deutlich

schwieriger heraus, da unklar ist, ob das Äquivalent des letzten Sandkorns z.B. bei 40%, 20% oder sogar 0% der CaMKII-Spitzenaktivität zu finden ist.

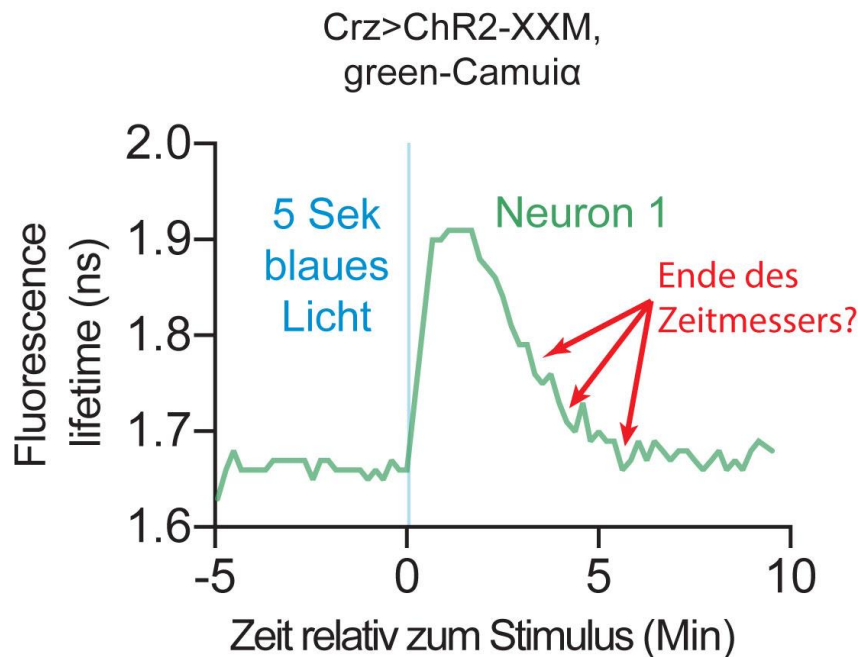


Abbildung 46. Modell zum Ende des CaMKII-Zeitmessers

Modell eines CaMKII-Aktivitätsabfalls in einem Crz-Neuron. Es ist unklar, wann genau der Aktivitätsabfall der CaMKII das Ende der zu messenden Zeitspanne signalisiert.

(Abbildung modifiziert nach (Thornquist, Pitsch et al. 2021))

Anhand des Aktivitätsabfalls von CaMKII kann also nicht vorhergesagt werden, *wann* genau das durch die CaMKII festgelegte Zeitintervall endet. Es ist jedoch weiterhin unbekannt, *wie* die CaMKII die neuronale Aktivität während des zu messenden Zeitintervalls blockiert und *wie* die CaMKII anschließend der Zelle mitteilt, dass das zu messende Zeitintervall verstrichen ist. Soll der Zeitmessmechanismus von CaMKII, dem bis dato einzigen bekannten biochemischen Intervall-Zeitmesser (Thornquist et al., 2020), verstanden werden, so gewinnen Antworten auf diese offenen Fragen auch dahingehend weiter an Bedeutung, dass, wie in der **Abbildung 26** gezeigt, eine große Variabilität hinsichtlich der Abnahmedauer der CaMKII-Aktivität in allen vier Neuronen besteht, obwohl aufgrund des Verhaltens feststeht, dass der Output der vier Crz-Neurone, die Ejakulation und der motivationale Schalter, nur einmalig abgegeben wird. Wie also schaffen es die vier Crz-Neurone mit ihren vier unterschiedlichen CaMKII-Zeitmessern, einen Konsens bezüglich des adäquaten Zeitintervalls zu finden?

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lösen CaMKIIs Mechanismus der Zeitmessung auf: Ist die Aktivität der CaMKII erhöht, so werden die intrazellulären cAMP-Spiegel so verringert bzw. an ihrem Anstieg gehindert, dass die cAMP-Konzentration nicht ausreicht, um die katalytische Domäne der Proteinkinase A aus ihrer Bindung mit der regulatorischen Domäne freizusetzen. Fällt die CaMKII-Aktivität ab, so steigt die cAMP-Konzentration an, was zeigt, dass auf der Ebene der CaMKII keine Notwendigkeit für einen festgelegten Endpunkt des Zeitmessers besteht, da das Verhältnis von CaMKII-Aktivität zu cAMP-Anstiegen keinem Alles-oder-Nichts Prinzip folgt, sondern vielmehr gradueller Natur ist. Die durch erhöhte cAMP-Konzentrationen befreite katalytische Domäne der Proteinkinase A phosphoryliert (vermutlich) spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, was deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht. Dies führt wiederum schlussendlich zu einem erhöhten Kalzium-Einstrom und damit zur Neurotransmission. Der Schwellenwert, der dem Alles-oder-Nichts Prinzip des Crz-Signals am Ende des zu messenden Zeitintervalls zugrunde liegt, ist also nicht das Produkt eines sehr genauen CaMKII-Zeitmessers, sondern wird vielmehr durch die Akkumulation von cAMP hin zu einer definierten Konzentration gebildet, welche notwendig ist, um einen starken Anstieg der Proteinkinase A-Aktivität zu gewährleisten.

Die Akkumulation von cAMP ist dabei das Produkt zweier Komponenten:

Zum einen bedarf es einer grundsätzlichen Tendenz in den Crz-Neuronen, cAMP auch in der Abwesenheit rekurrenter Aktivität innerhalb des Crz-Netzwerks zu bilden. Zwar ist der Ursprung dieser grundlegenden Tendenz zur cAMP-Akkumulation nicht bekannt, jedoch weist der Umstand, dass die Crz-Neurone außerhalb des Paarungskontextes keine Eruptionen aufweisen, darauf hin, dass diese Tendenz das Ergebnis eines kontinuierlich während der Paarung bestehenden Einflusses anderer neuronaler Schaltkreise sein könnte. Diese Tendenz zur cAMP-Akkumulation wird durch die hohe CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen für einige Minuten supprimiert.

Die zweite Komponente der cAMP-Akkumulation ist auf eine positive Rückkopplungsschleife zurückzuführen. Die ansteigenden cAMP-Spiegel führen zu einer vermehrten rekurrenten Aktivität innerhalb des Crz-Netzwerks und damit über Gasgekoppelte Rezeptoren zu einem immer stärkeren Anstieg der cAMP-Spiegel. Diese positive Rückkopplungsschleife erzeugt so hohe cAMP-Konzentrationen, dass ein kritischer Schwellenwert erreicht wird. Dies bedingt einen starken Anstieg der

Proteinkinase A-Aktivität und damit letztlich einen massiven Einstrom von Kalzium. Aufgrund der starken rekurrenten Verbindung zwischen den Crz-Neuronen ist dieser Kalzium-Einstrom synchronisiert, ein Phänomen, das in dieser Arbeit als Eruption definiert wurde. Die Eruption führt schließlich zur Abgabe des Crz-Signals an nachgeschaltete neuronale Netzwerke, was ein Umlegen des motivationalen Schalters sowie die Ejakulation zur Folge hat. Diese Signalvermittlung könnte auf die Ausschüttung von Dense Core Vesicles zurückzuführen sein, da die Crz-Neurone zum einen neuropeptiderg sind und zum anderen Dense Core Vesicles zur Ausschüttung hohe Kalzium-Konzentrationen benötigen (Bospoort et al., 2012; Fulop et al., 2005; Shakiryanova et al., 2005).

Das funktionelle Ineinandergreifen von CaMKII und dem cAMP-PKA-VGCC-Eruptions-Signalweg fungiert also als intrazellulärer, über mehrere Neurone verteilter und zugleich synchronisierter Zeitmesser. Es könnte ein allgemeines Prinzip dafür darstellen, wie Zeit auf der Skala von Sekunden, Minuten und zum Teil sogar Stunden biochemisch repräsentiert und innerhalb sowie zwischen neuronalen Schaltkreisen verarbeitet werden kann. Da sowohl die CaMKII als auch der cAMP-Signalweg im ZNS nahezu ubiquitär vorhanden sind (Tombes et al., 2003) und darüber hinaus eine sehr hohe evolutionäre Konservierung aufweisen (Rothschild et al., 2020), besteht daher die Hoffnung, dass sich dieser Mechanismus der Zeitmessung und Verarbeitung nicht nur auf andere neuronale Schaltkreise innerhalb des Nervensystems von *Drosophila melanogaster*, sondern auch auf andere Organismen, insbesondere *Homo sapiens*, übertragen lässt.

Hinsichtlich der Translatierbarkeit gibt es zwar keine derartig vorbeschriebene Darstellung eines solchen CaMKII-cAMP-Eruptions-Mechanismus zur Zeitmessung, jedoch weisen pankreatische Beta-Zellen interessante Parallelen zu diesem Mechanismus auf. Diese Zellen nutzen ebenfalls eine positive Rückkopplungsschleife zwischen elektrischer Aktivität und cAMP, um eine Synchronisation und Koordination der Insulin-Sekretion zu erreichen (Rorsman & Ashcroft, 2018; Tenner et al., 2020). Weiterhin konnte am Beispiel neonataler neuronaler Netzwerke in Mäusen gezeigt werden, dass auch Neurone in Säugetieren eine über viele Sekunden hinweg bestehende positive Rückkopplung innerhalb von Netzwerken zur Synchronisation nutzen (Allène et al., 2008; Duan et al., 2020).

Hinsichtlich der neuroendokrinen Freisetzung von Hormonen wie GnRH, dem Analogon von Corazonin in Säugetieren, ist bekannt, dass diese einer pulsatilen Rhythmik folgen, doch obgleich der neuronale Schaltkreis der hypothalamischen Schrittmacherneurone relativ gut verstanden ist (Herbison, 2018), ist noch unklar, wie der Abstand zwischen den jeweiligen Ausschüttungsereignissen generiert wird. Der CaMKII-cAMP-Eruptions-Mechanismus könnte hierfür eine mögliche Erklärung liefern.

Vor der Entdeckung, dass die Aktivität der CaMKII als Intervall-Zeitmesser fungieren kann, beruhte die vorherrschende Intervallzeitmessungstheorie auf sogenannten „population clocks“ (Buonomano & Karmarkar, 2002; Buonomano & Mauk, 1994; Thornquist et al., 2020).

In diesen Modellen resultiert die Zeitmessung aus dynamischen Interaktionen innerhalb eines neuronalen Netzwerks, welches aus einer großen Population an Neuronen besteht, da dies die zeitlichen Limitationen der Feuerrate einzelner Neurone kompensieren könnte (Oprisan & Buhusi, 2014). Diese Arbeit schließt natürlich nicht aus, dass derartigen „population clocks“ eine wichtige Rolle in Intervallzeitmessungsprozessen zukommen könnte, jedoch stützt sie mittels der hierin gesammelten experimentellen Evidenz eher eine andere Klasse an Modellen, die der sogenannten „labeled line models“ (Buonomano & Karmarkar, 2002). „Labeled line Modelle“ gehen davon aus, dass Zeitintervalle durch kleinere, definierte neuronale Populationen, wie etwa den Crz-Neuronen, implementiert werden. Eine Kombination dieser „labeled line Modelle“ mit dem Konzept einer intrazellulären, biochemischen Repräsentation der Zeit bietet einige Vorteile. Kleinere neuronale Schaltkreise wären in der Lage, deutlich komplexere Rechenoperationen auszuführen, als ihnen durch „population clock models“ zugetraut wird, was die absolute Rechenkapazität eines Nervensystems deutlich steigern würde. Auch würde dies bedeuten, dass nicht viele Neurone viele Aufgaben parallel bewältigen müssen, was Probleme hinsichtlich einer möglichen Signalinterferenz kreieren könnte. Vielmehr wäre eine ausgeprägte Spezialisierung kleiner neuronaler Schaltkreise möglich.

Das Vorhandensein kompakter, spezialisierter neuronaler Schaltkreise schließt natürlich nicht aus, dass es auch plastische neuronale Netzwerke gibt, die keine Spezialisierung aufweisen und in mehrere Verarbeitungsprozesse gleichzeitig eingebunden sind, vor allem, wenn es sich um erlernte und nicht etwa angeborene neuronale Prozesse handelt. Eine synchronisierte intrazelluläre Akkumulation biochemischer Korrelate von Zeit bzw. Evidenz bietet jedoch noch einen weiteren großen Vorteil, der auch bei zunehmender

Größe der neuronalen Populationen gut skalierbar ist: sie ermöglicht den neuronalen Verarbeitungsprozessen ein hohes Maß an Robustheit. Wenn jedes Neuron eine Kopie des gegenwärtigen Zustands des Verarbeitungsprozesses besitzt, also kein Neuron über einen einzigartigen bzw. unabdingbaren Teil der Information verfügt, dann führt der Verlust oder die Dysfunktionalität einzelner Neurone nicht zu einem gänzlichen Verlust dieser Information. Dies hat zur Folge, dass neuronale Dysfunktionen gut kompensiert werden könnten, was mit dem Konzept verglichen werden kann, dass bei dem Verlust einer einzelnen Zelle kein einzigartiger Teil der DNA verloren geht, da jede Zelle eine Kopie der gesamten DNA-Information besitzt (auch wenn bei dem Tod einer einzelnen Zelle womöglich ein einzigartiges Methylierungsmuster verloren geht).

Das Wesen der Zeit ist für alles Leben von fundamentaler Bedeutung. Einzellige Organismen wie Cyanobakterien nutzen ihr reiches Repertoire an biochemischen Signalwegen (Kondo et al., 1994), um Zeit zu vermessen und in ihre Physiologie zu integrieren, was es ihnen ermöglicht, Vorhersagen über die Zukunft und damit gute Entscheidungen in der Gegenwart zu treffen.

Multizelluläre Organismen wie *Drosophila melanogaster* oder *Homo sapiens* haben einen Großteil dieses biochemischen Repertoires geerbt. Diese Arbeit zeigt, wie ein einzelnes Neuron, obgleich es sich bezüglich seiner Einschätzung mit einer kleinen Anzahl weiterer Neurone austauscht, eine individuelle Einschätzung der Zeit vornimmt.

In der Einleitung wurde dem berühmten Zitat von Einstein „*Zeit ist das, was man an der Uhr abliest.*“ ein Absatz aus dem bekannten Kinderbuch „Momo“ gegenübergestellt:

„Dieses Geheimnis ist die Zeit. Es gibt Kalender und Uhren, um sie zu messen, aber das will wenig besagen, denn jeder weiß, dass einem eine einzige Stunde wie eine Ewigkeit vorkommen kann, mitunter kann sie aber auch wie ein Augenblick vergehen – je nachdem, was man in dieser Stunde erlebt.“

Ein Schluss aus dieser Arbeit könnte sein, dass die Zeit tatsächlich das ist, was man an der Uhr abliest, dass es jedoch die Uhren in unserem Gehirn sind, welche unseren Sinn der Zeit und damit viele Aspekte unseres Verhaltens formen, wohingegen externe Uhren nur wenig besagen.

5.2. Evidenzakkumulation als Grundlage der Entscheidungsfindung

Die Akkumulation von Evidenz ist ein wesentlicher Bestandteil der Entscheidungsfindung. Es ist jedoch kaum verstanden, was das Äquivalent von Evidenz im Gehirn ist, wo dieses lokalisiert ist, und wie dieses verarbeitet wird. Das klassische experimentelle Paradigma zum Studium der Evidenzakkumulation, sogenannte „direction discrimination task“-Studien in Primaten, ermöglicht zwar eine Korrelation der Feuerrate bestimmter Neurone in spezifischen Hirnregionen wie dem lateralen intraparietalen Kortex mit bestimmten Evidenzakkumulationstests. Der Mechanismus der Evidenzintegration sowie die Rolle des lateralen intraparietalen Kortex innerhalb des Prozesses der Evidenzakkumulation ist jedoch unklar (Huk et al., 2014; M. N. Shadlen & Kiani, 2013).

Während sich Fragen der Kausalität im Allgemeinen zwar nur bedingt mittels Korrelationsstudien von neuronalen Aktivitätsmustern und Verhaltenstests endgültig werden klären lassen, so wird dies noch weiterhin dadurch erschwert, dass sich ein wesentlicher Teil der neuronalen Entscheidungsfindung auf Zeitskalen von Sekunden bis Stunden ereignet, welche die Zeitskalen unserer persönlichen Erfahrung darstellen. Diese Zeitskalen sind zum Teil einige Größenordnungen größer als die maximale elektrische Integrationskapazität von Neuronen, welche sich eher im Millisekundenbereich befindet (Bahl & Engert, 2020; Waskom & Kiani, 2018). Dies wirft die Frage auf, ob eine elektrische Integration von Evidenz auf diesen Zeitskalen unter der Berücksichtigung der elektrischen Eigenschaften von Neuronen überhaupt möglich ist.

Diese Arbeit stellt die sogenannte Eruption vor, ein Mechanismus, welcher die Akkumulation, Speicherung und Kommunikation von Evidenz auf Zeitskalen von Sekunden bis Stunden mittels des cAMP-Signalweges ermöglicht. Dabei stellt cAMP selbst die zentrale „Währung“ der Evidenzverarbeitung, vom Verfasser dieser Arbeit im Englischen auch als „computational currency“ bezeichnet (Thornquist, Pitsch et al., 2021), dar.

Innerhalb des Crz-Netzwerks in *Drosophila melanogaster* orchestriert die Eruption, die zwar örtlich distribuierte, jedoch zugleich synchronisierte Akkumulation von Evidenz bezüglich der Frage, ob eine ausreichende Zeitspanne verstrichen ist, und führt zugleich, so diese Frage schlussendlich bejaht werden kann, zur Kommunikation dieses Ergebnisses an nachgeschaltete Netzwerke. Wird das Prinzip der Eruption auf andere

Evidenzakkumulationssysteme übertragen, so könnte der Eruptionsmechanismus, wie er in den Crz-Neuronen vorliegt, Antworten auf die drei zentralen Aspekte von „bounded drift diffusion models“ geben, welche den vorherrschenden theoretischen Unterbau bezüglich der Akkumulation von Evidenz darstellen (Ratcliff et al., 2016):

1. Hinsichtlich der Rate der Evidenzakkumulation, deren Durchschnitt als „drift rate“ bezeichnet wird, konnte anhand der Crz-Neurone auf experimentelle Art und Weise gezeigt werden, dass diese durch viele Komponenten, etwa der CaMKII-Aktivität, der elektrischen Aktivität innerhalb des Netzwerks, der $G\alpha_s$ -Aktivität, der Phosphodiesterase-Aktivität und wahrscheinlich viele weitere beeinflusst wird. Aufgrund der ubiquitären Expression des cAMP-Signalweges könnte cAMP ein geeignetes Evidenz-Äquivalent in vielen weiteren Evidenzakkumulationsnetzwerken darstellen, wobei die „drift rate“ durch eine große Anzahl an intra- und extrazellulären Interaktionen modifiziert werden kann.

2. Die basalen cAMP-Spiegel innerhalb der Crz-Neurone stellen wiederum einen Startpunkt für Evidenzakkumulationsprozesse dar. Startpunkte sind in bounded drift diffusion Modellen von großer Bedeutung, da so eine vorbestehende Neigung in den Entscheidungsprozess implementiert werden kann. In den Crz-Neuronen stellt die zu Anfang sehr hohe CaMKII-Aktivität eine solche Neigung dar, da auf diese Weise die cAMP-Spiegel auf einem niedrigen Niveau starten und zunächst auch verbleiben. Eine derartige Neigung könnte jedoch auch auf noch direktere Art und Weise über eine Beeinflussung der Adenylatzyklasenaktivität oder Phosphodiesterasenaktivität ausgedrückt werden, was unter anderem mittels einer Herunterregulation der Phosphodiesterase *dunce* oder einer Überexpression der Adenylatzyklase *AC3* experimentell gezeigt werden konnte (**Abbildung 13**).

3. Schwellenwerte legen innerhalb von bounded drift diffusion Modellen fest, wie viel Evidenz akkumuliert werden muss, bevor eine Entscheidung getroffen werden kann. Die Eruption stellt eine solche Alles-oder-Nichts Entscheidung dar, indem sie die auf einen Schwellenwert zu akkumulierenden cAMP-Spiegel bei Erreichen dessen in einen massiven, über das gesamte Netzwerk synchronisierten, Kalzium-Einstrom übersetzt. Zwar kann anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten der exakte Mechanismus dieser, dem Schwellenwert innewohnenden, Nichtlinearität nicht eindeutig bestimmt werden, jedoch scheinen das Aktivitätsniveau der Proteinkinase A sowie spannungsgesteuerte

Kalzium-Kanäle hinsichtlich der Festlegung des Schwellenwertes von großer Bedeutung zu sein. Dies lässt sich daraus ableiten, dass die hohe CaMKII-Aktivität in den Crz-Neuronen die Akkumulation von cAMP derart unterdrückt, dass die vorhandenen cAMP-Spiegel nicht ausreichend sind, um die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A freizusetzen (**Abbildung 39**). Die Bindungsaffinität der regulatorischen Proteinkinase A-Domäne könnte daher also eine mögliche Antwort auf die Frage darstellen, wie Schwellenwerte für biologische Entscheidungsprozesse festgelegt werden könnten.

Weiterhin zeigt die **Abbildung 45**, dass die drift rate der Evidenz, repräsentiert durch die Akkumulationsrate von cAMP, eine erstaunliche Linearität in den Crz-Neuronen aufweist: Eine Sekunde an Stimulation wird durch vier Sekunden an Inhibition aufgehoben. Diese Regel trifft über alle Zeitpunkte der Evidenzakkumulation hinweg zu, ganz gleich, ob sich die bereits akkumulierte Evidenz nahe oder fern des Eruptions-Schwellenwertes befindet. Diese Eigenschaft könnte es Evidenzakkumulationsneuronen wie den Crz-Neuronen erlauben, die stetig neu eintreffende Evidenz auf immer gleiche Weise zu integrieren, sodass der gleichen Evidenz, obgleich sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten eintrifft, das gleiche Gewicht hinsichtlich des Entscheidungsprozesses zukommt.

Es spielt also keine Rolle, wann oder in welcher Reihenfolge die Evidenz eintrifft, was mit der Wertigkeit eines Tores in einem Fußballspiel verglichen werden kann, welchem ebenfalls dieselbe Wertigkeit innewohnt, ganz gleich, ob es sich um das zweite Tor oder das fünfte Tor handelt, oder ob es direkt nach Anpfiff oder kurz vor Abpfiff erzielt wird.

Die alternierenden Inhibitions- und Stimulationsexperimente der **Abbildung 44** demonstrieren jedoch noch einen weiteren wichtigen Aspekt hinsichtlich der Evidenzakkumulation, welcher von bounded drift diffusion Modellen manchmal vernachlässigt wird: Die Präsenz einer Evidenz-Vergessensrate über die Zeit. Diese ist für eine Optimierung der augenblicklichen Entscheidung eines Evidenzakkumulationsnetzwerks von Bedeutung, da eine Evidenz, welche vor einer langen Zeit akkumuliert wurde, für die Gegenwart einen Teil ihrer Bedeutung verlieren kann. Obgleich also, vergleichbar mit den Toren in einem Fußballspiel, die eintreffende Evidenz dieselbe Größe besitzt, ganz gleich in welcher Reihenfolge oder zu welchem Zeitpunkt sie eintrifft, so nimmt die Wertigkeit dieser Evidenz dennoch über die Zeit auf lineare Art und Weise ab, was man von der Wertigkeit von Fußballtoren nicht sagen kann.

Die neuronale Akkumulation von Evidenz wurde und wird zumeist am Beispiel der Akkumulation sensorischer Evidenz studiert (Gorea, 2015; Huk & Meister, 2012; Najafi & Churchland, 2018). Das Crz-Netzwerk akkumuliert dagegen Evidenz bezüglich der Frage, wie viel Zeit verstrichen ist. Diese Art der Evidenz ist im Gegensatz zur perceptiven Evidenz von internaler Natur, und als solche eng mit dem Gedächtnis sowie motivationalen Zuständen verknüpft (M. N. N. Shadlen & Shohamy, 2016). Eruptionen sind jedoch auch in neuronalen Schaltkreisen denkbar, welche sensorische Evidenz akkumulieren. So zeigen etwa Aktivitätsmessungen an Neuronen des lateralen intraparietalen Kortex von Primaten während der Durchführung von sensorischen Evidenzakkumulationstests zwar über mehrere Messungen gemittelt ein graduelles Ansteigen neuronaler Aktivität (Roitman & Shadlen, 2002b; M. N. Shadlen & Newsome, 2001b), bei der Betrachtung einzelner Messungen fällt jedoch auf, dass ein großer Teil der Neurone vielmehr abrupte Aktivitätssprünge aufweist (Latimer et al., 2015; Zylberberg & Shadlen, 2016), welche an das Erreichen des Schwellenwerts einer Eruption erinnern. Die eigentliche, graduelle, Evidenzakkumulation könnte also, so wie am Beispiel der Crz-Neurone gezeigt, vielmehr in Form einer cAMP-Akkumulation stattfinden, welche für die klassischen neuronalen Messmethoden, welche auf einer Änderung von Kalzium oder elektrophysiologischen Messungen basieren, unsichtbar ist. Wird das Konzept der intrazellulären Informationsspeicherung sowie Verarbeitung auf Intervallzeitskalen weitergedacht, so könnte man die Akkumulation von cAMP auch als „activity-silent memory“ (Stokes, 2015) bezeichnen. Der Mechanismus der Eruption könnte daher auch für das Studium des Kurzzeitgedächtnisses von Interesse sein, vor allem, da die Bedeutung des cAMP-Signalwegs für die Formierung eines (Kurzzeit)-Gedächtnisses sowie erfolgreichem Lernen in verschiedenen Kontexten demonstriert und lokalisiert wurde (Connolly et al., 1996; Drain et al., 1991; Schwaerzel et al., 2002; Thum et al., 2007; Wustmann et al., 1996; Zars et al., 2000).

Jüngste Erfolge hinsichtlich der Entwicklung neuartiger, cAMP-basierter, optogenetischer (Stierl et al., 2011; Yang et al., 2021) Werkzeuge sowie neuartige cAMP-Signalweg-Indikatoren (Y. Chen et al., 2014b; Tewson et al., 2016) ermöglichen eine ungekannt detaillierte Entschlüsselung der Echtzeitfunktion von cAMP.

Es wird sich daher zeigen müssen, ob cAMP oder andere intrazelluläre Second-Messenger-Systeme tatsächlich universelle Äquivalente intrazellulärer Evidenz-Speicherung sowie Evidenz-Verarbeitung („computational currencies“) auf Zeitskalen

von Millisekunden bis Stunden darstellen, oder ob nicht doch die schiere Anzahl an Neuronen und die Komplexität der elektrischen Feuermuster, die dem Gehirn von Säugetieren zur Verfügung stehen, die Grundlage dieser Phänomene in Säugetiergehirnen darstellt.

5.3. Die Eruption – ein Aktionspotenzial für Netzwerke?

In dem berühmten Buch "23 Problems in Systems Neuroscience" fragte der führende theoretische Neurowissenschaftler Laurence Frederick Abbott: "Where are the switches on this thing?" (Abbott, 2006) und bezog sich damit auf die ungelöste Frage, wie das Gehirn Alles-oder-Nichts-Entscheidungen trifft.

Bevor jedoch derartige Alles-oder-Nichts-Entscheidungen von einem neuronalen Netzwerk getroffen werden können, müssen die Neurone innerhalb dieses Netzwerks zunächst Inputs anderer neuronaler Netzwerke verarbeiten und dann miteinander in Austausch treten, um so einen Konsens bezüglich der Entscheidung zu finden. Es ist dabei von großer Bedeutung, dass diese Intra-Netzwerk-Kommunikation strikt von der Kommunikation mit nachgeschalteten Netzwerken getrennt ist, da sonst verfrühte oder partielle Reaktionen ausgelöst werden könnten (Elsayed et al., 2016; Kaufman et al., 2014; Yoo & Hayden, 2020).

Darüber hinaus müssen jene Neurone, welche darüber entscheiden, ob und wann eine Alles-oder-Nichts Entscheidung getroffen wird, dazu in der Lage sein, die bezüglich der Entscheidung relevante Evidenz über einen definierten Zeitraum hinweg zu verarbeiten, welcher den langen Zeitskalen vieler Entscheidungsprozesse entspricht (Waskom & Kiani, 2018).

In individuellen Neuronen löst das Aktionspotenzial vergleichbare Probleme auf viel kürzeren Zeitskalen. Es wägt positive und negative Inputs gegeneinander ab, und führt bei Erreichen eines definierten Schwellenwerts zu einer plötzlichen Aktivitätsspitze. Ein mechanistisches Äquivalent des Aktionspotenzials für neuronale Netzwerke und für Intervallzeitskalen ist, nach bestem Wissen des Verfassers dieser Arbeit, nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde mit der Eruption ein neuartiger Mechanismus vorgestellt, der auf miteinander verwobenen biochemischen und elektrischen Prozessen beruht und das

Problem der Alles-oder-Nichts-Entscheidungen sowohl auf der Netzwerkebene als auch über Intervallzeitskalen hinweg lösen könnte.

Die Eruption wird dabei in ihrer einfachsten Form als schwellenwertabhängiger, drastischer Anstieg rekurrenter Netzwerkaktivität definiert, welcher ein Netzwerk dazu befähigt, von der Kommunikation innerhalb des Netzwerks auf eine Kommunikation mit anderen, nachgeschalteten Netzwerken umzuschalten.

Sollten Eruptionen tatsächlich von Bedeutung sein, so könnte dies zu einer veränderten Betrachtungsweise neuronaler Aktivität führen.

Jüngste Fortschritte bei der Messung neuronaler Aktivität in großen Neuronenpopulationen in verschiedenen Hirnregionen ermöglichten die durch mehrere Gruppen gemachten Beobachtungen, dass ein erstaunlich großer Teil der Neurone in fast allen Hirnarealen bei vielen verschiedenen Tätigkeiten Anzeichen von Aktivität aufweist (Kaplan & Zimmer, 2020; Kauvar et al., 2020; Schaffer et al., 2021; Stringer et al., 2019).

Dies führte zu der Hypothese, dass ein enormer Anteil des Gehirns für jede dieser Tätigkeiten von Bedeutung ist. Viele Neurone teilen sich also viele Aufgaben gleichzeitig.

Derartige Hypothesen stehen jedoch in erheblichem Widerspruch zu den starken Verhaltenseffekten, welche beobachtet werden können, wenn kleine, aber scheinbar spezialisierte Untergruppen von Neuronen wie die AGRP-Neurone im Gehirn von Säugetieren manipuliert werden (Aponte et al., 2011; Wu et al., 2009). Die Manipulation anderer Teile des Gehirns, deren Aktivität ebenfalls mit den untersuchten Tätigkeiten korreliert, scheint dagegen keine Auswirkungen auf das Verhalten zu haben.

Zwar kann nicht ausgeschlossen werden kann, dass diesen "Zuschauerneuronen" eine lediglich verborgene Funktion hinsichtlich der untersuchten Tätigkeit innewohnt, jedoch könnte das Eruptionskonzept eine alternative Erklärung für die ubiquitär beobachtete neuronale Aktivität anbieten:

Vielleicht ähnelt die korrelierende neuronale Aktivität, die in vielen verschiedenen Hirnregionen gemessen werden kann, weniger einer Art spezialisiertem neuronalen Code, sondern stellt vielmehr eine Intra-Netzwerk-Aktivität unterhalb eines Eruptionsschwellenwertes dar, welche, so dieser Schwellenwert nicht in näherer Zeit erreicht wird, von nur eingeschränkter Bedeutsamkeit ist.

Sollte dies zutreffen, so könnten Eruptionen dabei helfen, zwischen mehr und weniger aussagekräftigen Daten zu unterscheiden, und uns so zu einem besseren Verständnis darüber verhelfen, wo und wie unser Gehirn die Herausforderungen unseres täglichen Lebens meistert.

6. Zusammenfassung / Summary

Die vier Crz-Neurone des ventralen Nervensystems von *Drosophila melanogaster* sammeln Evidenz, wann im Rahmen eines Paarungsakts zirka 6 Minuten vergangen sind. Diese Entscheidung ist für die männliche Fliege von Bedeutung, da das Männchen vor Ablauf dieser ~6 Minuten, welche den Zeitpunkt der Ejakulation darstellen, eher das eigene Leben opfern würde, als dass es die Paarung beenden würde. Nach Ablauf der ~6 Minuten fällt die Motivation des Männchens dagegen dramatisch ab.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mittels optogenetischer neuronaler Inhibitionsprotokolle sowie Verhaltensanalysen das Phänomen der Evidenzakkumulation in den Crz-Neuronen genauer charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die akkumulierte Evidenz auch während einer elektrischen Inhibition der Crz-Neurone persistierte. Dieses Ergebnis warf die Hypothese auf, dass das Äquivalent der akkumulierten Evidenz in den Crz-Neuronen biochemischer Natur sein könnte. Es wurde daraufhin ein Hochdurchsatzscreening-Verfahren entwickelt, mittels dessen 1388 genetische Manipulationen der Crz-Neurone durchgeführt und auf eine Änderung der Evidenzakkumulation getestet wurden. Nur ~30 genetische Manipulationen zeigten eine veränderte Evidenzakkumulation, wobei die meisten dieser Manipulationen den cAMP-Signalweg betrafen. Mittels der optogenetischen Photoadenylatzyklase bPAC, einer Reihe weiterer genetischer Manipulationen des cAMP-Signalwegs sowie der ex vivo Kalzium-Bildgebung und Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie konnte bestätigt werden, dass cAMP das Äquivalent der in den Crz-Neuronen spannungsabhängig akkumulierten Evidenz darstellt, wobei die Kombination dieser Methoden nahelegte, dass der Schwellenwert der Evidenzakkumulation durch die cAMP-Bindungsaffinität der regulatorischen PKA-Untereinheiten festgelegt sein könnte. Mittels genetischer Mosaikexperimente sowie bildgebenden Verfahren konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass innerhalb des Crz-Netzwerks eine positive Rückkopplungsschleife aus rekurrenter Aktivität sowie der cAMP-Akkumulation besteht, welche, sobald die cAMP-Spiegel den Schwellenwert erreichen, zu einem netzwerkweit synchronisierten massiven Kalziumeinstrom führt, was die Abgabe des Crz-Signals an nachgeschaltete Netzwerke triggert. Dieses Phänomen könnte ein Analogon des Aktionspotenzials auf Netzwerkebene sowie auf Intervallzeitskalen darstellen und wurde als „Eruption“ bezeichnet. Genetische, optogenetische sowie Bildgebungsexperimente konnten zeigen, dass die CaMKII derartige Eruptionen durch Niedrighalten der cAMP-Spiegel unterdrückt, was den Zeitmessmechanismus des ersten beschriebenen Intervallzeitmessers CaMKII offenlegt.

The four Crz neurons of the ventral nervous system of *Drosophila melanogaster* collect evidence about when approximately 6 minutes have elapsed during a mating act. This decision is of importance for the male fly as the male would rather sacrifice his own life than terminate mating before the expiration of these ~6 minutes, which represent the time of ejaculation. After these ~6 minutes, however, the male's motivation drops dramatically.

In this dissertation, optogenetic neuronal inhibition protocols as well as behavioral analyses were used to characterize the phenomenon of evidence accumulation in the Crz neurons in more detail. This showed that the accumulated evidence persisted during electrical inhibition of the Crz neurons. This result raised the hypothesis that the equivalent of accumulated evidence in the Crz neurons might be biochemical in nature. A high-throughput-screening-assay was developed using which 1388 genetic manipulations of the Crz neurons were performed and tested for a change in evidence accumulation. Only ~30 genetic manipulations showed altered evidence accumulation, with most of these manipulations involving the cAMP pathway. Using the optogenetic photoadenylyl cyclase bPAC, a number of other genetic manipulations of the cAMP pathway, as well as ex vivo calcium imaging and fluorescence lifetime microscopy techniques, it was confirmed that cAMP represents the equivalent of accumulated evidence in the Crz neurons, and the combination of these methods suggested that the evidence accumulation threshold may be set by the cAMP-binding affinity of regulatory PKA subunits.

Using genetic mosaic experiments as well as imaging techniques, it was further shown that within the Crz network there is a positive feedback loop between the recurrent activity as well as the cAMP accumulation, which, once cAMP levels reach the threshold, leads to a network-wide synchronized massive calcium influx, triggering the delivery of the Crz signal to downstream networks. This phenomenon could represent an analog of the action potential at the network level as well as at interval time scales and has been termed an "eruption." Genetic, optogenetic as well as imaging experiments could show that CaMKII suppresses such eruptions by keeping cAMP levels low, revealing the timing mechanism of CaMKII, the first described interval timer.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, L. F. (2006). Where Are the Switches on This Thing? In *23 Problems in Systems Neuroscience* (pp. 423–431).
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195148220.003.0021>
- Acebes, A., Grosjean, Y., Everaerts, C., & Ferveur, J. F. (2004). Cholinergic control of synchronized seminal emissions in *Drosophila*. *Current Biology : CB*, *14*(8), 704–710.
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.04.003>
- Agostino, P. V., Golombek, D. A., & Meck, W. H. (2011). Unwinding the molecular basis of interval and circadian timing. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *5*.
<https://doi.org/10.3389/FNINT.2011.00064>
- Alberts, B., Johnson, A. D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of Cell*. *5*, 591–595.
- Allen, A. M., Neville, M. C., Birtles, S., Croset, V., Treiber, C. D., Waddell, S., Goodwin, S. F., & Mann, R. S. (2020). A single-cell transcriptomic atlas of the adult *Drosophila* ventral nerve cord. *ELife*, *9*.
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.54074>
- Allène, C., Cattani, A., Ackman, J. B., Bonifazi, P., Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y., & Cossart, R. (2008). Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(48), 12851–12863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3733-08.2008>
- Anton, S. E., Kayser, C., Maiellaro, I., Nemeč, K., Möller, J., Koschinski, A., Zacco, M., Annibale, P., Falcke, M., Lohse, M. J., & Bock, A. (2022). Receptor-associated independent cAMP nanodomains mediate spatiotemporal specificity of GPCR signaling. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.02.011>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 351–355.
<https://doi.org/10.1038/NN.2739>
- Bading, H., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5105), 181–186.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8097060>

- Bahl, A., & Engert, F. (2020). Neural circuits for evidence accumulation and decision making in larval zebrafish. *Nature Neuroscience*, 23(1), 94–102. <https://doi.org/10.1038/S41593-019-0534-9>
- Baines, R. A., Uhler, J. P., Thompson, A., Sweeney, S. T., & Bate, M. (2001). Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(5), 1523–1531. <https://doi.org/21/5/1523> [pii]
- Bastiaens, P. I. H., & Squire, A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in Cell Biology*, 9(2), 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01410-X](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01410-X)
- Beaver, L. M., & Giebultowicz, J. M. (2004). Regulation of copulation duration by period and timeless in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology : CB*, 14(16), 1492–1497. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.08.022>
- Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews*, 75(4), 725–748. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1995.75.4.725>
- BERTHET, J., RALL, T. W., & SUTHERLAND, E. W. (1957). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *The Journal of Biological Chemistry*, 224(1), 463–475. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65045-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65045-8)
- Bock, A., Annibale, P., Konrad, C., Hannawacker, A., Anton, S. E., Maiellaro, I., Zabel, U., Sivaramakrishnan, S., Falcke, M., & Lohse, M. J. (2020). Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell*, 182(6), 1519–1530.e17. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.07.035>
- Bosch, J. A., Tran, N. H., & Hariharan, I. K. (2015). CoinFLP: A system for efficient mosaic screening and for visualizing clonal boundaries in *drosophila*. *Development*, 142(3), 597–606. <https://doi.org/10.1242/dev.114603>
- Bospoort, R. Van De, Farina, M., Schmitz, S. K., Jong, A. De, Wit, H. De, Verhage, M., & Toonen, R. F. (2012). Munc13 controls the location and efficiency of dense-core vesicle release in neurons. *J. Cell Biol.*, 199(6), 883–891. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208024>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–415.

- <https://doi.org/10.1242/DEV.118.2.401>
- Brent, R., & Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43(3 Pt 2), 729–736. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90246-6)
- Brooks, E. S., Greer, C. L., Romero-Calderón, R., Serway, C. N., Grygoruk, A., Haimovitz, J. M., Nguyen, B. T., Najibi, R., Tabone, C. J., Steven de Belle, J., & Krantz, D. E. (2011). A putative vesicular transporter expressed in *Drosophila* mushroom bodies that mediates sexual behavior may define a neurotransmitter system. *Neuron*, 72(2), 316–329.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.08.032/ATTACHMENT/8A308C48-AFDF-46CE-A78E-84B4E6554A9D/MMC3.MOV>
- Brostrom, C. O., Huang, Y. C., Breckenridge McL., B., & Wolff, D. J. (1975). Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 64–68.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.72.1.64>
- Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Gao, T., & Hosey, M. M. (1999). Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the B2 Subunit. *J Biol Chem*, 274(48), 33851–33855.
- Buonomano, D. V. (2007). The biology of time across different scales. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 594–597.
<https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO1007-594>
- Buonomano, D. V., & Karmarkar, U. R. (2002). How do we tell time? *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 8(1), 42–51.
<https://doi.org/10.1177/107385840200800109>
- Buonomano, D. V., & Mauk, M. D. (1994). Neural Network Model of the Cerebellum: Temporal Discrimination and the Timing of Motor Responses. *Neural Computation*, 6(1), 38–55.
<https://doi.org/10.1162/NECO.1994.6.1.38>
- BUTCHER, R. W., & SUTHERLAND, E. W. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(4), 1244–1250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)60316-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60316-3)
- Carr, C. E. (2003). Processing of Temporal Information in the Brain.

- [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Ne.16.030193.001255](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Ne.16.030193.001255), 16, 223–243. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.16.030193.001255>
- Chang, C. F., Gutierrez, L. M., Mundina-Weilenmann, C., & Hosey, M. M. (1991). Dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. II. Functional effects of differential phosphorylation of channel subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16395–16400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55311-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55311-4)
- Chang, J. Y., Parra-Bueno, P., Laviv, T., Szatmari, E. M., Lee, S. J. R., & Yasuda, R. (2017). CaMKII Autophosphorylation Is Necessary for Optimal Integration of Ca²⁺ Signals during LTP Induction, but Not Maintenance. *Neuron*, 94(4), 800-808.e4. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.04.041>
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. a, Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chen, Y., Saulnier, J. L., Yellen, G., & Sabatini, B. L. (2014a). A PKA activity sensor for quantitative analysis of endogenous GPCR signaling via 2-photon FRET-FLIM imaging. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00056>
- Chen, Y., Saulnier, J. L., Yellen, G., & Sabatini, B. L. (2014b). A PKA activity sensor for quantitative analysis of endogenous GPCR signaling via 2-photon FRET-FLIM imaging. *Frontiers in Pharmacology*, 5(April). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00056>
- Connolly, J. B., Roberts, I. J. H., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., & O’Kane, C. J. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in Drosophila mushroom bodies. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5295), 2104–2107. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5295.2104>
- Crickmore, M. A., & Vosshall, L. B. (2013). Opposing dopaminergic and GABAergic neurons control the duration and persistence of copulation in Drosophila. *Cell*, 155(4), 881–893. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.055>
- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277), 718–721. <https://doi.org/10.1038/345718A0>
- Deng, B., Li, Q., Liu, X., Cao, Y., Li, B., Qian, Y., Xu, R., Mao, R., Zhou, E.,

- Zhang, W., Huang, J., & Rao, Y. (2019). Chemoconnectomics: Mapping Chemical Transmission in *Drosophila*. *Neuron*, *101*(5), 876-893.e4. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.01.045>
- Dessauer, C. W., Chen-Goodspeed, M., & Chen, J. (2002). Mechanism of Galpha i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28823–28829. <https://doi.org/10.1074/JBC.M203962200>
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., & Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, *448*(7150), 151–156. <https://doi.org/10.1038/NATURE05954>
- Dittman, J. S., & Ryan, T. A. (2019). The control of release probability at nerve terminals. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0111-3>
- Drain, P., Folkers, E., & Quinn, W. G. (1991). cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron*, *6*(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90123-H](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90123-H)
- Duan, Z. R. S., Che, A., Chu, P., Modol, L., Bollmann, Y., Babij, R., Fetcho, R. N., Otsuka, T., Fuccillo, M. V., Liston, C., Pisapia, D. J., Cossart, R., & De Marco García, N. V. (2020). GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex. *Neuron*, *105*(1), 75-92.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.10.008/ATTACHMENT/C01F0331-3BD3-487D-8352-9A0531E4EA3C/MMC1.PDF>
- Durstewitz, D. (2003). Self-organizing neural integrator predicts interval times through climbing activity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(12), 5342–5353. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05342.2003>
- Elsayed, G. F., Lara, A. H., Kaufman, M. T., Churchland, M. M., & Cunningham, J. P. (2016). Reorganization between preparatory and movement population responses in motor cortex. *Nature Communications*, *7*, 13239. <https://doi.org/10.1038/ncomms13239>
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American Journal of Physiology*, *245*(1). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.1983.245.1.C1>
- Fang, Y.-L., Taylor, W. L., Meansn, A. R., & Soderling, T. R. (1989). *Studies of the Regulatory Mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase I1 MUTATION OF THREONINE 286 TO ALANINE AND*

- ASPARTATE*. 264(28), 16759–16763. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84770-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84770-1)
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332(6167), 853–856. <https://doi.org/10.1038/332853A0>
- Fulop, T., Radabaugh, S., & Smith, C. (2005). Activity-Dependent Differential Transmitter Release in Mouse Adrenal Chromaffin Cells. *J. Neurosci.*, 25(32), 7324–7332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-05.2005>
- Gibbon, J. (1977). Scalar expectancy theory and Weber's law in animal timing. *Psychological Review*, 84(3), 279–325. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.84.3.279>
- Gilchrist, A. S., & Partridge, L. (2000). Why it is difficult to model sperm displacement in *Drosophila melanogaster*: the relation between sperm transfer and copulation duration. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 54(2), 534–542. <https://doi.org/10.1111/J.0014-3820.2000.TB00056.X>
- Gorea, A. (2015). A Refresher of the Original Bloch's Law Paper (Bloch, July 1885). *I-Perception*, 6(4), 1–6. <https://doi.org/10.1177/2041669515593043>
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Janz, R., Liu, X., & Spudich, J. L. (2015). Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science*, 349(6248), 647–650.
- Grant, B. (1983). ON THE RELATIONSHIP BETWEEN AVERAGE COPULATION DURATION AND INSEMINATION REACTION IN THE GENUS *DROSOPHILA*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 37(4), 854–856. <https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.1983.TB05607.X>
- Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K., & Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes & Development*, 9(14), 1694–1708. <https://doi.org/10.1101/GAD.9.14.1694>
- Groschner, L. N., Chan Wah Hak, L., Bogacz, R., DasGupta, S., & Miesenböck, G. (2018). Dendritic Integration of Sensory Evidence in Perceptual Decision-Making. *Cell*, 173(4), 894–905.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.075>

- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R., & Calos, M. P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics*, *166*(4), 1775–1782.
<https://doi.org/10.1534/GENETICS.166.4.1775>
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* *2002* *418*:6894, *418*(6894), 244–251. <https://doi.org/10.1038/418244a>
- Hanson, P. I., Meyer, T., Stryer, L., & Schulman, H. (1994). Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*, *12*(5), 943–956.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90306-9)
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *5*(7), 522–531.
<https://doi.org/10.1038/NRG1379>
- Herbison, A. E. (2018). The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*, *159*(11), 3723–3736.
<https://doi.org/10.1210/EN.2018-00653>
- Huk, A. C., Katz, L. N., & Yates, J. L. (2014). Accumulation of Evidence in Decision Making. *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, 1–4.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6_309-2
- Huk, A. C., & Meister, M. L. R. (2012). *Neural correlates and neural computations in posterior parietal cortex during perceptual decision-making*. <https://doi.org/10.3389/fnint.2012.00086>
- Huk, A. C., & Shadlen, M. N. (2005). Neural Activity in Macaque Parietal Cortex Reflects Temporal Integration of Visual Motion Signals during Perceptual Decision Making. *The Journal of Neuroscience*, *25*(45), 10420. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4684-04.2005>
- Iwasaki, S., Kawamata, T., & Tomari, Y. (2009). *Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression*. *Molecular Cell*, *34*(1), 58–67.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.02.010>
- Jaynes, E. T. (1968). Prior Probabilities. *IEEE Transactions on Systems Science and Cybernetics*, *4*(3), 227–241.
<https://doi.org/10.1109/TSSC.1968.300117>
- Jeffreys, H. (1945). An invariant form for the prior probability in estimation problems. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 453–461.
<https://doi.org/10.1098/rspa.1974.0120>
- Jin, P., Griffith, L. C., & Murphey, R. K. (1998). Presynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates habituation

- of a simple reflex in adult *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(21), 8955–8964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08955.1998>
- Kaplan, H. S., & Zimmer, M. (2020). Brain-wide representations of ongoing behavior: a universal principle? *Current Opinion in Neurobiology*, *64*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2020.02.008>
- Kaufman, M. T., Churchland, M. M., Ryu, S. I., & Shenoy, K. V. (2014). Cortical activity in the null space: permitting preparation without movement. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 440–448. <https://doi.org/10.1038/nn.3643.Cortical>
- Kauvar, I. V., Machado, T. A., Yuen, E., Kochalka, J., Choi, M., Allen, W. E., Wetzstein, G., & Deisseroth, K. (2020). Cortical Observation by Synchronous Multifocal Optical Sampling Reveals Widespread Population Encoding of Actions. *Neuron*, *107*(2), 351–367.e19. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2020.04.023/ATTACHMENT/D44153FE-61BF-41C4-88BE-DEE0F7B10F4D/MMC1.PDF>
- Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science (New York, N.Y.)*, *231*(4739), 699–704. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3080805>
- Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*, *18*(8), 896–898. <https://doi.org/10.1038/78531>
- Kim, C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., & Taylor, S. S. (2007). PKA-I Holoenzyme Structure Reveals a Mechanism for cAMP-Dependent Activation. *Cell*, *130*(6), 1032–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.018>
- Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., ... Boyden, E. S. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods*, *11*(3), 338–346. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>
- Kolodziej, S. J., Hudmon, A., Waxham, M. N., & Stoops, J. K. (2000). Three-dimensional Reconstructions of Calcium/Calmodulin-dependent (CaM) Kinase II α and Truncated CaM Kinase II α Reveal a Unique Organization for Its Structural Core and Functional Domains. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14354–14359. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.19.14354>

- Kondo, T., Tsinoremas, N. F., Golden, S. S., Johnson, C. H., Kutsuna, S., & Ishiura, M. (1994). Circadian Clock Mutants of Cyanobacteria. *Science*, 266(5188), 1233–1236. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7973706>
- L, X., & M, N. (2000). Drosophila female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3272–3275. <https://doi.org/10.1073/PNAS.060018897>
- Lai, S. L., & Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in Drosophila. *Nature Neuroscience*, 9(5), 703–709. <https://doi.org/10.1038/NN1681>
- Latimer, K., Yates, J., Meister, M., Huk, A., & Pillow, J. W. (2015). Single-trial spike trains in parietal cortex reveal discrete steps during decision-making. *Science*.
- Lee, G., Vilella, A., Taylor, B. J., & Hall, J. C. (2001). New reproductive anomalies in fruitless-mutant Drosophila males: extreme lengthening of mating durations and infertility correlated with defective serotonergic innervation of reproductive organs. *Journal of Neurobiology*, 47(2), 121–149. <https://doi.org/10.1002/NEU.1021>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, S.-J. R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E. M., & Yasuda, R. (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*, 458, 299–304. <https://doi.org/10.1038/nature07842>
- Levin, L. R., Han, P. L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L., & Reed, R. R. (1992). The Drosophila learning and memory gene rutabaga encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, 68(3), 479–489. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90185-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90185-F)
- Levitzki, A. (1988). From epinephrine to cyclic AMP. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4867), 800–806. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2841758>
- Li, W., Ohlmeyer, J. T., Lane, M. E., & Kalderon, D. (1995). Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and Drosophila imaginal disc development. *Cell*, 80(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90509-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90509-X)
- Liput, D. J., Nguyen, T. A., Augustin, S. M., Lee, J. O., & Vogel, S. S. (2020). A Guide to Fluorescence Lifetime Microscopy and Förster's Resonance Energy Transfer in Neuroscience. *Current Protocols in Neuroscience*,

- 94(1). <https://doi.org/10.1002/CPNS.108>
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/NRN3192>
- MacBean, I. T., & Parsons, P. A. (1967). Directional selection for duration of copulation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56(2), 233–239. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/56.2.233>
- Mante, V., Sussillo, D., Shenoy, K. V., & Newsome, W. T. (2013). Context-dependent computation by recurrent dynamics in prefrontal cortex. *Nature*, 503(7474), 78–84. <https://doi.org/10.1038/NATURE12742>
- Mazzi, D., Kesäniemi, J., Hoikkala, A., & Klappert, K. (2009). Sexual conflict over the duration of copulation in *Drosophila montana*: why is longer better? *BMC Evolutionary Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-132>
- Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(2), 127–137. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2006.01510.X>
- Michalski, P. J. (2013). The delicate bistability of CaMKII. *Biophysical Journal*, 105(3), 794–806. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2013.06.038>
- Mika, D., Richter, W., & Conti, M. (2015). A CaMKII / PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *PNAS*, 112(7), 2023–2028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419992112>
- Millerid, D. E., Cook, K. R., & Scott Hawleyid, R. (2019). *The joy of balancers*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008421>
- Mohammad, F., Stewart, J. C., Ott, S., Chlebikova, K., Chua, J. Y., Koh, T., Ho, J., & Claridge-chang, A. (2017). Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins. *Nature Methods*, January 2017. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4148>
- Muller, H. J. (1917). An *Oenothera*-Like Case in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3(10), 619–626. <https://doi.org/10.1073/PNAS.3.10.619>
- Muller, H. J. (1918). Genetic Variability, Twin Hybrids and Constant Hybrids, in a Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics*, 3(5), 422–499. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/3.5.422>
- Murakoshi, H., Shin, M. E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E. M., Shibata, A. C. E., & Yasuda, R. (2017). Kinetics of Endogenous CaMKII Required for Synaptic Plasticity Revealed by Optogenetic Kinase Inhibitor. *Neuron*, 94(1), 37–47.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.02.036>
- Najafi, F., & Churchland, A. K. (2018). Perceptual Decision-Making: A Field

- in the Midst of a Transformation. *Neuron*, 100(2), 453–462.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.017>
- Nern, A., Pfeiffer, B. D., & Rubin, G. M. (2015). Optimized tools for multicolor stochastic labeling reveal diverse stereotyped cell arrangements in the fly visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), E2967–E2976.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1506763112/SUPPL_FILE/PNAS.1506763112.SAPP.PDF
- Newsome, W. T., Britten, K. H., & Movshon, J. A. (1989). Neuronal correlates of a perceptual decision. *Nature* 1989 341:6237, 341(6237), 52–54. <https://doi.org/10.1038/341052a0>
- Newton, A. C., Bootman, M. D., & Scott, J. (2016). Second Messengers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a005926.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005926>
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S., Cavallaro, A., Booker, M., Pfeiffer, B. D., Markstein, M., Wang, H., Villalta, C., Laverty, T. R., Perkins, L. A., & Perrimon, N. (2009). A Drosophila resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics*, 182(4), 1089–1100.
<https://doi.org/10.1534/GENETICS.109.103630>
- Ni, J. Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L. P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L., & Perrimon, N. (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in Drosophila melanogaster. *Nature Methods*, 5(1), 49–51. <https://doi.org/10.1038/NMETH1146>
- Ni, J. Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L. P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H. S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., Binari, R., Booker, M., Brennecke, J., Perkins, L. A., Hannon, G. J., & Perrimon, N. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in Drosophila. *Nature Methods*, 8(5), 405–407.
<https://doi.org/10.1038/NMETH.1592>
- Nusbaum, M. P., Blitz, D. M., & Marder, E. (2017). Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(7), 389.
<https://doi.org/10.1038/NRN.2017.56>
- Oprisan, S. A., & Buhusi, C. V. (2014). What is all the noise about in interval timing? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1637). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2012.0459>
- Paton, J. J., & Buonomano, D. V. (2018). The Neural Basis of Timing: Distributed Mechanisms for Diverse Functions. *Neuron*, 98(4), 687–

705. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.03.045>
- Perkins, L. A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., Shim, H. S., Miller, A., Housden, A., Foos, M., Randkelv, S., Kelley, C., Namgyal, P., Villalta, C., Liu, L. P., Jiang, X., ... Perrimon, N. (2015). The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics*, *201*(3), 843–852. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.180208>
- Peschel, N., & Helfrich-Förster, C. (2011). Setting the clock – by nature: Circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, *585*(10), 1435–1442. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2011.02.028>
- Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T. T. B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Lavery, T. R., Mungall, C., Svirskas, R., Kadonaga, J. T., Doe, C. Q., Eisen, M. B., Celniker, S. E., & Rubin, G. M. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(28), 9715–9720. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0803697105>
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, *117*(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00258-2)
- Pratt, A. J., & MacRae, I. J. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(27), 17897–17901. <https://doi.org/10.1074/JBC.R900012200>
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, *335*(6192), 683–689. <https://doi.org/10.1038/335683A0>
- Rall, T. W. (1975). On the importance of cyclic AMP in neurobiology: an essay. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *24*(3), 241–248. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(75\)90105-5](https://doi.org/10.1016/0026-0495(75)90105-5)
- Ratcliff, R., & McKoon, G. (2008). The Diffusion Decision Model: Theory and Data for Two-Choice Decision Tasks. *Neural Computation*, *20*(4), 873. <https://doi.org/10.1162/NECO.2008.12-06-420>
- Ratcliff, R., Smith, P. L., Brown, S. D., & McKoon, G. (2016). Diffusion Decision Model: Current Issues and History. *Trends in Cognitive Sciences*, *20*(4), 260. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2016.01.007>
- Rigotti, M., Barak, O., Warden, M. R., Wang, X. J., Daw, N. D., Miller, E. K., & Fusi, S. (2013). The importance of mixed selectivity in complex cognitive tasks. *Nature*, *497*(7451), 585–590. <https://doi.org/10.1038/NATURE12160>

- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(4), 340–349. <https://doi.org/10.1038/NSMB918>
- Roitman, J. D., & Shadlen, M. N. (2002a). Response of neurons in the lateral intraparietal area during a combined visual discrimination reaction time task. *Journal of Neuroscience*, *22*(21), 9475–9489.
- Roitman, J. D., & Shadlen, M. N. (2002b). Response of Neurons in the Lateral Intraparietal Area during a Combined Visual Discrimination Reaction Time Task. *Journal of Neuroscience*, *22*(21), 9475–9489. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09475.2002>
- Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews*, *98*(1), 117–214. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00008.2017>
- Rosenberg, P. A. (1992). Functional significance of cyclic AMP secretion in cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, *29*(3–4), 315–318. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90062-3](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90062-3)
- Rothschild, S. C., Ingram, S. R., Lu, F. I., Thisse, B., Thisse, C., Parkerson, J. A., & Tombes, R. M. (2020). Genetic compensation of γ CaMKII, an evolutionarily conserved gene. *Gene*, *742*, 144567. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.144567>
- Salzman, C. D., Britten, K. H., & Newsome, W. T. (1990). Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. *Nature* *1990* *346*:6280, *346*(6280), 174–177. <https://doi.org/10.1038/346174a0>
- Sang, L., Dick, I. E., & Yue, D. T. (2016). Protein Kinase A Modulation of Cav1.4 Calcium Channels. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.089>
- Sassone-Corsi, P. (n.d.). *The Cyclic AMP Pathway*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011148>
- Schaffer, E. S., Mishra, N., Whiteway, M. R., Li, W., Vancura, M. B., Freedman, J., Patel, K. B., Voleti, V., Paninski, L., Hillman, E. M. C., Abbott, L. F., Axel, R., & Zuckerman, M. B. (2021). Flygenectors: The spatial and temporal structure of neural activity across the fly brain. *BioRxiv*, 2021.09.25.461804. <https://doi.org/10.1101/2021.09.25.461804>
- Scholz, N., Guan, C., Nieberler, M., Grotemeyer, A., Maiellaro, I., Gao, S., Beck, S., Pawlak, M., Sauer, M., Asan, E., Rothemund, S., Winkler, J., Prömel, S., Nagel, G., Langenhan, T., & Kittel, R. J. (2017). Mechano-

- dependent signaling by Latrophilin/CIRL quenches cAMP in proprioceptive neurons. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.28360>
- Schwaerzel, M., Heisenberg, M., & Zars, T. (2002). Extinction Antagonizes Olfactory Memory at the Subcellular Level. *Neuron*, 35(5), 951–960. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00832-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00832-2)
- Shabb, J. B. (2001). Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chemical Reviews*, 101(8), 2381–2411. <https://doi.org/10.1021/CR000236L>
- Shadlen, M. N., & Kiani, R. (2013). Decision Making as a Window on Cognition. *Neuron*, 80(3), 791–806. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.10.047>
- Shadlen, M. N. N., & Shohamy, D. (2016). Decision Making and Sequential Sampling from Memory. *Neuron*, 90(5), 927–939. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.04.036>
- Shadlen, M. N., & Newsome, W. T. (2001a). Neural basis of a perceptual decision in the parietal cortex (area LIP) of the rhesus monkey. *Journal of Neurophysiology*, 86(4), 1916–1936.
- Shadlen, M. N., & Newsome, W. T. (2001b). Neural basis of a perceptual decision in the parietal cortex (area LIP) of the rhesus monkey. *Journal of Neurophysiology*, 86(4), 1916–1936. <https://doi.org/10.1152/JN.2001.86.4.1916/ASSET/IMAGES/LARGE/9K1011901017.JPEG>
- Shakiryanova, D., Tully, A., Hewes, R. S., Deitcher, D. L., & Levitan, E. S. (2005). Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles. 8(2), 173–178. <https://doi.org/10.1038/nn1377>
- Simen, P., Balci, F., deSouza, L., Cohen, J. D., & Holmes, P. (2011). A Model of Interval Timing by Neural Integration. *The Journal of Neuroscience*, 31(25), 9238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3121-10.2011>
- Stierl, M., Stumpf, P., Udvari, D., Gueta, R., Hagedorn, R., Losi, A., Ga, W., Petereit, L., Efetova, M., Schwarzel, M., Oertner, T. G., Nagel, G., & Hegemann, P. (2011). Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase , bPAC , of the Soil Bacterium *Beggiatoa*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1181–1188. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185496>
- Stokes, M. G. (2015). “Activity-silent” working memory in prefrontal cortex: a dynamic coding framework. *Trends in Cognitive Sciences*, 19(7), 394–405. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2015.05.004>
- Stringer, C., Pachitariu, M., Steinmetz, N., Reddy, C. B., Carandini, M., & Harris, K. D. (2019). Spontaneous Behaviors Drive Multidimensional,

- Brain-wide Activity. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6437), 255.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV7893>
- Tabara, H., Grishok, A., & Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5388), 430–431.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5388.430>
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews. Genetics*, 18(3), 164.
<https://doi.org/10.1038/NRG.2016.150>
- Takahashi, J. S., & Zatz, M. (1982). Regulation of circadian rhythmicity. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4565), 1104–1111.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6287576>
- Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., & Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics*, 24(2), 180–183. <https://doi.org/10.1038/72850>
- Taylor, T. D., Pacheco, D. A., Hergarden, A. C., Murthy, M., & Anderson, D. J. (2012). A neuropeptide circuit that coordinates sperm transfer and copulation duration in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20697–20702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218246109>
- Tenner, B., Getz, M., Ross, B., Ohadi, D., Bohrer, C. H., Greenwald, E., Mehta, S., Xiao, J., Rangamani, P., & Zhang, J. (2020). Spatially compartmentalized phase regulation of a Ca²⁺-cAMP-PKA oscillatory circuit. *ELife*, 9, 1–34. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55013>
- Tewson, P. H., Martinka, S., Shaner, N. C., Hughes, T. E., & Quinn, A. M. (2016). New DAG and cAMP Sensors Optimized for Live-Cell Assays in Automated Laboratories. *Journal of Biomolecular Screening*, 21(3), 298–305. <https://doi.org/10.1177/1087057115618608>
- Thornquist, S. C., & Crickmore, M. A. (2020). Behavioural choice emerges from nonlinear all-to-all interactions between drives. *BioRxiv*, 2020.03.12.989574. <https://doi.org/10.1101/2020.03.12.989574>
- Thornquist, S. C., Langer, K., Zhang, S. X., Rogulja, D., & Crickmore, M. A. (2020). CaMKII measures the passage of time to coordinate behavior and motivational state. *Neuron*, 105.
- Thornquist, S. C., Pitsch, M. J., Auth, C. S., & Correspondence, M. A. C. (2021). Biochemical evidence accumulates across neurons to drive a network-level eruption. *Molecular Cell*, 81, 675-690.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.029>
- Thum, A. S., Jenett, A., Ito, K., Heisenberg, M., & Tanimoto, H. (2007).

- Multiple Memory Traces for Olfactory Reward Learning in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 27(41), 11132–11138.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2712-07.2007>
- Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonauts. *Nature Chemical Biology*, 3(1), 36–43.
<https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO848>
- Tombes, R. M., Faison, M. O., & Turbeville, J. M. (2003). Organization and evolution of multifunctional Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase genes. *Gene*, 322(1–2), 17–31.
<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2003.08.023>
- Treisman, M. (1963). Temporal discrimination and the indifference interval. Implications for a model of the “internal clock”. *Psychological Monographs*, 77(13), 1–31. <https://doi.org/10.1037/H0093864>
- van den Pol, A. N. (2012). Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. *Neuron*, 76(1), 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.014>
- Van Roessel, P., Hayward, N. M., Barros, C. S., & Brand, A. H. (2002). Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(1–2), 170–173. <https://doi.org/10.1002/GENE.10146>
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5658), 672–676.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1093686>
- Verveer, P. J., Wouters, F. S., Reynolds, A. R., & Bastiaens, P. I. H. (2000). Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5496), 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.290.5496.1567>
- Waldmann, R., Hanson, P. I., & Schulman, H. (1990). Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase made Ca²⁺ independent for functional studies. *Biochemistry*, 29(7), 1679–1684.
<https://doi.org/10.1021/BI00459A002>
- Walsh, D., Perkins, J. P., & Krebs, E. (1968). An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem*, 243(13), 3763–3766.
- Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., & Ding, S. W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 452–454. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1125694>
- Wang, Z., Palmer, G., & Griffith, L. C. (1998). Regulation of *Drosophila*

- Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Autophosphorylation Analyzed by Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 378–387. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1998.71010378.X>
- Waskom, M. L., & Kiani, R. (2018). Decision Making through Integration of Sensory Evidence at Prolonged Timescales. *Current Biology*, 28(23), 3850-3856.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.10.021/ATTACHMENT/276ACB0D-8633-458A-8F2C-ACE7C1189856/MMC1.PDF>
- Willoughby, D., & Cooper, D. M. F. (2007). Organization and Ca²⁺ Regulation of Adenylyl Cyclases in cAMP Microdomains. *Physiol Rev.*, 87, 965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>.
- Wu, Q., Boyle, M. P., & Palmiter, R. D. (2009). Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell*, 137(7), 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.04.022>
- Wustmann, G., Rein, K., Wolf, R., & Heisenberg, M. (1996). A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 179(3), 429–436. <https://doi.org/10.1007/BF00194996>
- Yang, S., Constantin, O. M., Sachidanandan, D., Hofmann, H., Kunz, T. C., Kozjak-Pavlovic, V., Oertner, T. G., Nagel, G., Kittel, R. J., Gee, C. E., & Gao, S. (2021). PACmn for improved optogenetic control of intracellular cAMP. *BMC Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-021-01151-9>
- Yellen, G., & Mongeon, R. (2015). Quantitative two-photon imaging of fluorescent biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 27, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.024>
- Yoo, S. B. M., & Hayden, B. Y. (2020). The Transition from Evaluation to Selection Involves Neural Subspace Reorganization in Core Reward Regions. *Neuron*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.013>
- Zaccolo, M. (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology*, 158(1), 50–60. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00185.X>
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., & Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 672–675. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.288.5466.672>
- Zhang, E. E., Liu, A. C., Hirota, T., Miraglia, L. J., Welch, G., Pongsawakul, P. Y., Liu, X., Atwood, A., Huss lii, J. W., Janes, J., Su, A. I., Hogenesch, J.

B., & Kay, S. A. (n.d.). *A Genome-wide RNAi Screen for Modifiers of the Circadian Clock in Human Cells.*

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.031>

Zhang, J. Z., Lu, T. W., Stolerman, L. M., Tenner, B., Yang, J. R., Zhang, J. F., Falcke, M., Rangamani, P., Taylor, S. S., Mehta, S., & Zhang, J. (2020). Phase Separation of a PKA Regulatory Subunit Controls cAMP Compartmentation and Oncogenic Signaling. *Cell*, 182(6), 1531-1544.e15. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.07.043>

Zylberberg, A., & Shadlen, M. N. (2016). Cause for pause before leaping to conclusions about stepping. *BioRxiv*, 1–15.

8. Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ACR1	Kurzform für Guillardia theta Anion Channelrhodopsin 1
bPAC	<i>Beggiatoa</i> photoactivated adenyl cyclase
cADDis	cAMP Difference Detector in situ (cAMP-Sensor)
CaMKII	Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase II
CaMKII T287A	Überexpression einer CaMKII Variante ohne Befähigung zur Autophosphorylierung durch Ersatz der Aminosäure Threonin an der Stelle 287 durch Alanin
CaMKII T287D	Überexpression einer konstitutiven CaMKII Variante mit einem Ersatz der Aminosäure Threonin an der Stelle 287 durch Asparaginsäure
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
ChR2-XXM	Channelrhodopsin 2 XXM (D156H Mutation)
Coin-FLP	Transgen welches mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% eine Gal4 Expression induziert (Wahrscheinlichkeit entspricht einem Münzwurf = „coin flip“)
CrzR-Gal4	Corazonin-Rezeptor Gal4
CsChrimson	Durch rotes Licht aktivierbares Channelrhodopsin aus <i>Chlamydomonas noctigama</i> , N-Terminus ersetzt durch N-Terminus des Channelrhodopsins aus <i>Chloromonas subdivisa</i>
DIN-Gal4	Drive Integrating Neurons

Disinhibitionsfenster	Unterbrechung der GtACR1 vermittelten Inhibition für einen definierten Zeitraum
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
FLIM-AKAR	FLIM-A-kinase activity reporter (Fluorescence lifetime imaging-Sensor zur Messung der Proteinkinase A-Aktivität)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Gas	Stimulatorische α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gal4	Transkriptionsfaktor der an UAS-Sequenzen bindet
GCaMP6s	Genetisch encodierter Kalzium-Sensor (langsame Kinetik, sensitiv)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Green-Camuiα	CaMKII FRET-FLIM Sensor
GtACR1	Guillardia theta Anion Channelrhodopsin 1
hsFLP	Heat shock flippase (hitze-induzierbare Flippase)
LexA	Transkriptionsfaktor der an LexAop Sequenzen bindet
LexAop	Bindet die DNA-Bindungsdomäne von LexA und wirkt so analog zu einer AUS Sequenz
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKA-R*	Dominant negative regulatorische Proteinkinase A Untereinheit (keine cAMP Bindung möglich)
PKA-mc*	Überaktive katalytische Proteinkinase A Untereinheit (keine Bindung der regulatorischen Untereinheit möglich)
PKC	Proteinkinase C
TrpA1	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
UAS	Upstream Activating Sequence
VGCC	Spannungsabhängige Kalzium-Kanäle

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Repräsentatives Bild eines Drosophila-Paarungsaktes.....	2
Abbildung 2. Lokalisation Corazonin-exprimierender Neurone im Gehirn sowie im Abdominalganglion von männlichen <i>Drosophila melanogaster</i>	5
Abbildung 3. Der motivationale Schalter wird durch die Aktivität der Crz-Neurone umgelegt	9
Abbildung 4. Die Corazonin-Neurone legen den motivationalen Schalter circa zwischen Minute 5 und Minute 7 der Paarung um	15

Abbildung 5. Das Corazonin-„Fenster“	17
Abbildung 6. Der cAMP-Signalweg.....	20
Abbildung 7. Modell eines „bounded drift diffusion models“	27
Abbildung 8. Das CoinFLP-System.....	50
Abbildung 9. Charakterisierung des Corazonin-Fensters.....	64
Abbildung 10. Die während eines Disinhibitionsfensters akkumulierte Information nimmt während einer Inhibition nur langsam ab	65
Abbildung 11. Der optogenetische Hochdurchsatz-Screen von 1388 genetischen Manipulationen in den Crz-Neuronen identifizierte circa 30 Hits in mehreren prominenten second messenger Signalwegen.....	67
Abbildung 12. Beeinflussung des Crz-Fensters durch genetische Manipulationen im cAMP-Signalweg.....	69
Abbildung 13. Charakterisierung der cAMP-Signalweg Manipulationen.....	70
Abbildung 14. Die akute optogenetische Erhöhung der cAMP-Spiegel aktiviert die Corazonin-Neurone.....	71
Abbildung 15. Die optogenetische Erzeugung von cAMP verkürzt die benötigte Dauer elektrischer Aktivität während des Disinhibitionsfensters, hebt die Notwendigkeit dieser jedoch nicht auf.....	72
Abbildung 16. Eine cAMP-Erhöhung in den DINs durch bPAC-Stimulation beeinflusst das Paarungsverhalten nicht	73
Abbildung 17. Schema der Proteinkinase A-Aktivierung.....	74
Abbildung 18. Eine RNAi-vermittelte Genstilllegung der PKA-C1 verlängert das benötigte Disinhibitionsfenster	75
Abbildung 19. Die Expression der dominant negativen PKA-R* in den Crz-Neuronen verlängert das Disinhibitionsfenster und die Paarungsdauer dramatisch	76
Abbildung 20. Die ChR2-XXM-Stimulation PKA-R* exprimierender Crz-Neurone hebt den paarungsverlängernden Effekt der PKA-R*- Überexpression auf.....	77
Abbildung 21. Die Expression der konstitutiv aktiven PKA-mC* verkürzt das benötigte Disinhibitionsfenster	78
Abbildung 22. Ein bPAC vermittelter cAMP-Anstieg in den Crz-Neuronen führt zu einem massiven Kalzium-Einstrom, der von der Aktivität der PKA sowie von Kalziumkanälen abhängig ist.....	79
Abbildung 23. Die Herunterregulation der Ca-β-Untereinheit verlängert das Crz-Disinhibitionsfenster.....	80
Abbildung 24. Werden kurze bPAC-Stimulationen alle 100 Sekunden wiederholt, so kommt es nach mehreren Stimuli zu einem massiven Kalzium-Einstrom in die Crz-Neurone.....	82
Abbildung 25. Wird der Abstand zwischen den bPAC-Stimulationen verlängert, so werden die massiven Kalziumeinströme in die Crz-Neurone seltener.....	84

Abbildung 26. Die simultane Camuiα-Messung in allen 4 Crz-Neuronen zeigt, dass die Aktivität der CaMKII-Zeitmesser in den individuellen Neuronen unterschiedlich schnell abfällt.....	87
Abbildung 27. Die Testung genetischer Crz-GtACR1-Mosaik mittels der Coin-FLP-Technik zeigt, dass mindestens 2 Neurone für das Umlegen des motivationalen Schalters elektrisch aktiv sein müssen.....	88
Abbildung 28. Synaptische und dendritische Immunfluoreszenzfärbungen weisen auf anatomische Verknüpfungen innerhalb des Crz-Netzwerks hin.....	89
Abbildung 29. Die optogenetische Stimulation einzelner Crz-Neurone führt auch zu einem Anstieg der Kalzium-Spiegel in nicht optogenetisch stimulierten Crz-Neuronen.....	90
Abbildung 30. Die durch eine konstitutive Inhibition aller vier Crz-Neurone induzierte Verlängerung der Paarungsdauer kann durch die zusätzliche optogenetische Stimulation eines einzelnen Crz-Neurons aufgehoben werden.....	91
Abbildung 31. Die cAMP-Bildgebung bei wiederholter elektrischer Stimulation des Crz-Netzwerks zeigt einen Anstieg der cAMP-Spiegel.....	93
Abbildung 32. Die synchrone Kalzium-Bildgebung aller vier Crz-Neurone zeigt, dass die bei einem cAMP-Akkumulationsexperiment auftretenden massiven Kalziumeinströme in allen Crz-Neuronen synchron auftreten	94
Abbildung 33. bPAC-Stimulation und Kalzium-Bildgebung der Crz-Neurone bei unterbrochener Rückkopplungsschleife	97
Abbildung 34. Modell der Kommunikation und cAMP-Akkumulation innerhalb des Corazonin-Netzwerks.....	98
Abbildung 35. Ein zu einem späteren Zeitpunkt ausreichendes Disinhibitionsfenster kann zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität den motivationalen Schalter nicht umlegen.....	100
Abbildung 36. Eine bPAC-Stimulation zu einem Zeitpunkt hoher CaMKII-Aktivität kann keine Eruption induzieren.....	101
Abbildung 37. Die durch eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII in den Crz-Neuronen verlängerten Paarungsdauern können auch durch bPAC-Stimuli nur teilweise normalisiert werden.....	102
Abbildung 38. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII verringert die basalen cAMP-Spiegel in den Crz-Neuronen so stark, dass selbst mit einer bPAC-Stimulation die normalerweise gemessenen cAMP-Spiegel nicht erreicht werden.....	103
Abbildung 39. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII verringert die basalen cAMP-Spiegel in den Crz-Neuronen so stark, dass selbst mit einer bPAC-Stimulation die PKA-Aktivität nicht gesteigert werden kann....	104
Abbildung 40. Eine Überexpression der konstitutiv aktiven CaMKII in den Crz-Neuronen verhindert das Auftreten der durch bPAC-Stimulationen ausgelösten Eruptionen.....	105
Abbildung 41. Funktionsschema des CaMKII-Zeitmessers.....	106
Abbildung 42. Zusammenfassendes Modell der Crz-Neurone.....	107
Abbildung 43. Modell der Latenz zwischen Eruption und Paarungsende.....	109

Abbildung 44. Vermessung der Kinetik der Evidenzakkumulation.....	112
Abbildung 45. Die Analyse der Evidenzakkumulationskinetik zeigt, dass die Evidenz, die während einer Sekunde akkumuliert, nach vier Sekunden an Inhibition vollständig ausgelöscht ist.....	113
Abbildung 46. Modell zum Ende des CaMKII-Zeitmessers.....	116

III Tabellenverzeichnis

Übersicht bezüglich der durchgeführten Experimente (n, Genotyp)

Abbildung	Bezeichnung	Genotyp	Bedingung	N (Anzahl)
Abbildung 9	Crz>ACR1	w-; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP	Mittlere Abbildung, 45 Sek	8
			Mittlere Abbildung, 60 Sek	10
			Mittlere Abbildung, 75 Sek	11
			Mittlere Abbildung, 90 Sek	9
			Rechte Abbildung, 40 Sek	19
			Rechte Abbildung, 50 Sek	26
			Rechte Abbildung, 60 Sek	10
			Rechte Abbildung, 70 Sek	13
			Rechte Abbildung, 80 Sek	18
Abbildung 10	Crz>ACR1	w-; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/+	1 Min	17
			3 Min	22
			10 Min	64
Abbildung 11	Crz>ACR1 Dicer2, RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/+ plus eine UAS-RNAi oder eine UAS-Gen Überexpression, welche entweder das + auf Chr. II oder III ersetzt.		22538
Abbildung 12	Crz>ACR1 Dicer2, RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/+ plus eine UAS-RNAi oder eine UAS-Gen Überexpression, welche entweder das + auf Chr. II oder III ersetzt.		22538
Abbildung 13	Crz>Dicer2, ACR1	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/+	30 Sek Fenster	85
			40 Sek Fenster	73

			50 Sek Fenster	84
			60 Sek Fenster	72
			70 Sek Fenster	98
			80 Sek Fenster	78
			90 Sek Fenster	113
			100 Sek Fenster	98
	plus Gas-OE	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS-Gas	15 Sek Fenster	94
			20 Sek Fenster	64
			30 Sek Fenster	86
			40 Sek Fenster	17
	plus Gas-RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS-Gas-RNAi	30 Sek Fenster	5
			90 Sek Fenster	79
			120 Sek Fenster	105
			150 Sek Fenster	43
	plus PDE4-RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS-dunce-RNAi	30 Sek Fenster	41
			40 Sek Fenster	55
			50 Sek Fenster	52
			60 Sek Fenster	196
			70 Sek Fenster	43
			90 Sek Fenster	19
	+AC3-OE	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS-Ac3	15 Sek Fenster	22
			20 Sek Fenster	22
			30 Sek Fenster	49
			40 Sek Fenster	6
Abbildung 14	Crz>bPAC	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; +/+		10
	Crz>GFP	w-; Crz-Gal4/+; UAS-GFP/+		10
Abbildung 15	Crz>bPAC, ACR1	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-GtACR1-eYFP/+	Blaulicht Stimulus, 0 Sek	18
			Blaulicht Stimulus, 30 Sek	10
			Blaulicht Stimulus, 40 Sek	16

			Blaulich Stimulus, 50 Sek	23
			kein Licht, 40 Sek	17
			kein Licht, 50 Sek	18
			kein Licht, 60 Sek	17
			kein Licht, 70 Sek	22
			kein Licht, 80 Sek	17
			kein Licht, 90 Sek	19
Abbildung 16	DIN>bPAC	w-; NP2719-Gal4/UAS-bPAC		10
	DIN>Chr	w-; NP2719-Gal4/+; UAS- CsChrimson-tdTomato		10
Abbildung 18	Crz>Dicer2, ACR1	wie in Abbildung 13		
	+PKA-C1-RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS- PKA-C1-RNAi	70 Sek Fenster	46
			80 Sek Fenster	23
			90 Sek Fenster	38
			120 Sek Fenster	31
			150 Sek Fenster	45
Abbildung 19	Crz>PKA-R*	w-; Crz-Gal4/+; UAS-PKA- R1.BDK/+		25
	Kontrolle	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/+	Kein Licht	10
Abbildung 20	Crz>Chr2-XXM, PKA-R*	w-; Crz-Gal4/UAS-ChR2- XXM; UAS-PKA-R1.BDK/+	kein Licht	10
	Crz>Chr2-XXM, PKA-R*	w-; Crz-Gal4/UAS-ChR2- XXM; UAS-PKA-R1.BDK/+	Blaues Licht	6
Abbildung 21	Crz>Dicer2, ACR1	wie in Abbildung 13		
	+PKA-mC*	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/UAS- PKA-C1-mC*; UAS-GtACR1- eYFP/+	0 Sek Fenster	44
			10 Sek Fenster	64
			15 Sek Fenster	15
			20 Sek Fenster	74
			30 Sek Fenster	37
			40 Sek Fenster	31
Abbildung 22A	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+		6
	+PKA-R*	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/UAS- PKA-R1.BDK		4
Abbildung 22B	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	0 Cd2+	5
			+200 µM Cd2+	4
Abbildung 23	Crz>Dicer2, ACR1	wie in Abbildung 13		

	+Ca-β RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/+; UAS-GtACR1-eYFP/UAS- Ca-β RNAi	30 Sek Fenster	27
			70 Sek Fenster	20
			80 Sek Fenster	24
			90 Sek Fenster	48
			120 Sek Fenster	21
			150 Sek Fenster	28
Abbildung 24	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	Links	1 (repräsentativer Verlauf)
	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	Rechts	10
Abbildung 25	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	30 Sek Intervall zwischen Stimuli	6
			60 Sek Intervall zwischen Stimuli	5
			160 Sek Intervall zwischen Stimuli	7
			240 Sek Intervall zwischen Stimuli	7
Abbildung 26A	Crz>ChR2-XXM, green- Camuα	w-; Crz-Gal4/UAS-ChR2- XXM; UAS-green-Camuα/+		1 (repräsentativer Verlauf)
Abbildung 26B	Crz>ChR2-XXM, green- Camuα	w-; Crz-Gal4/UAS-ChR2- XXM; UAS-green-Camuα/+		1
Abbildung 26C	Crz>ChR2-XXM, green- Camuα	w-; Crz-Gal4/UAS-ChR2- XXM; UAS-green-Camuα/+	Simultan gemessen	7
Abbildung 27	Crz>Coin-FLP>ACR1	w-; Coin-FLP/Crz-LexA; UAS-GtACR1-eYFP/LexAop- FLP		315
Abbildung 28	Crz>SytGFP, Denmark	w-; Crz-Gal4/repo-Gal80; UAS-SytGFP, UAS- Denmark/+		1 (repräsentatives Bild)
Abbildung 29	Crz>GCaMP6s, hs-FLP, UAS>STOP>Chr-tdTom	Hs-Flp; Crz-Gal4/+; UAS- FRT-STOP-FRT- CsChrimson-tdTomato/UAS- OPGCaMP6s		11
Abbildung 30	Crz>Kir2.1, >>Chr, Heat- shock FLP	Hs-Flp; Crz-Gal4/UAS-Kir2.1- GFP; UAS-STOP-FRT- STOP-CsChrimson- tdTomato/+		7
Abbildung 31	Crz>Chr, cADDiS ^{Green-Down}	w-; Crz-Gal4/+; UAS- CsChrimson-tdTomato/UAS- cADDiS ^{Green-Down}		4
Abbildung 32	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	Links	1 (repräsentativer Verlauf)
	Crz>bPAC, GCaMP6s	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+	Rechts	7
Abbildung 33	Crz>Dicer2,bPAC,GCaMP6s, no RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/UAS- bPAC; UAS-OPGCaMP6s/+		10

	Crz>Dicer2,bPAC,GCaMP6s, Gas-RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/UAS- bPAC; UAS- OPGCaMP6s/UAS- Gas- RNAi		10
	Crz>Dicer2,bPAC,GCaMP6s, Unc13-RNAi	UAS-Dicer2; Crz-Gal4/UAS- bPAC; UAS- OPGCaMP6s/UAS- Unc13- RNAi		7
Abbildung 35	Crz>ACR1	w-; Crz-Gal4/+; UAS- GtACR1-eYFP/+	1 min, 30 Sek Fenster	9
			1 min, 90 Sek Fenster	11
			10 min, 30 Sek Fenster	10
			10 min, 90 Sek Fenster	10
Abbildung 36	Crz>bPAC, ACR1	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-GtACR1-eYFP/+	Blaues Licht, 1 Min	9
			Kein Blau, 1 Min	10
			Blaues Licht, 10 Min	
			Kein Blau, 10 Min	10
Abbildung 37	Crz>bPAC, CaMKII-T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-CaMKII-T287D/+	Kein Blau	20
			20 Sek Stimulus	23
			40 Sek Stimulus	22
Abbildung 38	Crz>bPAC, cADDiS ^{Green-Down}	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS- cADDiS ^{Green-Down} /+		4
	+T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS- cADDiS ^{Green-Down} /UAS- CaMKII-T287D		6
Abbildung 39	Crz>bPAC, FLIM-AKAR	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-FLIM-AKAR/+		7
	+T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-FLIM-AKAR/UAS- CaMKII-T287D		10
Abbildung 40	Crz>bPAC, GCaMP6s, CaMKII-T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/UAS- CaMKII-T287D	Kein KN93	1 (repräsentativer Verlauf)
			Plus KN93	1 (repräsentativer Verlauf)
unten	Crz>bPAC,GCaMP6s + CaMKII-T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/UAS- CaMKII-T287D	No KN93	7
unten			Plus KN93	12
unten	Crz>bPAC,GCaMP6s + CaMKII-K43M-T287D	w-; Crz-Gal4/UAS-bPAC; UAS-OPGCaMP6s/UAS- CaMKII-K43M-T287D	No KN93	8
unten			Plus KN93	6
Abbildung 43	Crz>ACR1	w-; Crz-Gal4/+; UAS- GtACR1-eYFP		15
Abbildung 44	Crz>ACR1	w-; Crz-Gal4/+; UAS- GtACR1-eYFP	15 Sek Fenster, 10	15

			Sek Stimulus	
			15 Sek Fenster, 20 Sek Stimulus	14
			15 Sek Fenster, 30 Sek Stimulus	20
			15 Sek Fenster, 40 Sek Stimulus	11
			15 Sek Fenster, 50 Sek Stimulus	30
			20 Sek Fenster, 20 Sek Stimulus	11
			20 Sek Fenster, 30 Sek Stimulus	23
			20 Sek Fenster, 40 Sek Stimulus	25
			20 Sek Fenster, 50 Sek Stimulus	18
			20 Sek Fenster, 60 Sek Stimulus	18
			20 Sek Fenster, 70 Sek Stimulus	12
			20 Sek Fenster, 80 Sek Stimulus	16
			30 Sek Fenster, 30 Sek Stimulus	15
			30 Sek Fenster, 40 Sek Stimulus	17
			30 Sek Fenster, 50 Sek Stimulus	22
			30 Sek Fenster, 60 Sek Stimulus	14
			30 Sek Fenster, 70	14

			Sek Stimulus	
			30 Sek Fenster, 80 Sek Stimulus	18
			30 Sek Fenster, 90 Sek Stimulus	15
			30 Sek Fenster, 100 Sek Stimulus	19
			30 Sek Fenster, 110 Sek Stimulus	13

Übersicht bezüglich der statistischen Tests

Abbildung + verwendeter Test	Nullhypothese	p-Wert (Signifikante Werte in rot bei alpha = 0.05 unter Nutzung der Holm-Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche) Statistische Signifikanz wird mittels der Farbe rot abgebildet
Abbildung 9: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Gruppen nummeriert von links nach rechts)	Die Paarungsdauer unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Test-Paradigmen nicht	1-2: 0.5681, 1-3: 0.0457, 1-4: 0.001 , 2-3: >0.9999, 2-4: 0.368, 3-4: >0.999
Abbildung 10: Fisher's exact test (Gruppen nummeriert von links nach rechts)	Der Anteil langer Paarungen unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Test-Paradigmen nicht	1-2: 0.0056, 1-3: <0.0001, 2-3: <0.001
Abbildung 14: Fisher's exact test	Der Anteil der ejakulierenden Fliegen unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Test-Paradigmen nicht	<0.0001
Abbildung 16: Fisher's exact test	Der Anteil an Fliegen, welche die Paarung auf einen bPAC oder Chrimson Stimulus hin beenden, ist derselbe.	<0.0001
Abbildung 19: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Die Paarungsdauer der unterschiedlichen Genotypen unterscheidet sich nicht	<0.0001
Abbildung 20: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Die Paarungsdauer beider Paradigmen sind von gleicher Länge	<0.0001
Abbildung 22 A: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Kein Unterschied hinsichtlich der maximalen Fluoreszenzänderung	0.0095
Abbildung 22 B: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Kein Unterschied hinsichtlich der maximalen Fluoreszenzänderung	0.0159

Abbildung 25 F-statistic	Über alle Paradigmen hinweg ist der Anstieg der gemittelten maximalen Aktivität gleich	0.014
Abbildung 26C links Korrelation	Zwei simultan gemessene Neurone zeigen hinsichtlich der Abnahme ihrer fluorescence life time keine Korrelation	0.467
Abbildung 26C rechts Korrelation	Aus zwei separaten Fliegen gemessene Neurone zeigen hinsichtlich der Abnahme ihrer fluorescence life time keine Korrelation	0.4683
Abbildung 27: Chi-squared test für die Abweichung zwischen dem vorhergesagten Modell (nämlich dass eine Inhibition von 3 oder 4 Neuronen zu langen Paarungen führt) und den erhobenen Daten.	Die erhobenen Daten können dadurch erklärt werden, dass nur eine Inhibition von 3 oder 4 Neuronen zu langen Paarungsdauern führt.	0.8506
Abbildung 29: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Gruppen nummeriert von links nach rechts: +Chr = 1, -Chr = 2, Kein Chr = 3)	Kein Unterschied bezüglich der Verteilung der maximalen Änderung der GCaMP Fluoreszenz	1-2: 0.0097, 1-3: 0.0015, 2-3: .0028
Abbildung 32 rechts: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Wird die zeitliche Abfolge der Antworten der einzelnen Zellen gemischt, so ist die normalisierte mutual information gleich verteilt	<0.0001
Abbildung 33 (oben) Fisher's exact test (Gruppen nummeriert von links nach rechts)	Derjenige Anteil der Stimuli, die eine Eruption auslösen, ist bei allen Genotypen gleich	1-2: 0.0002, 1-3: <0.0001, 2-3: 0.0784
Abbildung 33 (unten) Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Gruppen nummeriert von links nach rechts)	Die Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich der Größe ihrer Eruptionen nicht	1-2: 0.016, 1-3: 0.0085, 2-3: 0.4136
Abbildung 35: Fisher's exact test	Der Anteil langer Paarungen ist zwischen den Paradigmen von vergleichbarer Größe	30 Sek Fenster: 1.0 90 Sek Fenster: <0.0001
Abbildung 36: Fisher's exact test	Der Anteil der langen Paarungen ist gleich, unabhängig davon, ob eine bPAC Stimulation vorliegt oder nicht	1 min: 1.0 10min: 0.0002
Abbildung 37: Fisher's exact test	Der Anteil der langen Paarungen bei bPAC Stimulation ist gleich groß wie der Anteil der langen Paarungen ohne bPAC Stimulation	20 sec pulse: 0.111 40 sec pulse: <0.0001
Abbildung 40: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Die Zugabe von KN93 hat auf die maximale Fluoreszenzänderung keinen Einfluss	CaMKII-T287D: 0.0055 CaMKII-K43M-T287D: 0.8329
Abbildung 45: Lineare regressionen	Jede Regression wird aus dem gleichen linearen Trend generiert	0.7614

Übersicht bezüglich der verwendeten Fliegenlinien

Fliegenlinien	Quelle	Identifizierungsnummer
Crz-Gal4	Bloomington Stock Center	BDSC_51976
UAS-GtACR1-eYFP	Adam Claridge-Chang lab	Nicht verfügbar
UAS-green-Camua	Michael Crickmore lab	Nicht verfügbar
UAS-ChR2-XXM	Robert Kittel lab	Nicht verfügbar
UAS-Syt-eGFP	Bloomington Stock Center	BDSC_6926

UAS-Denmark	Bloomington Stock Center	BDSC_33061
Repo-Gal80	Tzumin Lee lab	Nicht verfügbar
Hs-FLP	Bloomington Stock Center	BDSC_62118
UAS-FRT-STOP-FRT-CsChrimsonTdTomato	David Anderson lab	Nicht verfügbar
GCaMP6s	David Anderson lab	Nicht verfügbar
Coin-FLP	Bloomington Stock Center	BDSC_58750
LexAop-FLP	Bloomington Stock Center	BDSC_55819
Crz-LexA	Michael Crickmore lab	Nicht verfügbar
LexAop2-GtACR1-eYFP	Michael Crickmore lab	Nicht verfügbar
UAS-Kir2.1-eGFP	Bloomington Stock Center	BDSC_6595
UAS-Dicer2	Bloomington Stock Center	BDSC_24646
1388 RNAi- und Überexpressionslinien in Abbildung 12	Auf Nachfrage werden alle Linien-Namen gerne als Excel Tabelle zur Verfügung gestellt (maximilian.j.pitsch@gmail.com)	
UAS-Gas-RNAi	Bloomington Stock Center	BDSC_50704
UAS-Gas-OE	Bloomington Stock Center	BDSC_6489
UAS-PDE4-RNAi	Bloomington Stock Center	BDSC_27250
UAS-AC3-OE	Bloomington Stock Center	BDSC_68221
UAS-bPAC	Robert Kittel lab	Nicht verfügbar
UAS-PKA-C1-RNAi	Bloomington Stock Center	BDSC_31277
UAS-PKA-R*	Bloomington Stock Center	BDSC_35550
UAS-PKA-mC*	Daniel Kalderon lab	Nicht verfügbar
UAS-ASAP2s	Bloomington Stock Center	BDSC_76247
UAS-Ca-beta-RNAi	Vienna Drosophila Resource Center	VDRC 105748
UAS-FLIM-AKAR	Michael Crickmore lab	Nicht verfügbar
UAS-cADDiS-Green-Down	Vanessa Ruta lab	Nicht verfügbar
UAS-cADDiS-Red-Up	Vanessa Ruta lab	Nicht verfügbar

Übersicht bezüglich der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Identifizierungsnummer
Chicken anti-GFP	Aves Labs	GFP-1010; RRID:AB_2307313
Mouse anti-GFP	Invitrogen	A11120; RRID:AB_221568
Rabbit anti-GFP	Invitrogen	A-11122; RRID:AB_221569
Rabbit anti-DsRed	Clontech	632496; RRID:AB_10013483
Mouse anti-nc82	Developmental Studies Hybridoma Bank	Nc82; RRID:AB_2314866
Donkey anti-chicken 488	Jackson ImmunoResearch	703-545-155; RRID:AB_2340375
Donkey anti-rabbit 488	Invitrogen	A11008; RRID:AB_143165
Donkey anti-mouse 488	Invitrogen	A21202; RRID:AB_141607
Donkey anti-rabbit 555	Invitrogen	A-31572; RRID:AB_162543
Donkey anti-mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch	715-166-150; RRID:AB_2340816
Donkey anti-rabbit 647	Jackson ImmunoResearch	711-605-152; RRID:AB_2492288
Donkey anti-mouse 647	Jackson ImmunoResearch	715-605-151; RRID:AB_2340863

Übersicht bezüglich der verwendeten Materialien

Weitere Materialien	Quelle	Identifizierungsnummer
Kartoffelfutter	Carolina Bio Supply	173200
Phosphat gepufferte Saline (10x)	MediaTech	46-013-CM
Raspberry Pi 3 Model B+	Raspberry Pi Foundation	Nicht verfügbar
Arduino ATMEGA2560	Arduino	MEGA2560 REV 3

LEDs	Luxeon Rebels	LXM3-PD01-0350, LXML-PM01-0100, LXML-PD01-040
Light Pads	Artograph	LightPad 930 LX

Python 2.7 und MATLAB Code	Thornquist,Pitsch et. al 2021	https://github.com/CrickmoreRoguljaLabs/cAMPCode
----------------------------	-------------------------------	---

IV. Detaillierte Informationen zu Material und Methoden der ex-vivo

Experimente

Im Folgenden werden ergänzende Informationen zu den Bereichen der gezeigten Daten aufgeführt, welche durch den Leiter des 2.Unterprojekts der Kooperation, Dr. Stephen Thornquist erhoben und analysiert wurden. Dies umfasst die Erhebung und Analyse der ex vivo Daten.

Ergänzende Informationen zu Bildgebung und Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM)

Die Bilder wurden mittels eines modifizierten Thorlabs Bergamo II aufgenommen. Die Proben selbst wurden mittels eines Chameleon Vision II Ti:Sapphire Lasers angeregt. Für die Messung von Kalzium (GCaMP6S), CaMKII-Aktivität (green-Camuia) sowie Proteinkinase A-Aktivität (FLIM-AKAR), wurde ein Laserlicht von 920nm Wellenlänge erzeugt, für die Messung von cAMP (cADDi_{Red-Up} und cADDi_{Green-Down}) sowie für die Bildgebung mit mehreren Farben wurde Laserlicht von 1000nm Wellenlänge erzeugt. Die Emissionen der Probe wurden mittels gekühlter PMTs (Hamamatsu H7422P-40 GaAsP) detektiert, wobei das Licht durch ein Wasser-Immersion-Objektiv von Olympus mit 16-facher Vergrößerung aufgenommen wurde.

Das PMT-Signal wurde anschließend durch schnelle Becker-Hickl PMT Amplifizierer (HFAC-26) amplifiziert und durch eine PicoQuant TimeHarp 260 Photonenähltafel geleitet, welche durch eine Photodiode (Thorlabs DET110A2) mit schnellem Wechselrichter (Becker-Hickl A-PPI-D) mit der Laseremission synchronisiert ist.

Das TimeHarp Signal wurde anschließend durch die FLIMage Software (Florida Lifetime Imaging) verarbeitet. Mittels der FLIMage Software wurde ebenfalls das Mikroskop gesteuert.

Zum Zwecke der Intensitätsbildgebung wurden alle detektierten Photonen ohne Berücksichtigung der Ankunftszeit im Verhältnis zum Erregungspuls innerhalb eines Pixels addiert. Die optogenetische Stimulation der Probe wurde mittels einer blauen LED (Thorlabs M470L4) erreicht, welche eine Intensität von etwa 0,2 mW/mm² an der Probe erreicht.

Die 128x128 Pixel Bilder wurden mit einer Frequenz von circa 4Hz aufgenommen.

Sektionen: Zum Zwecke der Bildgebung wurden die Fliegen in gekühlter Saline seziiert (103 mM NaCl, 3 mM KCl, 5 mM TES, 8 mM Trehalose, 10 mM Glucose, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, pH ~7.25, 270-275 mOsm).

Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) Quantifizierung

Zur Erhebung der FLIM-Daten wurden die Daten für jedes Pixel mittels 64 Zeitfenster von 200 Pikosekunden Weite erhoben. Alle Pixel einer Bildreihe wurden so zusammengeführt, dass diese den Parametern eines konstanten multiple-time Modells $\text{Exp}(t)$ entsprechen, welches mit einer Instrument-response-Funktion $\text{IRF}(t)$ so gefaltet wurde, dass der maximale Wahrscheinlichkeitsschätzwert der Parameterwerte gefunden wurde. Unter diesen Bedingungen wird die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon zum Zeitpunkt t detektiert wurde, von folgender Beziehung beschrieben:

$$p(t) = \sum_{n=1}^N f_n (\text{IRF} * \text{Exp}_n)(t)$$

wo f_n sich auf das Verhältnis der angeregten Fluorophore im Zustand n mit der Zeitkonstante τ_n bezieht. Die zwei gefalteten Verteilungen entsprechen der Wahrscheinlichkeit einer gegebenen, geräteinduzierten Veränderung der Ankunftszeit mit der Heaviside theta Funktion $\theta(t) = 1$ wenn $t \geq 0$ und andernfalls 0.

$$\text{IRF}(t) = \frac{1}{\tau_g \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t - t_0)^2}{2\tau_g^2}\right)$$

$$\text{Exp}_n(t) = \theta(t) \frac{1}{\tau_n} \exp(-t/\tau_n)$$

Dies entspricht der Wahrscheinlichkeit eines erregten Fluorophors im Zustand n , welches ein Photon zum Zeitpunkt t emittiert. Die Faltung dieser beiden Verteilungen ist:

$$\begin{aligned}
(\text{IRF} * \text{Exp}_n)(t) &= \int_{-\infty}^{\infty} \text{IRF}(t-s) \text{Exp}_n(s) ds \\
&= \frac{1}{\tau_g \tau_n \sqrt{2\pi}} \int_0^{\infty} \exp(-s/\tau_n) \exp\left(-\frac{1}{2\tau_g^2} (t-s-t_0)^2\right) ds
\end{aligned}$$

Dieses Integral kann dadurch ermittelt werden, dass das Quadrat innerhalb des Exponentials vervollständigt wird:

$$\begin{aligned}
&\frac{1}{\tau_g \tau_n \sqrt{2\pi}} \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{s}{\tau_n}\right) \exp\left(-\frac{1}{2\tau_g^2} (t-s-t_0)^2\right) ds \\
&= \frac{1}{\tau_g \tau_n \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2\tau_g^2} (t-t_0)^2\right) \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{1}{2\tau_g^2} \left(s^2 - 2s\left((t-t_0) - \frac{\tau_g^2}{\tau_n}\right)\right)\right) ds \\
&= \frac{1}{\tau_g \tau_n} \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_n}\right) \exp\left(-\frac{\tau_g^2}{2\tau_n^2}\right) \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\infty} \exp\left(-\left(\frac{s - (t-t_0) + \frac{\tau_g^2}{\tau_n}}{\sqrt{2}\tau_g}\right)^2\right) ds \\
(\text{IRF} * \text{Exp}_n)(t) &= \frac{1}{2\tau_n} \exp\left(-\frac{(t-t_0)}{\tau_n}\right) \exp\left(-\frac{\tau_g^2}{2\tau_n^2}\right) \text{erfc}\left(\frac{\tau_n(t-t_0) - \tau_g^2}{\sqrt{2}\tau_g \tau_n}\right)
\end{aligned}$$

wo $\text{erfc}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_z^{\infty} \exp(-s^2) ds$ die complementary error function darstellt.

Daraufhin wurden die Parameter $\{\tau_n\}, \{f_n\}, \tau_g, t_0$ angepasst, indem die log-likelihood function $\mathcal{LL}(\{n_i\})$ minimiert wurde, wobei n_i die Anzahl der gezählten Photonen im Photonendetektorzeitfenster i darstellt und t_i der Zeit des Detektorezeitfensters i entspricht, unter der Bedingung, dass $\sum_n f_n = 1$, $0 \leq f_n \leq 1$, $0 < \tau_g, t_0, \tau_n$.

$$\mathcal{LL}(\{n_i\}) = \sum_{i=1}^{64} n_i \log(p(t_i))$$

Der dadurch gewonnene Schätzwert für t_0 wurde dann dazu genutzt, die "empirical lifetime" τ zu berechnen, welche die durchschnittliche Ankunftszeit eines Photons darstellt (S.-J. R. Lee et al., 2009). τ wird definiert als:

$$\tau = \frac{\sum_{i:t_i \geq t_0} n_i t_i}{\sum_{i:t_i \geq t_0} n_i} - t_0$$

Der typische Wert für t_0 entsprach ungefähr 2.9 ± 0.1 Nanosekunden. τ_g Werte variierten um die 0,1 bis 0,2 Nanosekunden. Desweiteren wurden aber auch andere Parameter verwendet, um sicherzustellen, dass die Fluorophore keine Aggregate formen, was dazu führen würde, dass die von uns angepassten Parameter von den generell beobachteten Parametern abweichen würden. Typische Werte für τ_1 sowie τ_2 für verschiedene Fluorophore inkludieren unter anderem Folgende: green-Camuiα: 0.6, 2.2 Nanosekunden; FLIM-AKAR: 0.7, 2.1 Nanosekunden; cADDis_{Green-Down}: 1.2, 2.8 Nanosekunden, GCaMP6s: 2.8 Nanosekunden (normalerweise monoexponentiell)

Antikörper und Immunhistochemie

Alle entnommenen Gehirne wurden unter Exposition mit PBS, versetzt mit Triton-X-100 und 4% Paraformaldehyd, für 20 Minuten fixiert. Im Anschluss daran wurden die Proben dreimalig mit PBS/Triton X-100 für jeweils 20 Minuten gewaschen, woraufhin die Antikörper hinzugegeben wurden. Die Proben wurden mit diesen primären Antikörpern für 48 Stunden inkubiert, woraufhin diese dann ein weiteres Mal dreimalig für 20 Minuten mit PBS/Triton X-100 gewaschen und dann anschließend für weitere 48 Stunden mit den sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Nach Abschluss dieses Färbeprozesses wurden die Proben erneut dreimalig gewaschen und anschließend auf ein Deckglas aufgebracht, und mit VectaShield (VectorLabs) eingedeckt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper befindet sich im Tabellenverzeichnis.

Konfokalmikroskopie

Für die Bildgebung der gefärbten Proben wurden Bilder mittels der Konfokalmikroskopie aufgenommen. Dafür wurde ein Zeiss LSM 710 mit einem Luftobjektiv von 20facher Vergrößerung (Olympus PLAN-APOCHROMAT) genutzt, welches durch die Zen Software von Zeiss gesteuert wurde. Die Analyse der Bilder erfolgte anschließend mittels der Software ImageJ.

Berechnung der normalisierten „mutual information“ der Eruptionszeitpunkte

Für jeden applizierten Lichtpuls wurde pro Neuron die maximale GCaMP Antwort ermittelt und daraus eine $m \times n$ dimensionale Matrix F mit m Zeilen für jede der n Pulse erstellt. Daraufhin wurde jede Zeile der Matrix an ein „Gauß'sches Mischungsmodell“ mit zwei Komponenten angepasst, woraufhin jede Impulsantwort so klassifiziert wurde, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem der beiden Gauß'schen Modelle erzeugt wurde. Solche mit dem höchsten Durchschnitt in der einen Gruppe wurden als „Eruptionen“ bezeichnet, während die in der anderen Gruppe als „Nicht-Eruptionen“ bezeichnet wurden.

Daraufhin wurde die „mutual information“ mittels der n Spalten $x \in \{0,1\}^m$ bemessen, sodass die „mutual information“ $M(x_i; x_j)$ geschätzt werden konnte, wobei x_i für die i^{te} Zeile eines jeden x steht. Nun wurde die „mutual information“ normalisiert, sodass folgende Matrix erstellt werden konnte:

$$N_{i,j} = \frac{M(x_i; x_j)}{H(x_i)}$$

Das obere Dreieck dieser Matrix (die Diagonale ausgenommen) wurde dann graphisch dargestellt (z.B. die normalisierte „mutual information“ zwischen jedem Neuronenpärchen). Dies wurde nun mit allen Permutationen der obigen Matrix verglichen, bei denen jede Zeile von F so zirkulär permutiert wurde (d. h. F wurde durch F' ersetzt, wobei gilt, dass $F'_{i,j} = F_{i, \text{mod}_n(j+k_i)}$ (mit einem neuen k_i je Zeile), dass eine geänderte Sequenz erzeugt werden konnte, welche dieselbe Struktur wie F aufweist, jedoch das Verhältnis der maximalen Fluoreszenzänderungen der Zellen untereinander durcheinanderwirft.

Jeglicher Code, welcher für diese Analysen verwendet wurde, sowie die entsprechenden Hypothesentests, wurde mit den frei verfügbaren Python-Paketen numpy und pymc geschrieben und ist auf github verfügbar (<https://github.com/CrickmoreRoguljaLabs>)

V Danksagung

Hinter dieser Arbeit stehen viele Menschen, die mich, jeder auf seine eigene Weise, unterstützt und inspiriert haben. Ich danke Euch und Ihnen von Herzen.

Beginnen möchte ich mit meinem Betreuer, Herrn Prof. Michael Crickmore. Danke für dein leuchtendes wissenschaftliches Vorbild, dass du mir vom Beginn dieser Arbeit bis zum heutigen Tag bist. Danke für dein Vertrauen, den Respekt, die Zeit, die Großzügigkeit, die Freiheit und die vorgelebte Bedeutung der Entdeckung.

Bei Frau Prof. Esther Asan möchte ich mich im Besonderen für den hohen persönlichen Einsatz sowie den festen Anspruch bedanken, an dem sowohl diese Arbeit als auch ich wachsen konnte. Ohne Ihren Willen und Ihren Enthusiasmus, diese Doktorarbeit bis ins Detail zu verstehen, sowie Ihr Gefühl der Verantwortung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen und dafür kann ich Ihnen gar nicht genug danken.

Bei Herrn Professor Martin Heisenberg möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich für die langjährige Unterstützung bedanken. Danke für Ihre Offenheit und Ihren Zuspruch für das Projekt, welches den Grundstein für die Inangriffnahme des Projektes darstellte, sowie Ihre Neugierde an dem Thema, welche mir sowohl Inspiration als auch Motivation war.

Bei Frau Professor Charlotte Förster möchte ich mich für die Bereitschaft zur fachlichen Prüfung und Begutachtung der Arbeit, den Einsatz, sowie die angenehme und freundliche Unterstützung herzlich bedanken.

Bei meinem wissenschaftlichen Kooperationspartner Dr. Stephen Thornquist möchte ich mich für die äußerst enge, lehrreiche und produktive langjährige Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank für deinen Mut, deinen Enthusiasmus, dein Lob und deine Kritik. Du bist etwas sehr Besonderes.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen beiden Coops Eliza Smith und Jingwen Ren. Danke für eure unglaubliche Unterstützung bei dem molekularen Screen, dass Ihr auch zu eurem Projekt gemacht habt. Danke Eliza, dass dein Enthusiasmus den gesamten Fliegenraum erfüllt hat, und uns alle bei unserer Arbeit getragen hat. Danke für dein unglaubliches Vermögen, zuzuhören und das Beste aus jedem Menschen hervorzubringen. Danke Jing, für deine Offenheit, deine Neugierde, deinen Perfektionismus und deinen Optimismus.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Institutionen, welche diese Arbeit finanziert haben. Dabei ist vor Allen Dingen das National Institutes of Health zu nennen, welches die Kosten des Labors getragen hat, sowie die Studienstiftung des deutschen Volkes, welche mir die Arbeit in den USA durch die großzügige Auslandsförderung erst ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Laborkollegen im Crickmore Lab, sowie im Rogulja Lab und dem Nagel Lab für die schöne gemeinsame Zeit in der Wissenschaft und die inspirierenden Gespräche bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir am nächsten stehen.

Danke liebe Mama, dass du immer für mich da bist. Danke für deine bedingungslose Liebe und Unterstützung. Danke, dass du mir Sicherheit gegeben und eine kreative und fantasievolle Umgebung geschaffen hast. Das Momo-Zitat in der Einleitung ist für dich.

Danke lieber Papa, dass du immer an mich glaubst. Danke für deine bedingungslose Liebe und Unterstützung. Danke, dass du mir zuhörst und ich alles mit dir besprechen kann. Danke, dass du mir vorlebst, was Verantwortung ist und du mir zugleich die schönen Dinge des Lebens zeigst.

Danke Eva und Danke Andreas, ihr seid großartig.

Ich möchte mich auch herzlich bei meinen Großeltern Rosina Pitsch, Maria Hartmann, Anton Hartmann und Ernst Pitsch bedanken. Danke für eure Unterstützung, eure Zeit, euer tiefes Interesse, euer Verständnis und eure Liebe.

Danke Charlotte, mein Partner in Life & Science. Ohne dich wäre diese Arbeit nie entstanden und hätte auch nie so viel Spaß bereitet. Danke für deinen feinen Humor, deine schnellen und tiefen Gedanken, deine anpackende Art, und Danke, dass du dir meine vielen Klagen hinsichtlich dieser Arbeit angehört und mich unterstützt hast. Ich freue mich auf die Zukunft.

VI Lebenslauf

VII Eigene Veröffentlichungen

Thornquist*, Pitsch* et al., Biochemical evidence accumulates across neurons to drive a network-level eruption, *Molecular Cell* (2021),
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.029>

*Geteilte Erstautorenschaft