

Die Innere Uhr von *Drosophila melanogaster*

Synchronisation durch Licht und funktionelle Analyse
der circadianen Schrittmacherneurone



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Dirk Rieger
aus
Stuttgart
Juni 2007

Promotionsgesuch eingereicht am : 25.06.2007

Promotionsprüfung erfolgreich abgelegt am : 20.09.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Charlotte Förster
Universität Regensburg

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender : Prof. Dr. Christof Oberprieler

Erster Gutachter : Prof. Dr. Charlotte Förster

Zweiter Gutachter : Prof. Dr. Rudolf Schwind

Dritter Gutachter : Prof. Dr. Rosemarie Baumann

	Seite
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Aufbau der Photorezeptiven Elemente des circadianen Systems	9
1.2.1 Die Photorezeptororgane von <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.2.2 Die Komplexaugen	10
1.2.3 Die Ocellen	11
1.2.4 Das Hofbauer-Buchner Äuglein	11
1.2.5 Die „circadianen“ Photopigmente	12
1.2.6 Die Rhodopsine	12
1.2.7 Das Cryptochrom	12
1.2.8 Ein unbekanntes Photopigment in den dorsalen Neuronen	13
1.3. Das circadiane System von <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.3.1 Die lateralen Neurone (LN)	14
1.3.2 Die dorsalen Neurone (DN)	15
2. Zielsetzung	18
3. Teil 1: Verhalten	21
Laufaktivitätsaufzeichnung unter Kurz- und Langtagsbedingungen	
3.1 Material und Methoden 1	21
3.1.1 Verwendete Fliegenstämme	21
3.1.2 Aufzucht und Auswahl der Tiere	22
3.1.3 Datenaufzeichnung und Lichtprogramme	23
3.1.4 Datenanalyse	23
3.1.5 Untersuchung in Dauerlicht und Histologie von <i>clf^{eya}</i> ; <i>cry^b</i> Mutanten	25
3.2 Ergebnisse 1	26
3.2.1 Kontrollfliegen	26
3.2.2 Mutanten ohne funktionelles Cryptochrom	28
3.2.3 Mutanten ohne funktionelle Komplexaugen (und Ocellen)	29
3.2.4 Mutanten ohne funktionelle Komplexaugen, Ocellen, und H-B Äuglein	31

	Seite
3.2.5 Ausschalten von Cryptochrom und den H-B Äuglein	34
3.2.6 Einfluss der H-B Äuglein auf die Aktivitätsrhythmik unter Dauerlicht (LL)	36
3.2.7 Ausschalten von Cryptochrom, den Komplexaugen und den Ocellen	39
3.2.8 Mutanten einzig mit dem unbekannten Photopigment in den DN	41
3.3 Diskussion 1	46
3.3.1 Die Mitnahme	46
3.3.2 Änderung der Periode der Inneren Uhr	50
3.3.3 Phasenanpassung	52
3.3.4 Maskierung	53
3.3.5 Die <i>cryptochrom^{baby}</i> Mutante und der genetische Marker <i>spineless (ss¹)</i>	55
4. Teil 2: Funktion	61
Informationseingang aus dem photorezeptiven System in das circadiane System	
4.1 Einleitung 2	61
4.1.1 Versuch des Nachweises einer funktionellen Verbindung der Komplexaugen mit den lateralen Schrittmacherneuronen	61
4.1.2 Synapsin und Synaptobrevin als Marker für synaptische Endungen	63
4.1.3 Synapsinexpression unter Kontrolle des <i>Rh5</i> -Gal4 Promotors	64
4.1.4 Synaptobrevin-GFP Expression unter Kontrolle verschiedener Gal4-Promotoren	65
4.1.5 <i>In vitro</i> Nachweis von möglichen synaptischen Verbindungen zwischen Photorezeptoren und circadianen Schrittmacherneuronen	65
4.2 Material und Methoden 2	69
4.2.1 Expression von WGA unter der Kontrolle der Treiber <i>pdf</i> -Gal4 und <i>gmr</i> -Gal4	69

	Seite
4.2.2 Expression von Synapsin unter der Kontrolle des Treibers <i>Rh5-Gal4</i> in Synapsin ⁹⁷ Tieren	69
4.2.3 Expression von Synaptobrevin-GFP unter der Kontrolle des Treibers <i>gmr-Gal4</i>	69
4.2.4 Expression von Cameleon-GFP unter der Kontrolle des Treibers <i>pdf-Gal4</i>	70
4.3 Ergebnisse 2	71
4.3.1 Immunfärbungen von larvalen <i>Drosophila</i> -Gehirnen der Kreuzung <i>gmr-Gal4</i> X UAS- <i>wga</i>	71
4.3.2 Immunfärbungen von larvalen <i>Drosophila</i> -Gehirnen der Kreuzung <i>pdf-Gal4</i> X UAS- <i>wga</i>	71
4.3.3 Ergebnisse der WGA Expression in adulten Fliegen	73
4.3.4 Anti-Synapsin / anti PDH Immunfärbung	74
4.3.4.1 Expressionsmuster der Kreuzung aus <i>Rh5-Gal4</i> ; <i>syn</i> ⁹⁷ und <i>syn</i> ⁹⁷ UAS- <i>syn</i>	74
4.3.5 Synaptobrevin-GFP / anti PDH Immunfärbung	75
4.3.5.1 Expressionsmuster der Kreuzung aus <i>gmr-Gal4</i> und UAS- <i>n-syb</i>	75
4.3.6 Wirkung von Histamin auf die ventralen lateralen Schrittmacherneurone unter Zuhilfenahme der FRET Technik	76
4.4 Diskussion 2	81
4.4.1 Anterograde oder retrograde WGA Übertragung?	81
4.4.2 Synapsenspezifische Immunmarkierung mit Synapsin und Synaptobrevin	83
4.4.3 Funktionelle Verbindung der Photorezeptoren mit den großen und kleinen lateralen Schrittmacherneuronen bei <i>Drosophila melanogaster</i> „in vitro“	85
5. Teil 3: Molekularer Zustand der Inneren Uhr	86
5.1 Einleitung 3	86

	Seite
5.2 Material und Methoden 3	89
5.2.1 Fliegenstämme und Aufzeichnung der Laufaktivität	89
5.2.2 Datenanalyse	89
5.2.3 Immunhistochemie und Quantifizierung der Färbeintensität	90
5.2.4 Statistik	92
5.3. Ergebnisse 3	93
5.3.1 Aktivitätsrhythmus	93
5.3.2 Charakterisierung der unterschiedlichen Gruppen von Uhrneuronen	97
5.3.3 Intrazelluläre Lage von PER und TIM	102
5.3.4 Rhythmus der Uhrproteine im Dauerlicht (LL)	104
5.3.5 Unterschiede in der PER und TIM Immunmarkierung	110
5.3.6 Bilden die PDF positiven s-LN _v den Morgensoszillator und die LN _d den Abendoszillator im Pittendrigh-Daan Modell?	111
5.4 Diskussion 3	115
5.4.1 Rolle der PDF positiven s-LN _v und LN _d im dualen Oszillatoren System	115
5.4.2 Die Rolle der fünften s-LN _v und der DN	116
5.4.3 Für die Verkürzung und Verlängerung der Periode verantwortliche Photorezeptoren	117
5.4.4 Das zwei Oszillatoren System	118
6 Zusammenfassung	121
7 Anhang	123
7.1.1 <i>Drosophila</i> -Medium T	123
7.1.2 <i>Drosophila</i> -Medium R	123
7.2. Färbeprotokolle	123
7.3. Abbildungsverzeichnis	133
7.4. Tabellenverzeichnis	136
7.5. Literaturverzeichnis (alphabetisch)	137
7.6. Glossar	153
8 Danksagung	154
9 Erklärung	155

Die allermeisten Lebewesen unseres Planeten unterliegen dem Wechsel von Tag und Nacht. Dieser wiederkehrende Wechsel von Licht und Dunkelheit mit allen daraus folgenden physikalischen Auswirkungen, wie zum Beispiel Veränderungen in der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit, führten zu zahlreichen Anpassungen in Flora und Fauna.

Der periodische Wechsel von Tag und Nacht erzeugt temporale Nischen, an die sich Organismen auf spezifische Weise anpassen. In eindrucksvoller Weise lässt sich diese Anpassung an der von Carl von Linné 1745 erstmals erstellten Blumenuhr zeigen. Diese „Uhr“ zeigt die Uhrzeit mit den im jeweiligen Feld aufblühenden Pflanzen an (siehe Abbildung 1). Die Blumenuhr macht deutlich, dass die Pflanzen Informationen über den zeitlichen Verlauf eines Tages verarbeiten können müssen. Das Aufblühen der Pflanzen zu unterschiedlichen Tageszeiten fordert von den bestäubenden Tieren, dass sie voraussehen können wann dies geschieht. Wie die Pflanzen müssen die bestäubenden Insekten Informationen über den zeitlichen Verlauf eines Tages erhalten und verarbeiten können, um für die Bestäubung zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu sein.



Abb.1: Blumenuhr nach Carl von Linné. Linné konnte die Tageszeit anhand der sich öffnenden und schließenden Blüten ablesen.

Die Mitglieder der Fauna lassen sich anhand der spezifischen Zeit ihrer Aktivität in nocturnale (nachtaktive), diurnale (tagaktive) und crepuskulare (dämmerungsaktive) Tiere einteilen.

Neben der Anpassung von Bestäubern an ihre Blütenpflanzen lassen sich noch weitere temporale Adaptationen finden. Der Wüstenfuchs *Vulpes zerda* hat eine ausschließlich nachtaktive Lebensweise, um der Tageshitze auszuweichen; er stellt somit einen Vertreter für die nocturnale Lebensweise dar. Der Nebeltrinker *Onymacris unguicularis*, ein Käfer, der seinen Flüssigkeitshaushalt aus den Nebelschwaden deckt, die während der Dämmerung über die Dünen seines Lebensraumes ziehen, pflegt eine crepuskulare Lebensweise. Tags vergräbt er sich im Sand, um sich vor großer Hitze zu schützen und nachts findet er dort vor zu großer Kälte Schutz. Für Tiere, die besonders auf ihre Augen angewiesen sind, stellt die mangelnde Beleuchtung in der Nacht einen limitierenden Faktor für ihre Aktivität dar. Solche Tiere sind oft tagaktiv. Als Beispiel wären hier alle Taggreifvögel zu nennen, da sie in besonderer Weise für die Nahrungssuche auf ihre Augen angewiesen sind. Es lassen sich zu nahezu jeder Tierart Beispiele für die Aktivität zu unterschiedlichen Tageszeiten finden. Die Tiere müssen allerdings in der Lage sein, ihre Aktivität zur richtigen Tageszeit zu beginnen. Tatsächlich muss der Organismus schon lange vor Beginn der Aktivität den Körper auf seine bevorstehende Inanspruchnahme vorbereiten. Würden die Tiere nur auf die hereinbrechende Nacht oder den anbrechenden Morgen reagieren, bliebe dem Organismus nicht viel Zeit zur Vorbereitung, sie müssen also den Tag-Nacht-Wechsel vorausahnen können. Dieses Vorausahnen setzt einen inneren Mechanismus voraus, der die Fähigkeit hat, sich an einen 24 Stunden Rhythmus anzupassen. Wäre der Tag immer gleich lang, würde hierfür bereits die Funktion analog einer Sanduhr ausreichen. Dies ist aber nur am Äquator der Fall. Mit zunehmender Entfernung vom Äquator in Richtung der Pole verändert sich das Verhältnis von Tag und Nacht im Jahresverlauf. Auf der Nordhalbkugel der Erde wird mit der Sommersonnenwende zum 21. Juni die größte Tageslänge erreicht und zur Wintersonnenwende am 21. Dezember die kleinste. Dazwischen sind die Fauna und Flora kontinuierlich unterschiedlichen Tageslängen ausgesetzt. Die auf der nördlichen und südlichen Erdhalbkugel lebenden Tiere müssen sich also auf

verschiedene Tageslängen einstellen können. Dies ist mit einem „Sanduhrmechanismus“ nicht möglich, eine Innere Uhr kann dies jedoch leisten. Faktisch verfügen alle Lebewesen über eine Innere Uhr. Diese Inneren Uhren sind in der Lage, eine stabile Phasenbeziehung zur Umwelt zu halten und so die Phasenbeziehung der Aktivität zum Licht-Dunkel-Wechsel zu steuern. Interessanterweise weichen die Periodenlängen der Inneren Uhren in der Regel leicht von 24 Stunden ab. Dies kommt zum Ausdruck, wenn man den Rhythmus der Tiere in Konstantbedingungen untersucht. Unter diesen Bedingungen zeigt die Innere Uhr „Freilauf“ mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden. Deshalb spricht man auch von circadianen Uhren (von lateinisch circa: etwa und dies: Tag). Diese circadianen Uhren werden täglich auf den 24 Stunden Tag synchronisiert.

Drosophila melanogaster stammt ursprünglich aus tropischen, äquatorialen Regionen mit einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden (Keller A 2007). *Drosophila* wird als Kulturfolger des Menschen angesehen. Als solche verbreitete sie sich in nahezu jede geographische Lage und schließlich schaffte sie als Modellorganismus auch den Einzug in die Labore der Biologen. *Drosophila melanogaster* zeichnet sich durch ihre Anspruchslosigkeit bei den Haltungsbedingungen, eine hohe Reproduktionsrate und schließlich hervorragende genetische Zugänglichkeit aus. Als Objekt der Chronobiologie fand *Drosophila* erstmals 1971 besondere Beachtung als Konopka und Benzer in einem "Mutagenesecscreen" die *per^s*, *per^l* und *per⁰¹* Mutante selektieren konnten und damit bei *Drosophila* die ersten die Rhythmik verändernden Mutationen gefunden waren. Es zeigte sich, dass das *period (per)* Gen ein Schlüsselgen in der circadianen Uhr darstellt. Erst ab den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden dann weitere Uhr-Gene identifiziert, welche miteinander interagieren. Hierbei bilden zwei, miteinander gekoppelte, negative Rückkopplungsschleifen auf Transkriptions- und Translationsebene die zentrale Innere Uhr von *Drosophila* (Abb.2). Die hierfür verantwortlichen Gene sind *tim*, *clk*, *cyc*, *vri* und *Pdp1*. Als maßgebliche Proteine der Rückkopplungsschleifen werden also PER (Period), TIM (Timeless), CLK (Clock), CYC (Cycle), VRI (Vrille) und PDP (PAR Domäne Protein) gebildet.

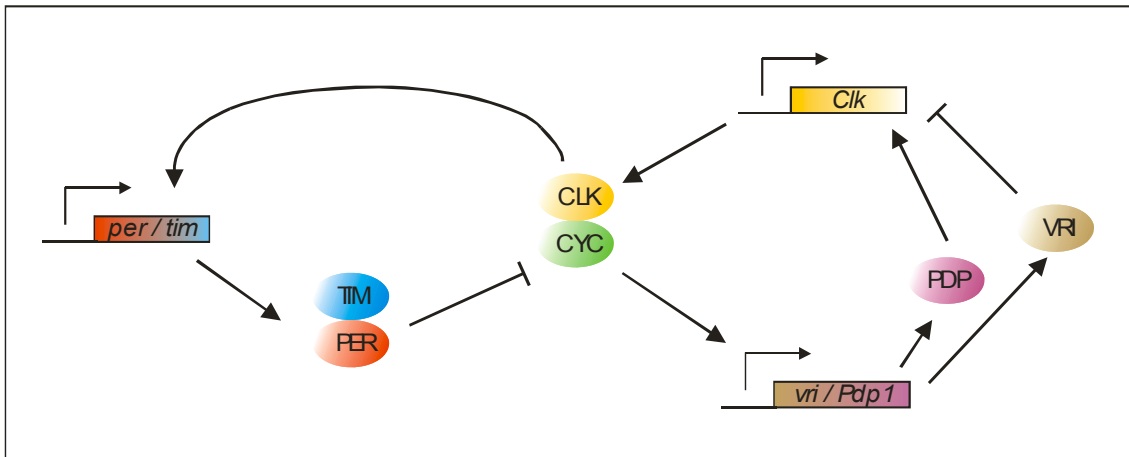


Abb.2: Modell der molekularen Uhr von *Drosophila*. Zwei miteinander verknüpfte negative Rückkopplungsschleifen bilden die zentrale molekulare Einheit der Inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*. Der Komplex aus CLOCK und CYCLE (CLK/CYC) wirkt aktivierend auf die Transkription von PER und TIM. Der Komplex aus PERIOD und TIMELESS (PER/TIM) wirkt hemmend auf den CLK/CYC Komplex. Dies führt zu einer Oszillation der Uhrproteine, die auch unter Konstantbedingungen bestehen bleibt. (Details siehe Allada, 2003)

Für die Untersuchung des molekularen Zustands der Inneren Uhr können die Mengen der Uhrproteine zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. In einem LD12:12 ist definitionsgemäß der Zeitpunkt, zu dem das Licht angeschaltet wird, Zeitgeberzeit 0 (ZT 0 vom Englischen „Zeitgeber Time“). Der Zeitpunkt, an dem das Licht ausgeschaltet wird, ist ZT 12 (Abb. 4 A).

Standardmäßig durchgeführte Untersuchungen mittels Westernplot ergaben bei einer Zeitreihe (ZT 0 bis ZT 24) unterschiedliche Expressionslevel der Uhrproteine PER und TIM (Abb.3). Ab ZT 3 steigt die TIM Proteinmenge in der Fliege an und erreicht zum ZT 19 ihr Maximum. Das PER Protein reichert sich erst ab ZT 11 an, erreicht aber ebenfalls zu ZT 19 seinen höchsten Gehalt. Es wird angenommen, dass das TIM Protein zur Stabilisierung von PER benötigt wird (Abb.41). Daher kommt es bei PER zu einer verzögerten Anreicherung. Neben der Quantifizierung der Uhrproteine durch Westernblot können diese auch mittels Antikörperfärbungen der Uhrneurone selbst untersucht werden (siehe Teil 3: Molekulare Analyse). Dies stellt eine aussagekräftige Untersuchungsmethode dar, da der Gehalt der Uhrproteine in den Neuronen, in meinen Untersuchungen speziell PER, mit der Aktivitätsrhythmik in folgender Weise korreliert: Zum Zeitpunkt der Hauptaktivität der Fliege ist die Konzentration des PER Proteins am geringsten, zum Zeitpunkt der geringsten

Aktivität, in der Nacht, ist die PER Konzentration am höchsten (Yoshii et al., 2004).

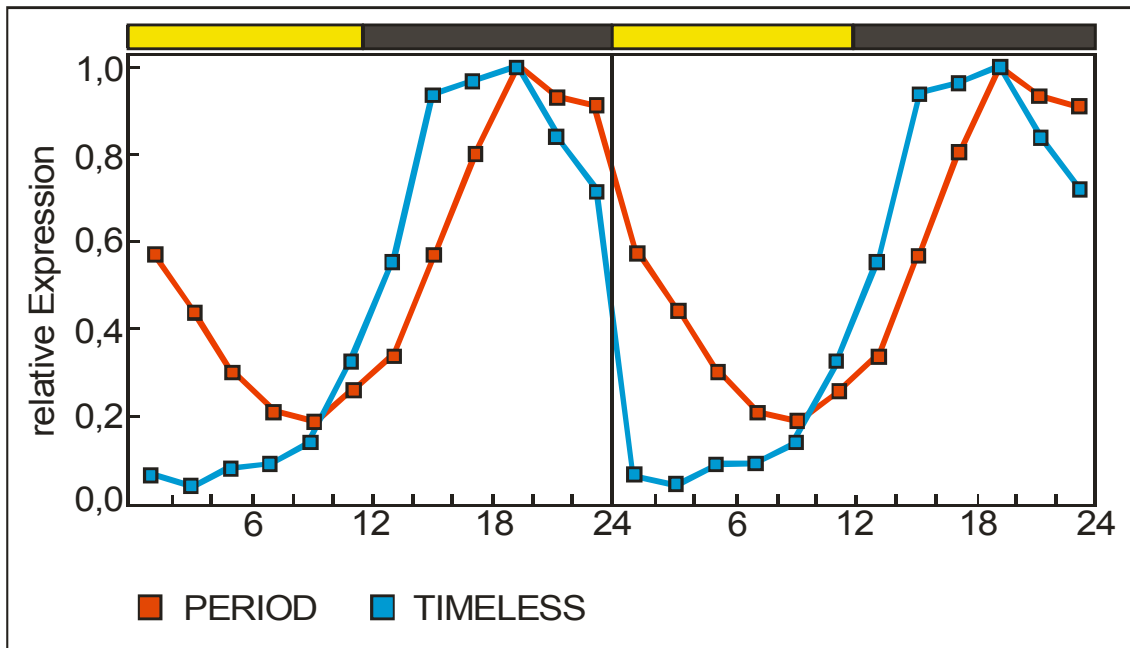


Abb.3: Expressionsprofile der Uhrproteine PERIOD und TIMELESS. Auf der X-Achse ist die Zeitgeber Zeit (ZT) in Stunden aufgetragen. Die Tiere waren auf einen LD12:12 synchronisiert. Auf der Y-Achse ist die relative Expression der Uhrproteine aufgetragen.

Wie bereits angedeutet, befinden sich die Uhren, die das Verhalten steuern, im Gehirn. Sie bestehen aus zahlreichen autonomen Einzelzelloszillatoren, den circadianen Schrittmachern (Helfrich-Förster, 2004). Innerhalb eines jeden Neurons wird durch die beschriebenen molekularen Rückkopplungsschleifen ein circadianer Rhythmus generiert (Hardin, 2004). Noch unbekannt ist jedoch, wie die multiplen Uhrneurone im Gehirn zu einem koordinierten Rhythmus des gesamten Organismus führen. Viele Tiere zeigen einen bimodalen Aktivitätsrhythmus mit Morgen- und Abendaktivität. Ein vor längerer Zeit von Pittendrigh und Daan beschriebenes Modell besagt, dass zwei miteinander interagierende Oszillatoren (Morgen- und Abendoszillatoren) für diese bimodale Aktivität verantwortlich sind, wobei die zwei Oszillatoren unterschiedlich auf Licht reagieren (Pittendrigh und Daan, 1976; siehe unten).

Licht beeinflusst die Aktivitätsrhythmik der meisten Tiere in vielerlei Hinsicht: Man unterscheidet 1a) parametrische Lichteffekte, 1b) nichtparametrische Lichteffekte, 2) Mitnahme und 3) Maskierung.

1a) Unter parametrischen Lichteffekten versteht man die Wirkung des Lichts auf die Periodenlänge der Inneren Uhr. Mit steigender Dauer der Lichtphase innerhalb eines LD-Wechsels verlängert oder verkürzt sich die Periode. Interessanterweise kann beides in einem Tier gleichzeitig geschehen. So verkürzt sich bei *Drosophila* die Periode des Morgenoszillators, während sich die des Abendoszillators verlängert. Dies hilft den Tieren, sich an längere Sommertage anzupassen (siehe S. 17 für Details). Im Extremfall führen die parametrischen Effekte jedoch zur Arrhythmie des Organismus. Dies ist, zum Beispiel in Dauerlicht der Fall.

1b) Nichtparametrische Lichteffekte sind Wirkungen des Lichts, die die Phasenlage der Inneren Uhr verändern, die Periodenlänge aber unverändert lassen. Das tägliche Stellen der Inneren Uhr funktioniert über nichtparametrische Effekte. Man kann die Uhr sogar mit einzelnen Lichtpulsen verstellen (Abb. 4B). Dabei zeigt sich, dass die Innere Uhr nicht zu allen Zeiten gleich lichtempfindlich ist. Die maximale Lichtempfindlichkeit tritt während der subjektiven Nacht auf; hier wird die Phase der Inneren Uhr entweder nach hinten („phase delay“) oder nach vorne („phase advance“) verschoben. Am Tag ist die Innere Uhr dagegen über einen größeren Zeitraum hinweg unempfindlich auf Licht. Abb. 4 zeigt eine idealisierte Phasen-Response-Kurve, d.h. die durch einen definierten Lichtpuls hervorgerufenen Phasenverschiebungen wurden im Tagesverlauf dargestellt. Die nichtparametrischen Effekte sind wichtig, um die Innere Uhr in einer stabilen und artspezifischen Phasenlage auf den 24 Stunden Rhythmus der Umwelt zu synchronisieren (Pittendrigh und Daan, 1976).

2) Mitnahme (im Englischen „entrainment“ genannt) bezeichnet die Synchronisation der Inneren Uhr durch einen Zeitgeber, wobei Licht in den allermeisten Fällen den stärksten Zeitgeber darstellt. Bei der Mitnahme arbeiten parametrische und nichtparametrische Effekte des Lichts zusammen. Morgens und abends (im Labor beim Ein- und Ausschalten des Lichts) wirkt das Licht nichtparametrisch, d.h. die Phase der Inneren Uhr wird neu eingestellt. Durch die Beleuchtung während des Tages wird die Periodenlänge der Inneren Uhr durch parametrische Licht-Effekte verändert.

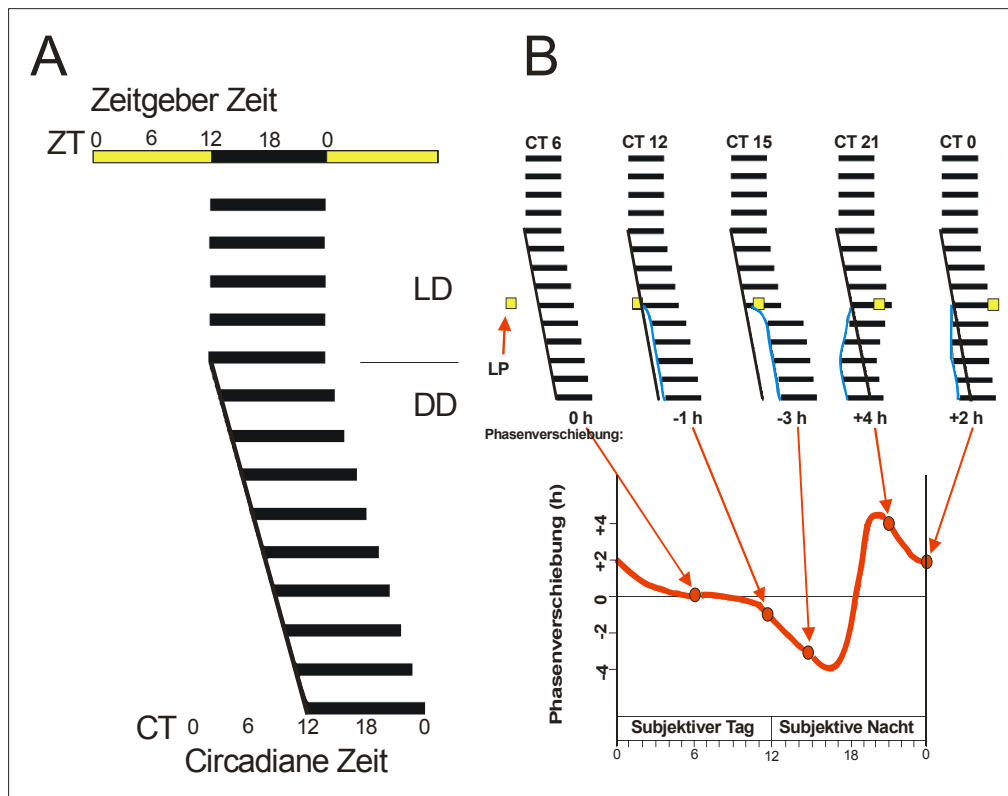


Abb.4: A) Schematisches Aktogramm eines nachtaktiven Tieres, das zunächst in einem Lichtdunkelwechsel aufgezeichnet wurde (LD12:12) und danach im Dauerdunkel (DD) Freilauf zeigt. Die Zeitgeber Zeit während des LD definiert sich über den Zeitgeber (hier Licht). Licht-an ist als ZT0 definiert, Licht-aus als ZT12. Die circadiane Zeit (CT) während des Freilaufs wird über die Periode und Aktivität des Tieres definiert, der Beginn der Aktivität markiert hier den Beginn der subjektiven Nacht (CT12), der Beginn der Ruhephase den Beginn des subjektiven Tags (CT0).

B) Idealisierte Phasen-Response-Kurve auf einen definierten Lichtpuls der zu verschiedenen Zeiten (CT6, CT12, CT15, CT21 und CT0) während des Freilaufs gegeben wurde (Beschreibung siehe Text).

3) Als Maskierung (im Englischen „masking“) werden direkte Wirkungen des Lichts auf die Aktivität bezeichnet. In tagaktiven Tieren fördert Licht die Aktivität, wohingegen Licht die Aktivität in nachtaktiven Tieren hemmt oder ganz unterdrückt. Wenn solche direkten Effekte des Lichts auftreten, verbergen sie häufig die von der circadianen Uhr kontrollierte Aktivität; daher kommt die Bezeichnung „Maskierung“ (zusammengefasst in Mrosovsky, 1999). Da Maskierung unabhängig von der circadianen Uhr auftritt, findet man sie auch in Tieren ohne funktionierende circadiane Uhr, zum Beispiel in „Uhr“ Mutanten (Wheeler et al., 1993), oder in Tieren, deren Hauptschrittmacherzentrum, die so genannte „Master clock“, durch einen chirurgischen Eingriff zerstört wurde (Moore-Ede et al., 1982; Redlin and Mrosovsky, 1999). Diese Organismen sind in der Lage, ohne ein circadianes System ihre Aktivität mit dem Tag oder der

Nacht zu synchronisieren. Wenngleich die Maskierung und die Mitnahme die Aktivität in unterschiedlicher Art und Weise synchronisieren, so sind beide Mechanismen dennoch miteinander verbunden. Mrosovsky (1996) zeigte, dass ein Anstieg in der Aktivität von Tieren auf die circadiane Uhr rückkoppeln und sie dadurch stellen konnte. Daher könnte eine verstärkte Aktivität, hervorgerufen durch Maskierung, indirekt zu einer Mitnahme der circadianen Uhr führen. Dies würde der Maskierung ermöglichen, neben Licht und Temperatur ein dritter starker Mitnahmefaktor zu sein.

Wie oben bereits beschrieben wirken die zyklischen Veränderungen der Lichtintensität als Zeitgeber-Signal und synchronisieren die endogene (circadiane) Rhythmik, so dass der Organismus angemessen an die 24-Stunden Periode der Umwelt angepasst ist. Viele Tierarten haben mehrere Photorezeptoren und bei manchen konnten die Mitnahme und die Maskierungseffekte von Licht unterschiedlichen Photorezeptoren zugeschrieben werden. In der Seidenmotte (*Hyalophora cecropia*, *Antheraea pernyi*) und in der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) sind die Komplexaugen für einen Anstieg der Schlüpftrate direkt nach Licht-an verantwortlich, was als Maskierungseffekt betrachtet wird. Das Licht-an Maximum verschwindet, wenn die Komplexaugen der Motte chirurgisch entfernt werden (Truman, 1972) oder wenn sie in der Taufliege durch eine Mutation nicht vorhanden sind (Engelmann and Honegger, 1966). Trotz allem bleibt die Schlüpfrythmik dieser Tiere zu den Licht-Dunkel (LD) Zyklen synchronisiert, was zeigt, dass hier die Mitnahme der circadianen Uhr durch extraretinale Photorezeptoren erreicht wird. Vergleichbar verschwindet das Licht-an Maximum im weiterhin synchronisieren Aktivitätsrhythmus der Schnecken *Lymax maximus* und *Lymax flavus* nach dem Durchtrennen des optischen Nervs (Beiswanger et al., 1981). Ein Licht-an Maximum ist auch in der synchronisierten Aktivitätsrhythmik von *Drosophila melanogaster* vorhanden (Hamblen-Coyle et al., 1992). Es ist auch unter dem Begriff "startle effect" bekannt, da es direkt nach Licht-an beginnt und bei einem Licht-Dunkel Wechsel von 12 zu 12 Stunden (LD12:12) etwa eine halbe Stunde anhält. Dieser Peak ist unabhängig von einer funktionierenden Uhr (Wheeler et al., 1993) und verschwindet, wenn die Tiere sich in Dauerdunkel befinden. Es handelt sich hierbei also um einen typischen Maskierungseffekt.

Es ist offensichtlich, dass zahlreiche Photorezeptoren und Photopigmente die Mitnahme und die Maskierung in unterschiedlicher Art und Weise kontrollieren, aber ihre präzisen Aufgaben und die Mechanismen, mit denen sie diese Aufgaben erfüllen, sind immer noch unbekannt. Unter natürlichen Bedingungen benötigt eine stabile Mitnahme eine komplexe Photorezeption, da es täglich Veränderungen in der Intensität und der spektralen Zusammensetzung des Lichts während der Morgen- und Abenddämmerung, ebenso wie jahreszeitliche Veränderungen in der Tageslänge gibt. Es ist daher sehr gut möglich, dass es sehr nützlich ist, zahlreiche Photorezeptoren und Photopigmente für die Lichtrezeption zur Verfügung zu haben, um sich optimal an die Veränderungen der Umwelt anzupassen (Roenneberg and Foster, 1997).

1.2 Aufbau der photorezeptiven Elemente des circadianen Systems

Die Fliege *Drosophila melanogaster* besitzt drei Photorezeptororgane (1-3) mit unterschiedlichen Rhodopsinen und 2 weitere, nicht in Photorezeptororganen lokalisierte Photopigmente (4-5), die in der Lichtrezeption und der Synchronisation der circadianen Uhr beteiligt zu sein scheinen: (1) die Komplexaugen, (2) die Ocellen, (3) das Hofbauer-Buchner Äuglein, (4) das Blaulichtphotopigment Cryptochrom und (5) ein unbekanntes Photopigment in den die Uhr-Gene exprimierenden dorsalen Neuronen (Helfrich-Förster et al., 2001).

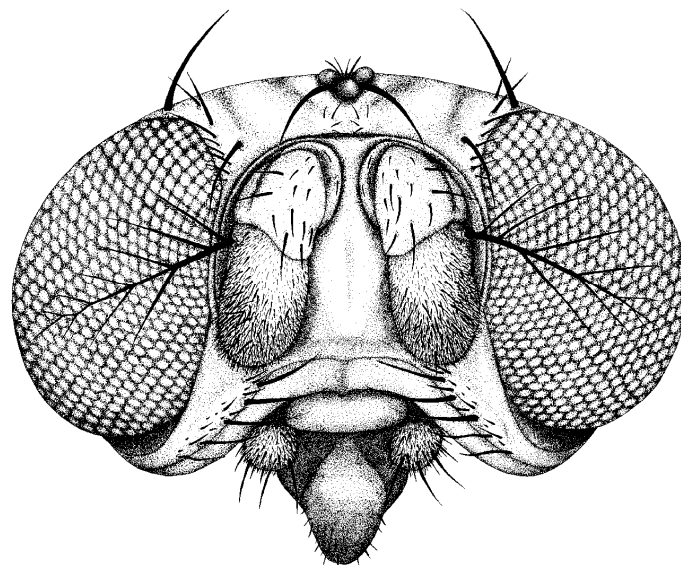
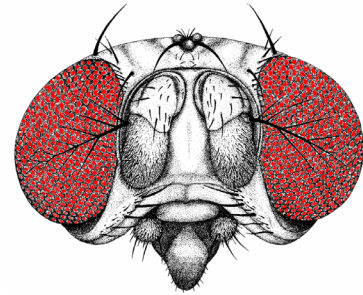


Abbildung 5: Kopf einer wildtypischen *Drosophila melanogaster*. (Quelle: Ch. Helfrich-Förster)

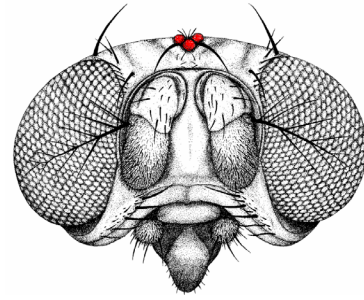
1.2.1 Die Photorezeptororgane von *Drosophila melanogaster*



1.2.2 Die Komplexaugen

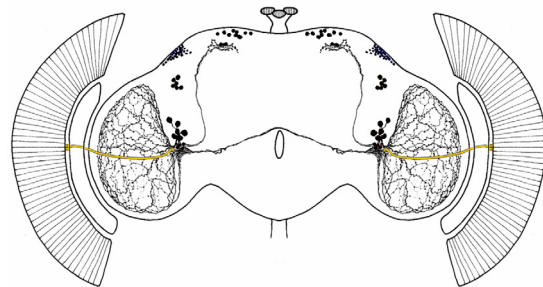
Die Komplexaugen der Taufliege sind aus jeweils etwa 800 Ommatidien aufgebaut. Die photorezeptive Struktur dieser Ommatidien wird wiederum durch acht Photorezeptoren gebildet. In einem äußeren Ring befinden sich die Rezeptoren 1 bis 6 (R1-6), in ihrer Mitte sind die Rezeptoren 7 und 8 (R7 und R8) angeordnet, wobei die Rezeptorzelle 7 oberhalb der Rezeptorzelle 8 liegt. Die Rezeptorzellen 1 bis 6 beinhalten allesamt Rhodopsin 1 (Rh1), sie verschalten in der Lamina auf Neuroommatidien (lamina cartridges) den funktionellen Einheiten der Lamina. Diese Einheiten werden durch fünf Monopolarzellen (L1-5), ein bis zwei Amakrinzellen sowie drei unterschiedlicher Medullaneurone (C2, C3 und T1) und drei Gliazellen gebildet (Meinertzhagen et al., 1991). In der Taufliege erfüllen sie die Funktion des Bewegungssehens.

Die Rezeptorzellen 7 und 8 bilden zusammen drei spezialisierte Cluster. Zwei dieser Cluster erfüllen die Funktion des Farbensehens. Diese zwei Cluster unterscheiden sich in der Kombination der Rhodopsine der Rezeptorzellen. Im so genannten „Pale“ Cluster enthält die Rezeptorzelle 7 Rhodopsin 3 (Rh3) und die darunterliegende Rezeptorzelle 8 Rhodopsin 5 (Rh5). Diese Kombination findet sich in etwa 30% der Ommatidien. In den etwa 70% der verbleibenden Ommatidien beinhaltet die Rezeptorzelle 7 das Rhodopsin 4 (Rh4) und die Rezeptorzelle 8 Rhodopsin 6 (Rh6). Diese Kombination bildet das so genannte „Yellow“ Cluster. In der dorsalen Rinne befindet sich noch eine weitere spezialisierte Kombination, die für das Wahrnehmen polarisierten Lichts verantwortlich ist. Hier enthalten R7 und R8 beide Rhodopsin 3 (Rh3). Die Projektionen der R7 und R8 durchqueren die Lamina und beide Rezeptortypen innervieren das Medullaneuropil. Dort enden sie in zwei unterschiedlichen Schichten, die R8 enden in der M3 Schicht, die R7 etwas tiefer in der M6 Schicht (Morante and Desplan, 2004; Mazzoni et al., 2004).



1.2.3. Die Ocellen

Die am dorsalen Scheitel des Kopfes liegenden 3 Ocellen (Pollock and Benzer, 1988) beinhalten das im Violettbereich absorbierende Rhodopsin 2 (Rh2) (Cowman et al., 1986; Feiler et al., 1988). Über die Funktion der Ocellen ist in der Literatur hinsichtlich *Drosophila melanogaster* wenig beschrieben. Die Ocellen haben durch ihren Aufbau eine gute Lichtausbeute (Bolzer E., 1925). Bei *Drosophila* sind die Rhabdomere jedoch nicht so zueinander aufgebaut, dass diese polarisiertes Licht wahrnehmen können wie dies zum Beispiel für Bienen beschrieben ist.



1.2.4 Die Hofbauer-Buchner Äuglein

Das Photorezeptorencluster des Hofbauer-Buchner Äugleins (H-B Äuglein) liegt in der Fensterschicht zwischen Retina und Lamina. Von dort zieht sich sein Fasertrakt entlang der posterioren Grenze des Laminalneuropils, kreuzt das äußere optische Chiasma und gelangt zur Oberfläche der anterioren Medulla. Seine Terminalen enden in einem Bereich anterior zur Medulla. Dort entspringt auch das Cucatti Bündel, welches den hinteren optischen Trakt bildet. In diesem Bereich wird ebenfalls die akzessorische Medulla als Rudiment des larvalen optischen Neuropils gebildet (Hofbauer and Buchner, 1989; Yasuyama and Meinertzhagen, 1999). Das H-B Äuglein reorganisiert sich aus Zellen des Bolwigschen Organs während der Metamorphose zum Adulttier neu und scheint

exakt den Verlauf des zuvor eingeschmolzenen Bolwigschen Organs zu nützen. Beide Strukturen stehen also in engem anatomischen Zusammenhang, da die 4 Photorezeptoren des H-B Äugleins vormals Teil der 12 Photorezeptoren des Bolwigschen Organs waren (Helfrich-Förster et al., 2002).

1.2.5 Die „circadianen“ Photopigmente

1.2.6 Die Rhodopsine

Die Rezeptoren der unterschiedlichen Photorezeptororgane tragen für sie spezifische Rhodopsine. Diese sind bereits im oberen Abschnitt angesprochen worden. In Kürze zusammengefasst stellt sich Folgendes dar: Rhodopsin 1 findet sich in den Rezeptorzellen 1-6 der Ommatidien der Komplexaugen, Rhodopsin 2 findet sich in den Ocellen. Rhodopsin 3 und 4 wird in den Rezeptorzellen 7 der Ommatidien gebildet, Rhodopsin 5 und 6 in den Rezeptorzellen 8, Rhodopsin 6 auch in den Photorezeptoren des H-B Äugleins. Alle diese Rhodopsine spielen vermutlich eine mehr oder weniger wichtige Rolle in der Synchronisation der Inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*.

Wie bei Vertebratenrhodopsinen auch wird durch ein einziges Photon die Isomerisierung des Chromophors von 11-cis-3-hydroxyretinal zu all-trans-3-hydroxyretinal verursacht. Dies führt zur Konformationsänderung des Rhodopsins und zur Bildung von Metarhodopsin. Dieses Metarhodopsin aktiviert seinerseits ein G-Protein, welches im nächsten Schritt die Phospholipase C β aktiviert.

Die einzelnen Rhodopsine unterscheiden sich in ihrer spektralen Empfindlichkeit. Die Wellenlängen für die maximalen Empfindlichkeiten der Rhodopsine sind wie folgend: Rh1: 480 nm, Rh2: 420 nm, Rh3: 345 nm, Rh4: 370 nm, Rh5: 440 nm und Rh6: 520 nm.

1.2.7 Das Cryptochrom

Ein mittlerweile gut charakterisiertes Photopigment, das nicht nur mit Photorezeptororganen assoziiert ist, ist das Blaulichtphotopigment Cryptochrom

(CRY). Es handelt sich hierbei um ein Pterin/Flavin Protein, das sich aus der Photolyase entwickelt hat, es besitzt eine ausgeprägte C-Terminal Domäne (Cashmore et al., 1999). Anders als der hochkonservierte photosensitive photolyasegleiche Teil ist der C Terminus selbst innerhalb der Gattung *Drosophila* extrem variabel (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). Das Cryptochrom Gen ist in der Mehrzahl der Uhrneurone exprimiert (Helfrich-Förster, 2002). Das Cryptochrom Protein führt seine für die Tagesrhythmik entscheidenden Funktionen in den circadianen Schrittmacherzellen durch die Interaktion mit den Uhr Proteinen TIM (Ceriani et al., 1999) oder PER (Rosato et al., 2001) aus.

1.2.8 Ein unbekanntes Photopigment in den dorsalen Neuronen

Es gibt Hinweise darauf, dass die DN₃ (siehe unten), eine Untergruppe der dorsalen Neurone (DN), ein unbekanntes Photopigment enthalten. Dieses unbekannte Photopigment alleine ist zwar nicht für die Synchronisation der Aktivitätsrhythmik ausreichend, Veleri et al. (2003) konnten aber in ihrer Arbeit zeigen, dass molekulare Rhythmen in den DN₃ durch LD Zyklen synchronisiert werden können. Und dies obwohl in der von ihnen für ihre Untersuchung verwendeten *glass^{60j}* Mutante bereits in der Larve keine der anderen Photorezeptoren vorhanden sind (Helfrich-Förster et al., 2001), die zur Synchronisation der Schrittmachneurone beitragen könnten, und auch keine weiteren Photorezeptoren in der Metamorphose zum adulten Tier angelegt werden.

1.3 Das circadiane System von *Drosophila melanogaster*

Der Aktivitätsrhythmus von *Drosophila* wird von drei Gruppen lateraler Neurone (den s-LN_v, l-LN_v und den LN_d) und drei Gruppen dorsaler Neurone (den DN₁, DN₂, und DN₃) gesteuert (Abb. 6). All diese Neurone exprimieren die für das Funktionieren der Inneren Uhr maßgeblichen Proteine wie PER, TIM, CLK und CYC (siehe Abb.2). Außer diesen werden noch eine große Anzahl weiterer

Proteine der Inneren Uhr gebildet, die allesamt in ausgeklügelten negativen Rückkopplungsschleifen miteinander interagieren.

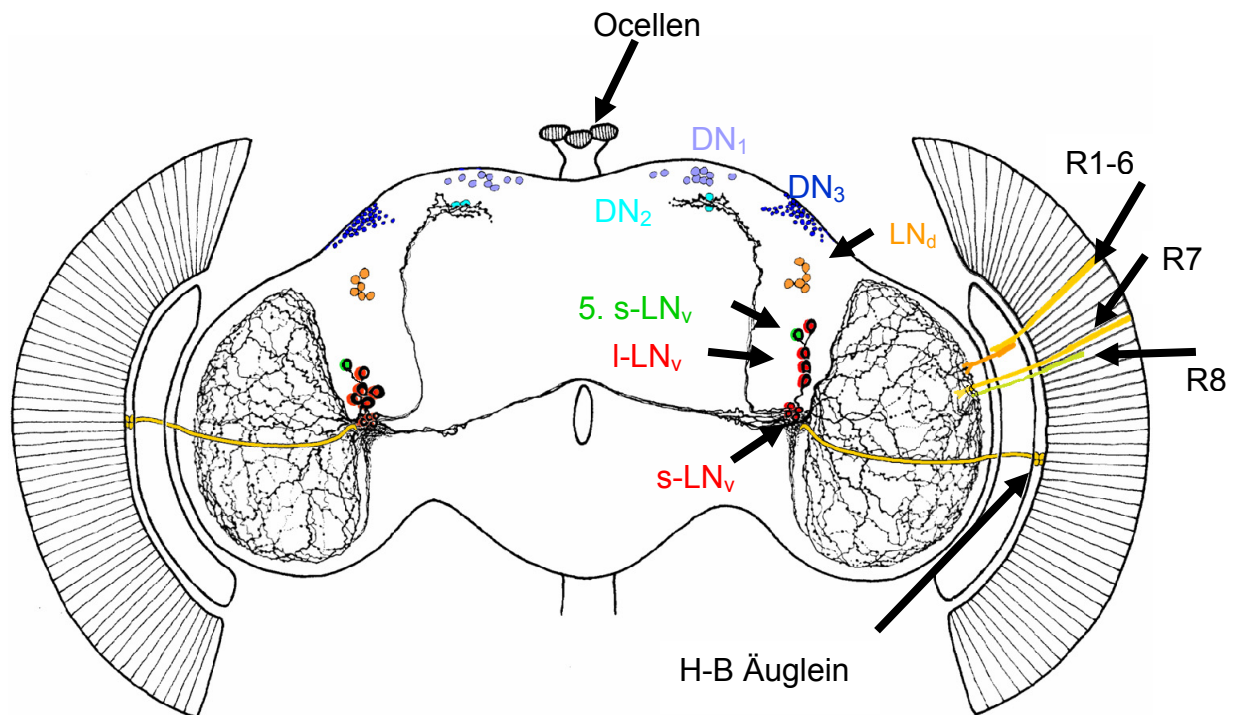


Abbildung 6: Schematisches Gehirn von *Drosophila melanogaster* mit den lateralen (LN_d, I-LN_v, s-LN_v, 5. s-LN_v) und dorsalen (DN₁, DN₂, DN₃) Schrittmacherneuronen sowie den photorezeptiven Organen (Komplexaugen (R1-6, R7, R8), H-B Äuglein, Ocellen). In der Abbildung sind nur die Verzweigungen der großen und kleinen lateralen Neurone dargestellt.

1.3.1 Die lateralen Neurone (LN)

Die lateralen Neurone sind notwendig und ausreichend, um in der Abwesenheit eines äußeren Zeitgebers einen robusten Aktivitätsrhythmus bei adulten Fliegen hervorzurufen (Ewer et al., 1992; Frisch et al., 1994). Sie sind aber auch für ein normales Aktivitätsverhalten zu Lichtdunkelbedingungen notwendig (Renn et al., 1999). Die Gruppe der s-LN_v besteht aus vier Neuronen, die das Neuropeptid „Pigment Dispersing Faktor“ (PDF) exprimieren und einem fünften PDF negativen Neuron (Kaneko et al., 1997). Die vier PDF positiven s-LN_v besitzen sowohl Verzweigungen in die akzessorische Medulla als auch in das dorsale Protocerebrum. Das Verzweigungsmuster der fünften PDF-negativen Zelle entspricht weitestgehend dem der PDF positiven s-LN_v (Helfrich-Förster et al., 2007). Sowohl die PDF-positiven s-LN_v als auch die 5. PDF-negative

s-LN_v gehören bereits zum circadianen System der Larve (Kaneko and Hall, 2000). Sie überdauern, bereits synchronisiert, die Metamorphose zum adulten Tier.

Eine zweite Gruppe PDF positiver Neurone stellen die l-LN_v dar. Diese Gruppe besteht aus vier bis sechs Zellen. Diese Zellen bilden auf der Oberfläche der Medulla ein weit verzweigtes Netzwerk, welches mit synaptischen Boutons besetzt ist. Das Netzwerk wird sowohl von Zellen der ipsilateralen als auch der contralateralen Hemisphäre des Gehirns gebildet. Die Fasern queren das Gehirn entlang des hinteren optischen Traktes. Innerhalb der akzessorischen Medulla bestehen möglicherweise zahlreiche Überschneidungspunkte der zwei Neuronengruppen. Die zwei Gruppen sind hier jedoch nicht ohne weiteres voneinander zu unterscheiden.

Die dritte Gruppe lateraler Neurone stellen die LN_d dar. Sie zeichnen sich durch ihre Lage dorsal zu den großen lateralen Neuronen aus, sie sind PDF-negativ und daher gut von den großen lateralen Neuronen zu unterscheiden. Typischerweise sind sie kreisförmig um den vorderen optischen Trakt angeordnet. Sie projizieren wie die meisten der anderen Schrittmacheneurone auch in das dorsale Protocerebrum. Es sind sechs LN_d zu finden, wobei diese wahrscheinlich 2 bis 3 Untergruppen bilden (Rieger et al., 2006). Neueste, noch nicht publizierte Daten, zeigen zum Beispiel, dass nur drei der sechs LN_d den Blaulichtrezeptor Cryptochrom beinhalten (Dr. Taishi Yoshii persönliche Kommunikation).

1.3.2 Die dorsalen Neurone (DN)

Bei den dorsalen Neuronen (DN) können drei Gruppen unterschieden werden. Die DN₁ mit einer Anzahl von bis zu 17 Neuronen liegen im Gehirn bilateral dorsal links und rechts des Scheitelpunkts des Gehirns verteilt. Sie liegen etwas gestreuter im Gehirn als die übrigen Schrittmacheneurone. Ein Grund dafür kann sein, dass sie ebenfalls keine homogene Gruppe bilden. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die DN₁ in zwei Untergruppen einteilen lassen. Diese Untergruppen wurden von den Autoren mit DN_{1a} (a = anterior) und DN_{1p} (p = posterior) bezeichnet. Die DN_{1a} sind bereits wie die

5. s-LN_v schon in der Larve angelegt und überdauern die Metamorphose zum adulten Tier (Shafer et al., 2006). Die „Gruppe“ der DN₂ besteht tatsächlich nur aus jeweils 2 Neuronen je Hemisphäre. Die DN₂ sind sehr gut im Gehirn zu identifizieren, da sie stets mit den Terminalen der s-LN_v im dorsalen Protocerebrum assoziiert sind. Auch sie sind bereits in der Larve vorhanden (Kaneko and Hall, 2000). Die Gruppe der DN₃ liegt stets weiter lateral nahe den LN_d in einer dorsalen Position. Sie sind mit einer Anzahl von 40 Neuronen die größte Einzelgruppe im circadianen Schrittmachersystem.

Die in Gruppen organisierten circadianen Schrittmacher generieren Signale, die zusammen genommen zu einem bimodalen Aktivitätsrhythmus führen. Es wird angenommen, dass eine Gruppe die Morgenaktivität (M-Oszillatoren; M von Englisch morning) steuert und eine weitere Gruppe die Abendaktivität (E-Oszillatoren; E von Englisch evening) des Tieres steuert. Typische bimodale Morgen- und Abendaktivität tritt in der Tierwelt von den Insekten bis zu den Säugern auf, was zeigt, dass das von Pittendrigh und Daan vorgeschlagene Modell der zwei Oszillatoren generell gültig zu sein scheint (Aschoff, 1966; Helfrich-Förster, 2001; Dunlap et al., 2003). Stoleru et al. (2004) und Grima et al. (2004) konnten bei *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die Morgenaktivität und die Abendaktivität durch das Manipulieren unterschiedlicher Schrittmacheneurone ausgelöscht beziehungsweise wieder hergestellt werden konnte. Diese Arbeiten zeigten, dass die ventralen (LN_v) und dorsalen (LN_d) Untergruppen der so genannten lateralen Schrittmacheneurone (siehe Abb. 6) die Grundlage des Morgenoszillators (M) und des Abendoszillators (E) sein könnten. Es ist allerdings nicht bekannt ob diese zwei Oszillatoren unterschiedlich auf Licht reagieren (Schwartz, 2004).

Das Besondere des Modells der zwei Oszillatoren ist, dass es die beobachteten Anpassungen an die jahreszeitliche Änderung der Tageslänge erklären kann. Das Modell sagt voraus, dass durch ein Beleuchten der Organismen mit verlängerter Lichtphase die Periode des Morgenoszillators verkürzt wird, während sich die Periode des Abendoszillators verlängert (Pittendrigh and Daan, 1976; Daan et al., 2001). Als Konsequenz daraus erscheint die Morgenaktivität früher und die Abendaktivität später an langen Sommertagen

und hilft so den tagaktiven Tieren die Mittagshitze zu vermeiden (Majercak et al., 1999). Das Modell sagt ebenfalls voraus, dass der Morgenszillator mit einer kurzen Periode und der Abendszillator mit einer langen Periode frei laufen, wenn man die Tiere einer Dauerbelichtung (LL) aussetzt. Diese interne Desynchronisation in zwei Perioden tritt allerdings für gewöhnlich nicht auf, da hohe Lichtintensitäten mit überlanger Lichtphase normalerweise zu arrhythmischen Verhalten führen (Aschoff, 1979; Konopka et al., 1989). In *Drosophila melanogaster* wird das Uhr-Protein TIM permanent durch die lichtinduzierte Interaktion mit Cryptochrom (CRY) abgebaut, was letztlich zum Stoppen der Inneren Uhr führt (Ceriani et al., 1999; Emery et al., 2000; Rosato et al., 2001; Busza et al., 2004), (Abb.41). Ohne funktionelles Cryptochrom geschieht dies nicht. Tatsächlich wurde die interne Desynchronisation in zwei Freilauf-Komponenten (eine mit einer langen Periode und eine mit einer kurzen Periode) für die *Cryptochrom^{baby}* Mutante unter Dauerlicht beschrieben (Yoshii et al., 2004). In dieser Studie konnte das Auseinanderlaufen der Verhaltensrhythmen mit einem Auseinanderdriften der PER Expression zwischen den ventral und den dorsal gelegenen Schrittmacherneuronen in Verbindung gebracht werden. Die Autoren der Studie konnten in ihrer Arbeit allerdings nicht zwischen den I-LN_v und LN_d unterscheiden.

2. Zielsetzung

Meine Arbeit zielte zunächst darauf, die Rolle der photorezeptiven Elemente von *Drosophila melanogaster* hinsichtlich ihres Beitrags zur Synchronisation und Mitnahme der Inneren Uhr unter Kurz- und Langtagsbedingungen zu untersuchen. Weiter sollte der Beitrag der verschiedenen Photorezeptoren zu den Maskierungseffekten nachgeprüft werden. In anatomischen und physiologischen Untersuchungen sollten die strukturellen und funktionellen Verbindungen zwischen den Photorezeptorzellen und den Schrittmacherneuronen untersucht werden. Ein drittes Ziel war, den molekularen Zustand der Schrittmacherneurone der Inneren Uhr während des Aufspaltens des Verhaltensrhythmus bei Dauerlicht (LL) in zwei Aktivitätsperioden aufzuzeigen, um so das Pittendrigh-Daan Modell der zwei Oszillatoren zu testen und einen genaueren Einblick in die neuronalen Grundlagen der Morgen- und Abendoszillatoren zu schaffen.

Ein Großteil der Daten, welche im Rahmen dieser Promotion erbracht wurden, konnten bereits publiziert werden, oder war bis zum Zeitpunkt der schriftlichen Erstellung der Promotion bei einer Zeitschrift in Druck.

Die Rolle des Cryptochroms, der Komplexaugen, des Hofbauer-Buchner Äugleins und der Ocellen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Mitnahme und die Maskierung der Aktivitätsrhythmik wurde in folgenden Publikationen beschrieben:

Rieger D., Stanewsky R. and Helfrich-Förster C. (2003) Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Rhythms Oct; 18(5): 377-391.

Veleri S., Rieger D., Helfrich-Förster C. and Stanewsky R. (2007) Hofbauer-Buchner eyelet affects circadian photosensitivity and coordinates TIM and PER expression in *Drosophila* clock neurons. J. Biol. Rhythms. Feb; 22(1):29-42.

Rieger D, Fraunholz C, Popp J, Bichler D, Dittmann R, Helfrich-Förster C. The fruit fly *Drosophila melanogaster* favours dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. (2007). J. Biol. Rhythms, in Druck (voraussichtlich Okt).

Die funktionelle und strukturelle Analyse der circadianen Schrittmacherneurone sind in den folgenden Publikationen beschrieben:

Rieger D, Shafer O.T, Tomioka K. and Helfrich-Förster C (2006) Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*, J. Neurosci. 26(9), 2531–2543.

Helfrich-Förster C., Shafer O.T., Wülbeck C., Grieshaber E, Rieger D and Taghert P. (2007) Development and morphology of the clock-gene-expressing Lateral Neurons of *Drosophila melanogaster*. J. Comp. Neurol. Jan 1;500(1):47-70.

Bachleitner W., Kempinger L., Wülbeck C., Rieger D. and Helfrich-Förster C. (2007) Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. PNAS. Feb 27;104(9):3538-43

Hamasaka Y., Rieger D., Parmentier M.-L., Grau Y., Helfrich-Förster C. and Nässel D.R. Glutamate signaling modulates activity rhythms in *Drosophila* via metabotropic receptors on clock neurons (2007). Journal of Comparative Physiology, in Druck.

Zu Gunsten der Übersicht habe ich die Arbeit in drei thematische Gebiete gegliedert.

In Teil 1 „Verhalten“ soll vor allem auf die Rolle der photorezeptiven Elemente von *Drosophila melanogaster* hinsichtlich ihres Beitrags zur Synchronisation und Mitnahme der Inneren Uhr unter Kurz- und Langtagsbedingungen eingegangen werden.

Der Teil 2 „Funktion“ enthält Untersuchungen zu den Verbindungen der photorezeptiven Elemente mit den Schrittmacherneuronen der Inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*.

Der Teil 3 „Molekularer Zustand der Inneren Uhr“ beschäftigt sich mit dem molekularen Zustand der Schrittmacherneurone der Inneren Uhr während des Aufspaltens des Verhaltensrhythmus bei Dauerlicht (LL) in zwei Aktivitätsrhythmen.

3. Teil 1: Verhalten

Laufaktivitätsaufzeichnungen unter Kurz- und Langtagsbedingungen

3.1 Material und Methoden 1

3.1.1 Verwendete Fliegenstämme

Die Fliegenmutanten, welche in diesem Teil der Arbeit verwendet wurden, sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Wir haben sowohl neuroanatomische Mutanten wie *sine oculis* (*so*¹) (Fischbach, 1983; Cheyette et al., 1994), *eyes absent* (*cl^{eya}*) (Sved, 1986) und *sine oculis; glass* (*so*¹; *glass*^{60j}) (Helfrich-Förster et al., 2002), als auch die Transmitter Mutante *histidine decarboxylase* (*hdc*^{JK910}) (Burg et al., 1993) für unsere Untersuchungen benützt, um die Funktionen der Komplexaugen, der Ozellen und des H-B Äugleins zu beseitigen. Durch Verwendung der Transmitter Mutante *hdc*^{JK910} wollten wir ausschließen, dass Veränderungen im Gehirn der Fliegen wie sie bei neuroanatomischen Mutanten vorkommen können für eventuelle Verhaltensänderungen verantwortlich sind. Histidindecaboxylase ist das Schlüsselenzym im Syntheseweg für den Neurotransmitter Histamin. Histamin ist der Neurotransmitter der bereits genannten drei Augenstrukturen von *Drosophila* (Pollack and Hofbauer, 1991). Histamin ist außerdem der Neurotransmitter einiger weniger Neurone im zentralen Gehirn von *Drosophila* (Nässel D 1999). Diese sind jedoch weder dorsale noch laterale Neurone aus dem Bereich der circadianen Schrittmacher. Daraus schließen wir, dass das circadiane System bei der *hdc*^{JK910} Mutation nicht betroffen ist. Es ist jedoch trotz alledem möglich, dass der Mangel an Histamin die Gesamtfunktion des Gehirns beeinflussen kann. Um die Funktion des Blaulichtphotopigmentes Cryptochrom zu eliminieren benützten wir die *cryptochrom*^{baby} (*cry*^b) Mutante, sie trägt eine Punktmutation in der flavinbindenden Region des Proteins (Stanewsky et al., 1998). Als Kontrollen benützten wir den rotäugigen Wildtyp Stamm *Canton-S* als auch die Mutante *yellow white* (*y w*); diese hat weiße Augen und eine gelbliche Körperfarbe. Da

sich bei den *cry^b* und *hdc^{JK910}* Mutationen die Mutante *y w* im genetischen Hintergrund befindet diente sie mir als Kontrollstamm für diese Mutanten. Für die Eliminierung der Funktion des H-B Äugleins führten wir Kreuzungen des Treiberstammes *Rh5-Gal4; cry^b* mit der Responderlinie *UAS-ttx, cry^b* durch. Die F₁ Generation dieser Kreuzung exprimiert das Neurotoxin Tetanustoxin und unterbindet hierdurch die Weitergabe von Neurotransmittern (siehe Teil2: Funktion). Da dies unter der Kontrolle des Gens für Rhodopsin 5 geschieht sind von dem Effekt vor allem das H-B Äuglein betroffen, aber auch mindestens 30% der R8, nämlich die des Pale Clusters (siehe oben und Diskussion).

Tabelle 1 Verwendete Fliegenstämme und ihre photorezeptive Ausstattung

	Pigmente	Cryptochrom	Komplexaugen					Ocellen Rh2	H-B Äuglein	Dorsale Neurone
			Rh1	Rh3	Rh4	Rh5	Rh6			
<i>Canton-S</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yellow white (y w)</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yellow white; cryptochrome^{baby} (y w; cry^b rec9ss)</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	(+)
<i>eyes absent (cl^{eya})</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>sine oculis (so¹)</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>y w; histidine decarboxylase (y w; hdc^{JK910})</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>sine oculis; glass (so¹; gl^{60j})</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	(+)
<i>cl^{eya}; cry^b rec9ss</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)
<i>so¹; cry^b rec9ss</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)
<i>y w; hdc^{JK910}; cry^b rec9ss</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)
<i>Rh5-Gal4/ UAS-ttx; cry^b rec9ss</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	(+)

Tabelle 1: (+) der relevante Photorezeptor ist teilweise durch die Mutation betroffen. Die *cry^b* Mutation beseitigt die Funktion von Cryptochrom in den dorsalen Neuronen, nicht aber die Funktion des unbekannten Photorezeptors in den DN₃. Die *so¹; gl^{60j}* Mutation verhindert die Entwicklung der DN_{1p} aber nicht die der restlichen DN.

3.1.2 Aufzucht und Auswahl der Tiere

Alle Fliegen wurden auf Standardmedium T (siehe Anhang) bei 25°C in einem Licht-Dunkel-Wechsel mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (LD 12:12) aufgezogen. Ein bis drei Tage nach dem Schlüpfen wurden männliche Fliegen einzeln in die Aufzeichnungskammern eingesetzt

3.1.3 Datenaufzeichnung und Lichtprogramme

Die Laufaktivität wurde photoelektrisch, ebenfalls bei 25°C aufgezeichnet (siehe Helfrich-Förster, 1998). Halogenlampen (Osram, Xenophot®) dienten als Lichtquelle, die Intensität wurde mit einem Potentiometer auf 500 Lux eingestellt. Die Laufaktivität wurde für jeweils etwa eine Woche im LD12:12 aufgezeichnet, wobei dieser LD der Lichtphase während der Aufzucht entsprach. Anschließend wurde die Dauer der Lichtperiode entweder auf 16 Stunden und anschließend 20 Stunden verlängert, oder auf 8 Stunden und anschließend auf 4 Stunden verkürzt. Nach jeweils drei unterschiedlichen Lichtphasen wurden die Tiere in Dauerdunkel (DD) überführt. Die Fliegen wurden also unter den folgenden LD aufgezeichnet:

(1) 12:12, 16:8, 20:4, DD oder (2) 12:12, 8:16, 4:20, DD. Die einzelnen LD wurden für jeweils mindestens 7 Tage beibehalten. Die Aufzeichnung im Dauerdunkel wurde abgebrochen sobald die Freilaufperiode gut zu analysieren war.

3.1.4 Datenanalyse

Die Rohdaten wurden mittels des Programms El Temps (Diez-Noguera, Barcelona 1999) als Aktogramme dargestellt. Fliegen, welche die ersten beiden Lichtprogramme nicht überlebten, wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen. Die Aktivitätsmuster der verbliebenen Fliegen wurden einer Periodogrammanalyse unterzogen um deren Perioden zu den unterschiedlichen LD und dem anschließenden DD zu ermitteln.

Fliegen mit einer Periode von 24h ($\pm 0,05$) und mit normaler Phasenbeziehung zu den entsprechenden LD Zyklen (Morgenmaxima um Licht-an und Abendmaxima um Licht-aus) wurden als an den LD Zyklus synchronisiert gewertet. Der Prozentsatz synchronisierter Fliegen wurde für jeden Genotyp unter jedem LD Zyklus ermittelt. Die Daten wurden in Kontingenztabellen für χ^2 Analysen angeordnet, um zu testen ob die Anzahl synchronisierter Fliegen vom Genotyp abhängig ist. Um das typische Aktivitätsprofil der synchronisierten Wildtypfliegen und der Mutanten zu zeigen, wurden von allen Gruppen

Durchschnittstage für die unterschiedlichen LD berechnet und dargestellt. Hierfür wurde wie bei Helfrich-Förster, 2000, beschrieben vorgegangen. Die Durchschnittstage wurden immer nur aus den Bereichen erstellt, in denen die Aktivität stabil war. In der Regel brauchten die Fliegen (Wildtyp und Mutanten) nur einen Tag um sich auf einen neuen LD umzustellen. Daher konnten die Durchschnittstage meist ab dem zweiten Tag jeder Photoperiode berechnet werden. Um die Phasenbeziehung verschiedener Aktivitätsmaxima (Licht-an-, Morgen- und Abendmaxima) zu Licht-an und Licht-aus präziser zu zeigen, glättete ich die Rohdaten mit einem nichtrekursiven digitalen Tiefpassfilter (beschrieben in Helfrich-Förster, 1998). Die Glättung wurde über 51 Datenpunkte gemacht, die „cutoff“ Frequenz wurde auf 3 Stunden gesetzt. Dieser Grad der Glättung erzeugte ein kompakteres Aktivitätsprofil; die Charakteristik von Licht-an- und Morgenmaxima blieben jedoch voll erhalten. Der Zeitpunkt der Morgenmaxima konnte mit Hilfe des Programms El Temps durch Auswahl von Hand der jeweiligen Maxima bestimmt werden. Manchmal war das Glätten nicht ausreichend um das Abendmaximum als einen einzelnen Peak darzustellen. Es zeigte sich, dass dieser aus zwei, drei oder vier „Submaxima“ bestand. Wir fanden allerdings kein systematisches Auftreten von Submaxima und führten deshalb eine weitere Glättung mittels Anwendung eines gleitenden Durchschnitts („moving average“) durch und erreichten so die Darstellung eines einzigen Maximums der Abendaktivität. Für jeden Genotyp wurden Durchschnittstage zu den jeweiligen Licht-Dunkel-Wechseln (LD) berechnet. Auch hier wurde der zweite bis letzte Tag der Photoperiode für die Berechnung verwendet. Die Phase der Aktivitätsmaxima während der unterschiedlichen LD Bedingungen und für die unterschiedlichen Genotypen wurde mit einer „One-Way“ ANOVA und Scheffes *post hoc* Test analysiert und verglichen. Die Perioden aller Fliegen im Freilauf wurden, für jede Fliege, unter jedem LD und jedem DD einzeln mit der Periodogrammanalyse (Sokolove-Bushell, 1978; Programm El Temps) bestimmt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden wurden die Perioden auf eine Abhängigkeit zur Tageslänge mit der „One-Way“ ANOVA gefolgt vom Tukey Test untersucht. Die Daten wurden bei einem p-Wert: $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich gewertet. Einige Datenzusammenstellungen waren nicht normal verteilt wie

durch den „Kolmogorov-Smirnov one-sample Test“ gezeigt wurde. Bei diesen Daten wurde der p-Wert nach dem Verfahren von Glaser (1978) durch die Multiplikation mit dem Faktor fünf angepaßt.

3.1.5 Untersuchungen in Dauerlicht und Histologie von *cll^{eya}*; *cry^b* Mutanten

Hier benützte ich 24 zwei - vier Tage alte männliche *cll^{eya}*; *cry^b* Fliegen. Sie wurden in die bereits oben beschriebene Aktivitätsregistrierungsanlage eingebracht. Die Fliegen wurden 9 Tage einem LD von 12:12 ausgesetzt und danach für 10 Tage in Dauerlicht LL gehalten. Die Lichtstärke betrug in beiden Fällen 100µW/cm². Als Kontrolle dienten 8 *cll^{eya}* Fliegen.

Zum Ende des Experiments wurden die noch lebenden *cll^{eya}*; *cry^b* Fliegen auf Eis demobilisiert und dann die Hirne herauspräpariert. Durch die Einfärbung kann jeder präparierten Fliege ein Aufzeichnungskanal zugeordnet werden.

Die Gehirne wurden immunhistologisch gefärbt. Als Antikörper kamen 1) anti PDH, zur Anfärbung der s-LN_v und l-LN_v mit samt ihrer Verzweigungen, sowie 2) anti Chaoptin (24B10 monoklonaler Antikörper von S. Benzer, siehe Zipursky et al., 1984), zur Anfärbung eventuell vorhandener Photorezeptoren mit Terminalen, zum Einsatz. (siehe Färbeprotokoll Anhang).

Die Auswertung der Färbungen wurde an einem konfokalen Laserscanmikroskop (Karl Zeiss AG Jena) durchgeführt. Die anti PDH - Färbung wurde in grün dargestellt, die anti Chaoptin - Färbung in rot. Die Hemisphären wurden getrennt bewertet.

Die Aktogramme aus der Aktivitätsaufzeichnung wurden einer manuellen Periodogrammanalyse im Programm Oxalis (Joachim Schuster, Tübingen) unterzogen.

3.2 Ergebnisse 1

3.2.1 Kontrollfliegen

Die Tiere der Kontrollstämme verhielten sich unter den gewählten Experimentalbedingungen sehr ähnlich, und die meisten der getesteten Fliegen waren unter den gegebenen Tageslängen synchronisiert. Licht-an provozierte immer einen scharfen Anstieg des Aktivitätsspiegels und Dunkelheit hatte einen unterdrückenden Effekt auf die Aktivität (Abb. 7, 8). Beide Reaktionen sind typische Maskierungseffekte. Aktivität während der Dunkelphase trat lediglich unter Kurztagsbedingungen auf (Abb. 7). Bei sehr kurzen Tagen (LD4:20) kehrte sich der Maskierungseffekt um und die Aktivität schien durch die einsetzende Dunkelheit angeregt zu werden. Neben diesen Maskierungseffekten zeigten die Fliegen ihr ausgeprägtes bimodales Aktivitätsmuster mit Hauptaktivitäten bei Licht-an und Licht-aus (Morgen- und Abendmaxima). Meine Ergebnisse zeigen, dass das morgendliche Aktivitätsmaximum aus dem maskierenden Licht-an Maximum und einer endogenen Komponenten, dem Morgenmaximum besteht (Pfeile in Abb. 7 und 8). Diese zwei Komponenten sind bei einem LD12:12 schwer voneinander zu unterscheiden, da sie unter diesen Bedingungen überlappen. An Kurz- und Langtagen jedoch erscheint das Morgenmaximum vor oder nach dem Licht-an Maximum und dadurch wurden die Komponenten klar voneinander getrennt. Nach dem Transfer in konstante Bedingungen (DD), blieb das Morgenmaximum bestehen, während das Licht-an Maximum sofort verschwand. Dies zeigt, dass das Morgenmaximum ein endogenes Aktivitätsmaximum repräsentiert und das Licht-an Maximum lediglich einen maskierenden Effekt des Lichts darstellt. Wie bereits gesagt hängt die Phase des Morgenmaximums von der Photoperiode ab. Während des Kurztages erscheint es vor Licht-an, im LD12:12 bei Licht-an und während des Langtages nach Licht-an. Das Abendmaximum zeigte vergleichbare Abhängigkeiten der Phasenlage: Es erschien während des Kurztages nach Licht-aus (Abb. 7), beim LD12:12 nahe bei Licht-aus und während des Langtages vor Licht-aus (Abb. 8).

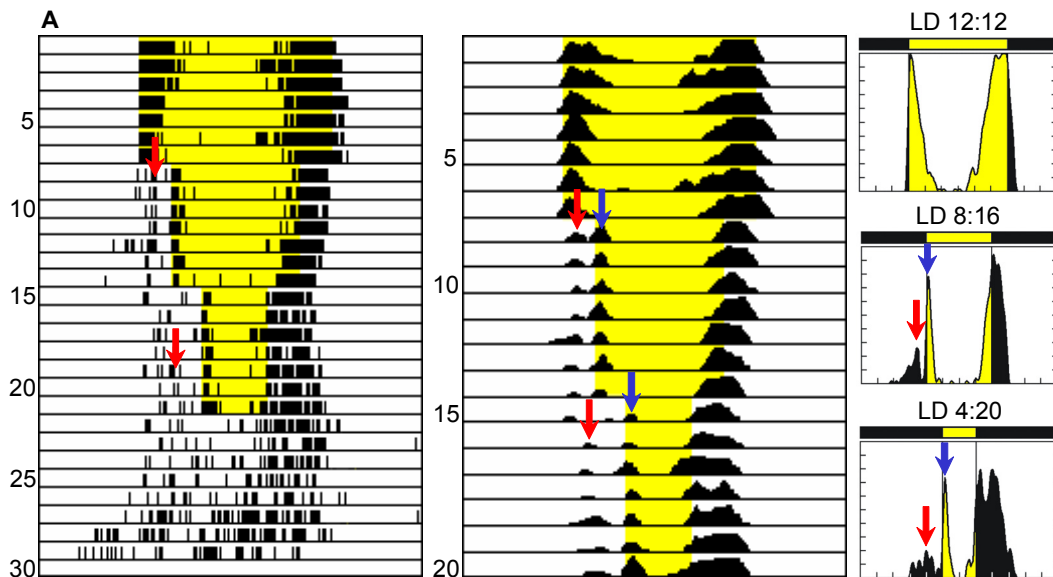


Abbildung 7: Repräsentative Aktivität einer wildtypischen Fliege des *Canton-S* Stammes im Kurztag mit anschließendem Dauerdunkel (DD). Links sind die Rohdaten in Aktogrammform gezeigt, in der Mitte die geglätteten Aktivitätsdaten, um das Aktivitätsmaximum von Licht-an (Maskierung) und Morgenmaximum (circadian) deutlicher zu unterscheiden. Rechts ist das durchschnittliche Aktivitätsprofil dieses Tieres (aus ungeglätteten Daten berechnet), der so genannte Durchschnittstag; unter den drei verschiedenen Photoperioden gezeigt. Die roten Pfeile markieren die Morgenmaxima, die blauen Pfeile die durch das angehende Licht verursachten Licht-an Maxima. In den Kurztagen ist das Morgenmaximum soweit vorhanden stets vor dem Licht-an Maxima sichtbar. Die Freilaufperiode im anschließenden DD ist kürzer als 24 Stunden. Zu beachten ist, dass im DD die Freilaufkomponente jeweils vom vorangehenden Morgenmaximum startet und nicht vom Licht-an Maximum.

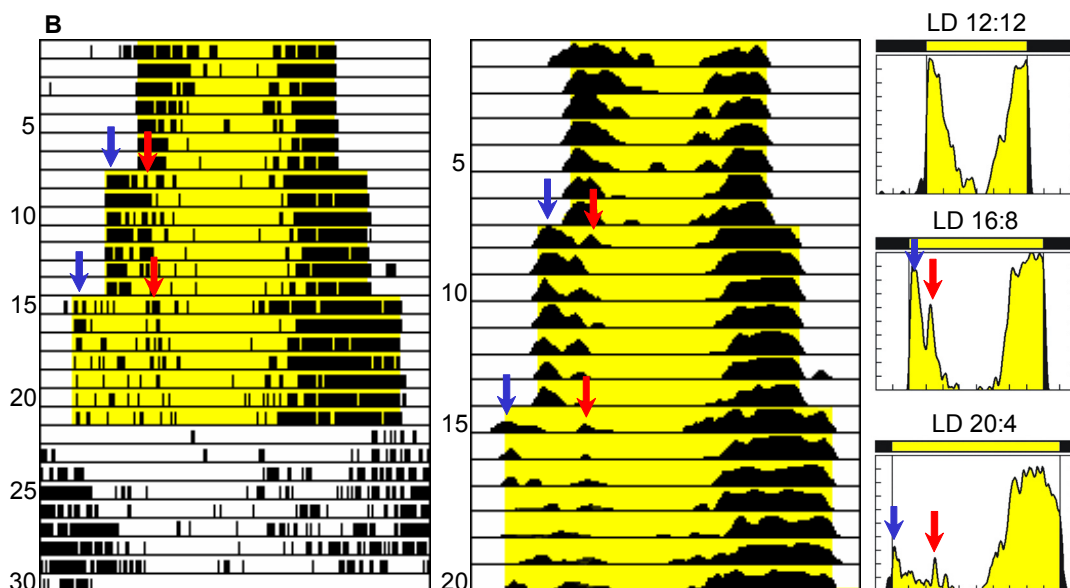


Abbildung 8: Repräsentative Aktivität einer wildtypischen Fliege des *Canton-S* Stammes im Langtag mit anschließendem Dauerdunkel (DD). Links sind die Rohdaten in Aktogrammform gezeigt, in der Mitte die geglätteten Aktivitätsdaten und rechts die Durchschnittstage aus den Rohdaten der einzelnen Lichtperioden. Die roten Pfeile markieren die Morgenmaxima, die blauen Pfeile die durch das angehende Licht verursachten Licht-an Maxima. In den Langtagen ist das Morgenmaximum soweit vorhanden stets nach dem Licht-an Maximum sichtbar. Die Freilaufperiode im anschließenden DD ist länger als 24 Stunden.

Ich ermittelte dann den Abstand zwischen den Morgen- und Abendmaxima. Der Abstand blieb unter den unterschiedlichen Lichtbedingungen nicht konstant, sondern war unter Kurztagsbedingungen kleiner und unter Langtagsbedingungen größer. Nicht nur der Abstand von Morgenmaximum und Abendmaximum, sondern auch die Freilaufperiode im anschließenden Dauerdunkel (DD) wurde durch die vorhergehende Tageslänge beeinflusst. Die Periode war nach Langtagsbedingungen signifikant länger als nach Kurztagsbedingungen (Abb. 7, 8).

3.2.2 Mutanten ohne funktionelles Cryptochrom

Die überwiegende Mehrzahl von Fliegen der *cry^b* Mutante synchronisierte wie die Kontrolltiere zu moderaten und langen Photoperioden. Jedoch zeigten diese Mutanten eine signifikante reduzierte Fähigkeit zur Mitnahme bei sehr kurzen Tagen (LD4:20): nur 63% der Fliegen waren zur Mitnahme fähig. Die Fliege in Abb. 9 zeigte im LD4:20 Freilauf.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die *cry^b* Mutanten ein ziemlich starkes und scharfes Licht-an Maximum, während das Morgenmaximum sehr schwach ausgeprägt war (Pfeile in Abb. 9). In anderer Hinsicht war das Aktivitätsmuster der *cry^b* Mutanten vergleichbar zu dem der Kontrollen: das Morgenmaximum, falls es sichtbar war, erschien an Kurztagen vor Licht-an und an Langtagen nach Licht-an, das Abendmaximum erschien an Kurztagen nach Licht-aus und an Langtagen vor Licht-aus. Die Phasenbeziehung von Morgen- zu Abendmaximum war wie bereits in den Kontrollen gezeigt von der Tageslänge abhängig, mit einer Vergrößerung bei zunehmender Tageslichtlänge.

Im Unterschied zu den Kontrollfliegen war die Länge der Freilaufperioden im anschließenden Dauerdunkel (DD) nicht von der vorherigen Tageslänge abhängig. Tatsächlich blieb die Periodenlänge nach Kurz- und Langtagen gleich, was darauf hindeutet, dass das Wildtyp Cryptochrom für die parametrischen Effekte der Tageslänge auf die Periode der Inneren Uhr notwendig ist.

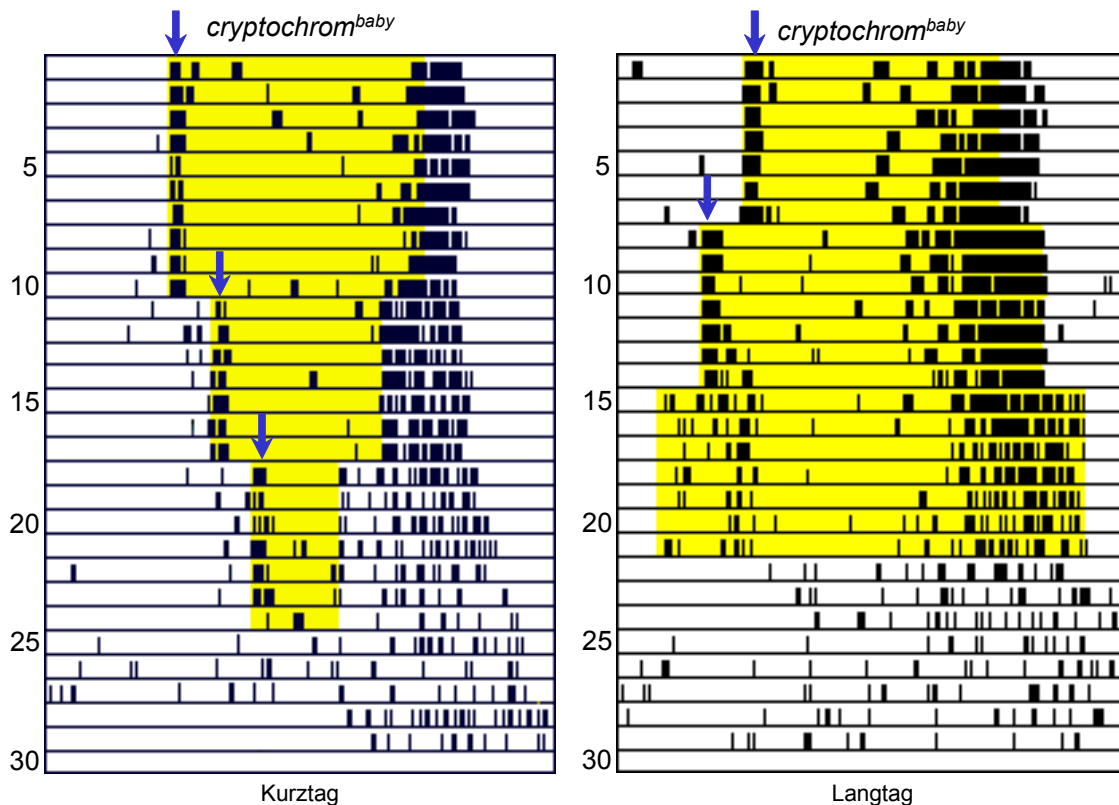


Abbildung 9: Repräsentative Aktogramme der Blaulichtrezeptormutante *cry^b* im Kurztag und Langtag mit unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. Zu beachten ist, dass die *cry^b* Mutante eine besonders starke Reaktion auf Licht-an zeigt (blaue Pfeile). Dagegen fällt das Morgenmaximum sehr schwach aus (Ausnahme Langtag bei LD20:4). Die hier exemplarisch gezeigte Fliege konnte nicht zum LD4:20 synchronisieren. Tatsächlich waren nur 63% der Fliegen der Mutante zur Mitnahme fähig.

3.2.3 Mutanten ohne funktionelle Komplexaugen (und Ocellen)

Das Fehlen der Komplexaugen in der Mutante *cl^{eya}* und *so¹* beeinflusste signifikant die Fähigkeit der Fliegen zur Mitnahme bei extrem kurzen oder langen Photoperiode. Etwa 70% der *cl^{eya}* Mutanten, (*cl^{eya}* fehlen nur die Komplexaugen), zeigten in den extrem langen Photoperioden des LD20:4 Freilauf mit einer Periodenlänge von 24,6h. In einigen Fliegen teilte sich das Morgenmaximum in eine kurzperiodische und eine langperiodische Komponente auf, diese befanden sich ebenfalls im Freilauf (Abb. 10). Beide Komponenten näherten sich, allerdings von zwei unterschiedlichen Seiten, an das Abendmaximum an. *so¹* Mutanten, denen sowohl die Ocellen als auch die Komplexaugen fehlen, waren bei einem LD20:4 nicht mehr zur Mitnahme fähig (Abb. 11). Einige Fliegen waren bereits unter moderaten Lang- oder Kurztagen (LD8:16 und LD16:8) im Freilauf. Im LD20:4 liefen 5 der 13 getesteten Fliegen mit einer ziemlich langen Periode (24,9h) frei, 4 der Fliegen zeigten ein

Aktivitätsmuster mit mehreren Freilaufkomponenten, und die restlichen 4 waren komplett arrhythmisch.

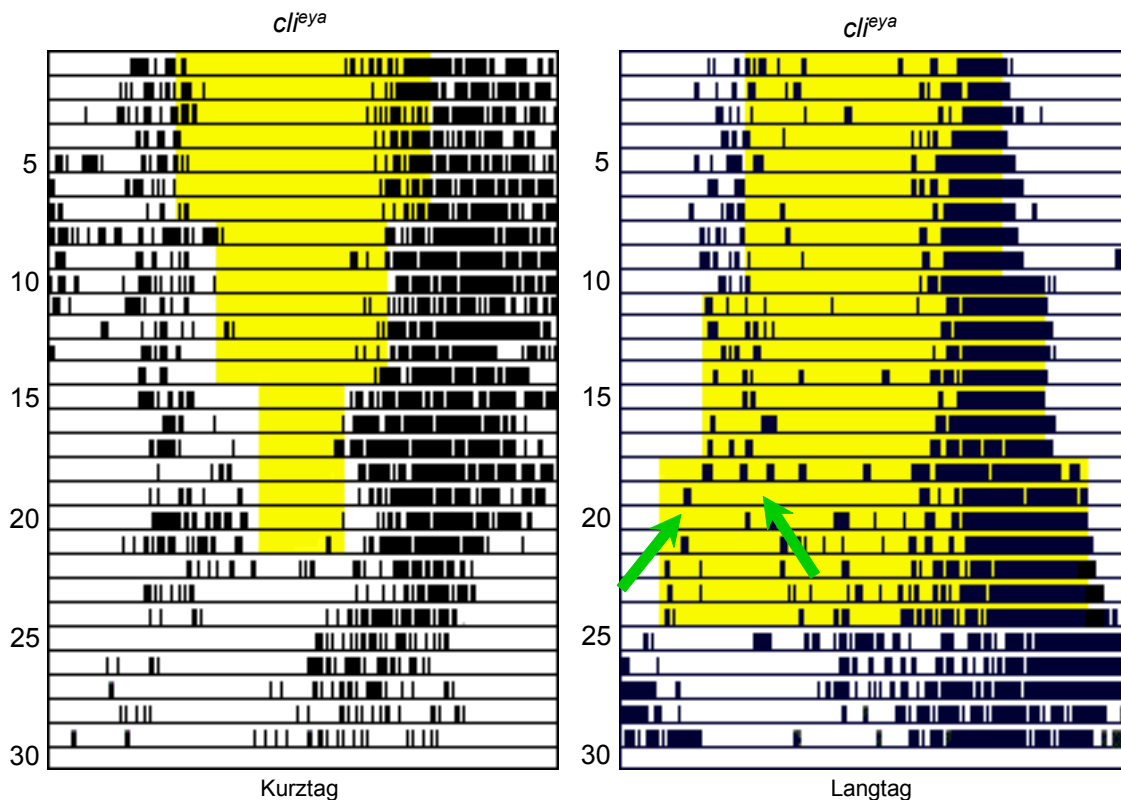


Abbildung 10: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante *cll^{eya}* im Kurztag und Langtag mit unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. Die *cll^{eya}* Mutante hat kein Licht-an Maximum, sondern zeigt ein ausgeprägtes circadianes Morgenmaximum. Das Tier im Kurztag synchronisierte zu allen Photoperioden, das Tier im Langtag war nur im LD12:12 und LD16:8 synchronisiert. Im LD20:4 lief die Abendkomponente mit langer Periode frei und die Morgenkomponente teilte sich in zwei Freilaufperioden mit einer kurzen und einer langen Periode (grüne Pfeile).

Auch das Aktivitätsmuster der synchronisierten *so¹* und *cll^{eya}* Fliegen war unterschiedlich zu dem der Kontrollen und der *cry^b* Mutanten. Die Phasenbeziehung von Morgen- und Abendmaximum der *so¹* und *cll^{eya}* Mutanten blieb über das Experiment hinweg mehr oder weniger gleich und die üblichen Maskierungseffekte fehlten. Weder zeigten sich Licht-an Maxima noch wurde die Aktivität durch Dunkelheit unterdrückt. Trotz dieser massiven Unterschiede zu den Kontrolltieren war die Freilaufperiode in DD der *so¹* und *cll^{eya}* Mutanten nach Langtagen signifikant länger als nach Kurztagen. Dies zeigt, dass die Tageslänge selbst beim Fehlen der Komplexaugen die Periodenlänge der Inneren Uhr beeinflusst, und deutet daraufhin, dass dieser Effekt durch andere Photorezeptoren vermittelt wird.

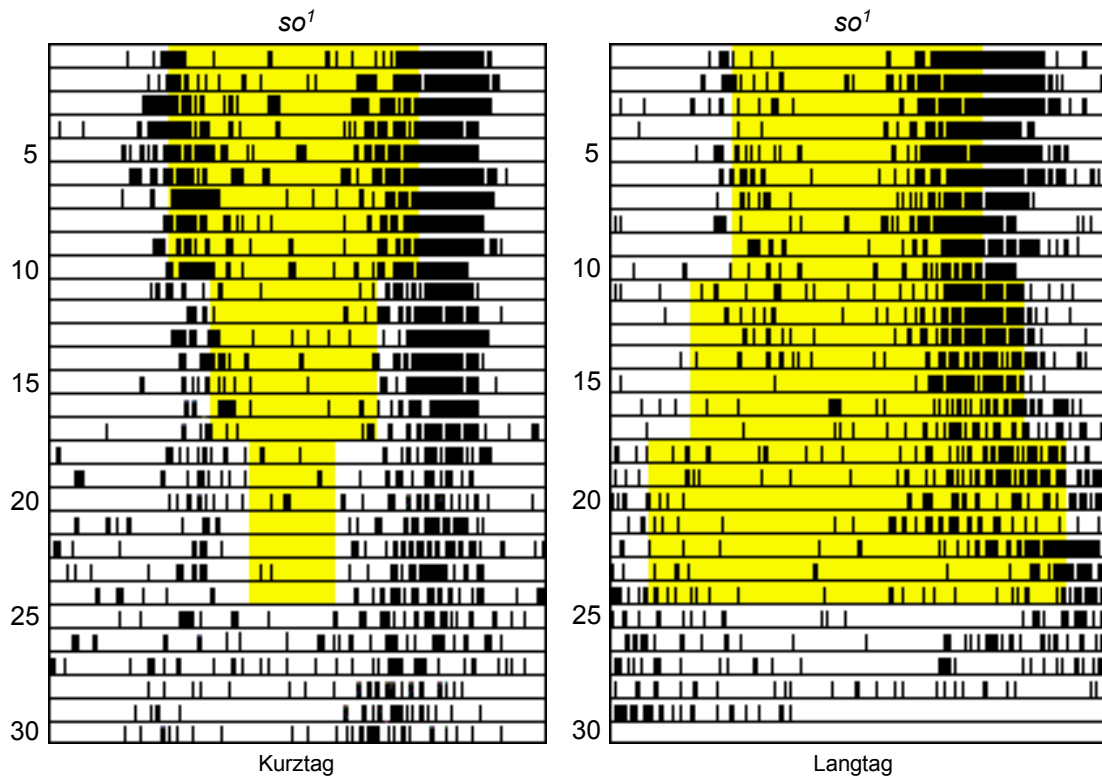


Abbildung 11: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante so^1 im Kurztag und Langtag zu unterschiedlichen Photoperioden mit sich anschließendem DD. Im LD20:4 wurde die Aktivität unregelmäßig und ging dann am Tag 22 in Freilauf mit langer Periode über.

3.2.4 Mutanten ohne funktionelle Komplexaugen, Ocellen, und H-B Äuglein

Die hdc^{JK910} Mutante kann kein Histamin synthetisieren. Histamin ist der Neurotransmitter der Komplexaugen, der Ocellen und des H-B Äugleins. Diese Mutation beeinflusst jedoch nicht die Funktion der DN, welche ein unbekanntes Photopigment besitzen. Außerdem ist Cryptochrom in den LN und DN normal vorhanden.

hdc^{JK910} Mutanten waren bei der Mitnahme nur wenig schlechter als die so^1 Mutanten: im Gegensatz zu 77% der so^1 Mutante konnten nur 57% der hdc^{JK910} Mutante im LD16:8 synchronisieren. Wie bei der so^1 Mutante konnte keine der hdc^{JK910} Fliegen beim LD20:4 synchronisieren, aber im Gegensatz zu so^1 Mutanten wurden nur 4 der 18 getesteten hdc^{JK910} Fliegen arrhythmisch. Die verbleibenden 14 Fliegen hatten eine extrem lange Freilaufperiode (30,8h; Abb. 12).

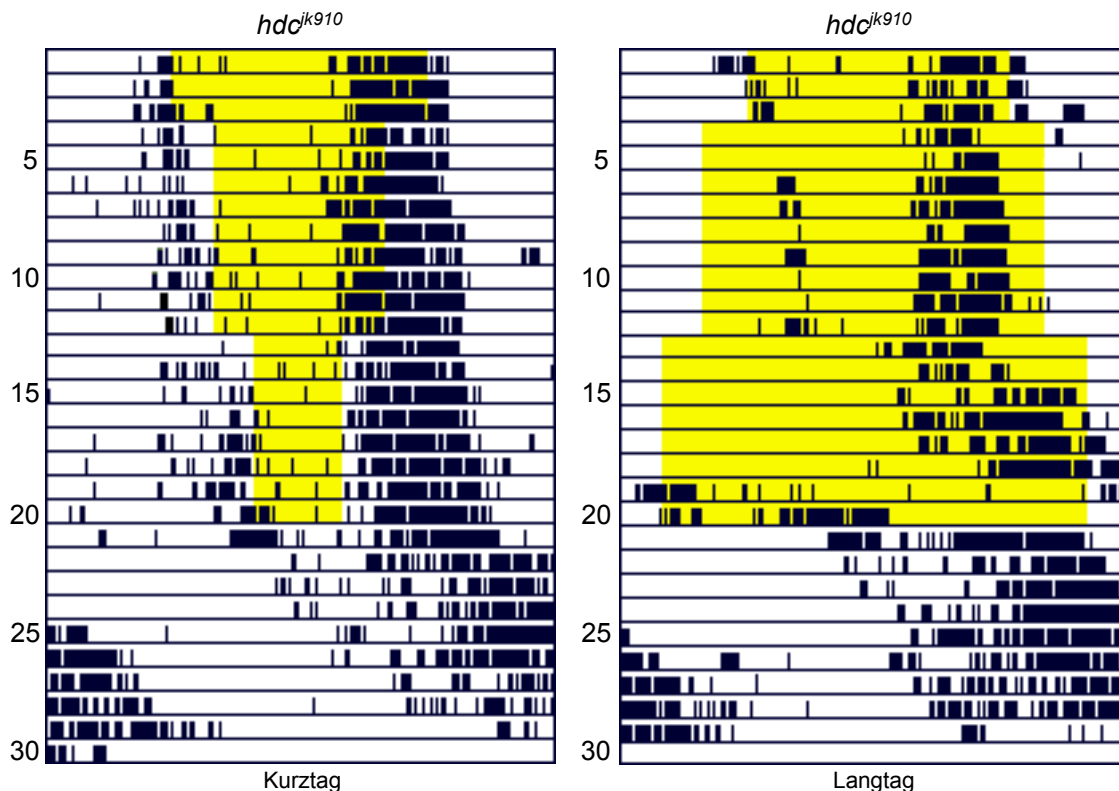


Abbildung 12: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante *hdc^{jk910}* im Kurztag und Langtag zu unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. Im LD20:4 verfiel die Fliege in Freilauf mit einer Periode von 27,4 Stunden.

Um herauszufinden, ob die extrem lange Periode unter Langtagbedingungen typisch für Fliegen ist, die keine funktionierenden Komplexaugen, Ocellen und H-B Äuglein haben, testete ich auch die *so¹; gl^{60j}* Mutante. Diesen Tieren fehlen sowohl die Komplexaugen, die Ocellen, die H-B Äuglein als auch die DN_{1p} eine Untergruppe der dorsalen Neurone. Wie auch andere augenlose Mutanten waren die Fliegen im LD20:4 im Freilauf. Doch anstatt eine extreme Periodenverlängerung zu zeigen, spaltete bei 5 von 13 getesteten Fliegen der Rhythmus in zahlreiche Komponenten auf und 4 Fliegen wurden arrhythmisch (nicht gezeigt). Die verbleibenden 4 Fliegen zeigten Freilauf mit einer moderat verlängerten Periode (24,4h). Daher kann gesagt werden, dass das Fehlen der Funktion des H-B Äugleins, der Komplexaugen und der Ocellen nicht für die extreme Periodenverlängerung im LD20:4 verantwortlich ist. Eher scheinen die Gründe für die festgestellten Unterschiede im Verhalten der *so¹* und *hdc^{jk910}* Mutanten in Unterschieden des genetischen Hintergrundes oder in pleiotropischen Effekten der Mutationen zu liegen. Bei den synchronisierten

hdc^{jk910} Mutanten vergrößerten sich die Phasenbeziehung von Morgen- und Abendmaxima bei zunehmender Tageslänge nicht. Auch wurden in den *hdc^{jk910}* und *so; gl^{60j}* Mutanten keine Licht-an Maxima gefunden und die Dunkelheit unterdrückte nicht die Aktivität. Dafür zeigten sich im LD12:12 und LD16:8 paradoxe Maskierungseffekte: hier wurde die Aktivität durch Licht-aus angeregt. (siehe Abbildung 21 Durchschnittstage)

Im Unterschied zu den anderen augenlosen Mutanten war die Periodenlänge im Dauerdunkel bei den *hdc^{jk910}* und *so; gl^{60j}* Mutanten nicht abhängig von der vorhergehenden Tageslänge, was darauf hindeutet, dass das H-B Äuglein an diesem Effekt normalerweise beteiligt ist.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse mit den 4 Mutanten, die die Funktion der Komplexaugen (*cli^{eya}*), der Komplexaugen und der Ocellen (*so¹*), oder der Komplexaugen, der Ocellen und der H-B Äuglein (*hdc^{jk910}* und *so; gl^{60j}*) beeinträchtigen, folgenden Sachverhalt:

- (1) Alle drei Photorezeptororgane tragen zur Mitnahme bei extremen Photoperioden bei, die Komplexaugen leisten hier besonders einen Beitrag zur Synchronisation und Mitnahme bei Langtagen (Abb. 13).
- (2) Die Komplexaugen vermitteln die Abhängigkeit der Phasenbeziehung zwischen Morgenmaximum und Abendmaximum von der Tageslänge.
- (3) Ausschließlich die Komplexaugen sind für die Maskierungseffekte des Lichts verantwortlich.
- (4) Cryptochrom scheint dagegen eher für die Synchronisation in Kurztagen wichtig zu sein (Abb. 13) und spielt keine Rolle bei der Anpassung der Phasenbeziehung von Morgen und Abendmaxima an die Tageslänge. Zusätzlich ist Cryptochrom für die Verlängerung der Periode im Langtag verantwortlich.

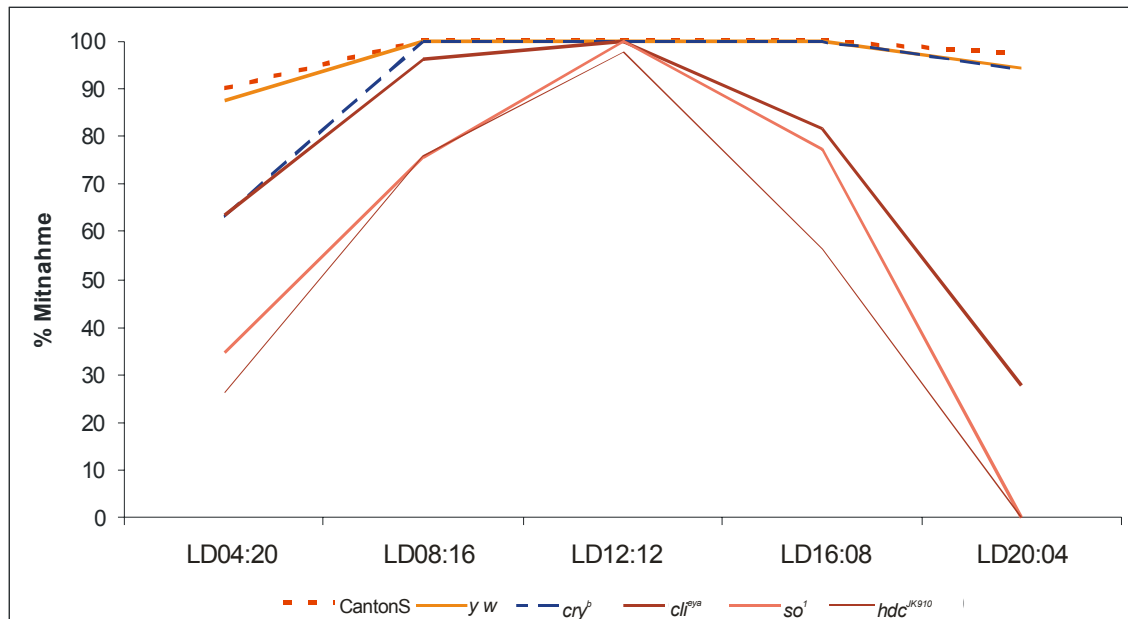


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Mitnahme der getesteten Fliegenstämme in Prozent. Deutlich ist die verminderte Fähigkeit zur Mitnahme der Augenlosen Mutanten *so* und *cll^{eya}* bei extremen Photoperioden zu sehen. Die *cry^b* Mutanten haben im extremen Kurztag Probleme mit der Mitnahme.

Im Folgenden sollte getestet werden, wie sich das gleichzeitige Ausschalten von Cryptochrom und weiterer verschiedener Photorezeptororgane auf die Synchronisationsfähigkeit der Fliegen auswirkt.

3.2.5 Ausschalten von Cryptochrom und den H-B Äuglein

In der *Rh5-Gal4; cry^b / UAS-ttx; cry^b* Kreuzung kann durch die selektive Expression von Tetanustoxin unter Kontrolle des Promotors Rh5-Gal4 die Funktion des H-B Äugleins abgeschaltet werden. Da die Nachkommen der Kreuzung ebenfalls homozygot die *cry^b* Mutation tragen, ist die Funktion des Cryptochroms ebenfalls abgeschaltet. Die Kreuzung verhält sich sehr ähnlich zur *cry^b* Mutante, zeigt beim extremen Kurztag (LD4:20) aber auch beim extremen Langtag (LD20:4) nochmals ein verschlechtertes Mitnahmeverhalten (Abb. 14). (Mitnahme zu den unterschiedlichen LD siehe Tab. 3)

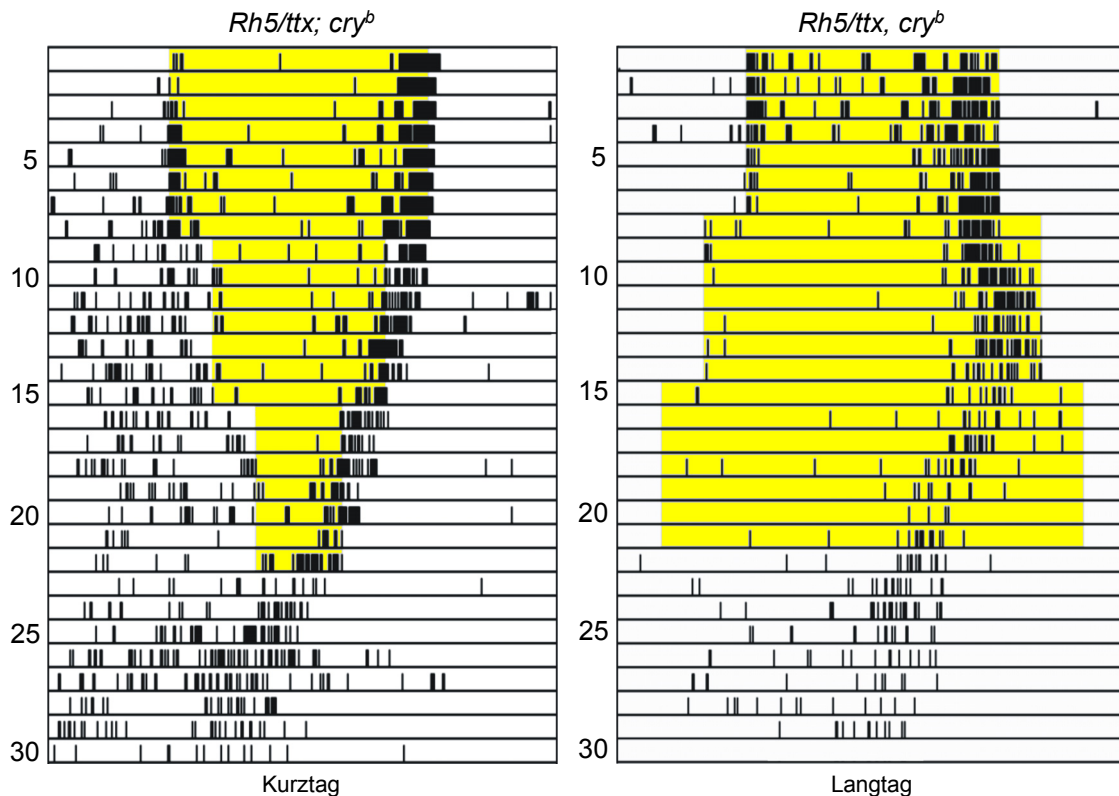


Abbildung 14: Repräsentative Aktogramme der Kreuzung *Rh5/ttx; cry^b* im Kurztag und Langtag zu unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. Im LD20:4 verfiel die Fliege mit einer kurzen Periode in Freilauf.

Interessanterweise hatten die Tiere der F₁ Generation der Kreuzung *Rh5/ttx; cry^b* im Langtag eine sehr kurze Periodenlänge. Sie war sogar noch kürzer als die der *cry^b* Einzelmutante unter LL Bedingung. Dies deutet darauf hin, dass das H-B Äuglein im Langtag beim Wildtyp zur Periodenverlängerung beiträgt. Um dies zu testen, wählte ich eine Mutante aus, bei der Cryptochrom in seiner funktionslosen Form vorliegt und die keine Komplexaugen hat, bei der aber die H-B Äuglein vorhanden sind. Diese Voraussetzungen erfüllt die *cll^{eya}; cry^b* Doppelmutante. Wenn das H-B Äuglein eine periodenverlängernde Wirkung im Dauerlicht hat, sollten diese Tiere unter LL Bedingungen eine längere Periodenlänge zeigen, als Tiere ohne funktionsfähiges H-B Äuglein. Bei diesen Untersuchungen konnten die *cll^{eya}; cry^b* Doppelmutanten als ihre eigene interne Kontrolle dienen: Da der optische Lobus bei *cll^{eya}* stark verkleinert ist, scheinen die H-B Äuglein manchmal ihr normales Projektionsgebiet, die akzessorische Medulla, nicht zu finden. Bei anderen Tieren fehlen die H-B Äuglein offensichtlich ganz. Zusätzlich kommt es eventuell durch fehlende Projektionen

zu einer irregulären akzessorischen Medulla. Das heißt, bei einigen Tieren ist das H-B Äuglein wahrscheinlich funktionslos, während es bei anderen normal funktioniert. Durch histologische Untersuchung der Versuchstiere, sollte es also möglich sein zu testen, ob es eine Korrelation zwischen langer Periode im LL und Vorhandensein des H-B Äugleins gibt.

3.2.6 Einfluss der H-B Äuglein auf die Aktivitätsrhythmik unter Dauerlicht (LL)

Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 2 und grafisch in Abbildung 16 dargestellt. Von den 24 aufgezeichneten Fliegen überlebten nur 15 bis zum Ende des Versuchs. Bei der Präparation wurden 2 Gehirne beschädigt, so dass von diesen nur jeweils eine Hirnhälfte zur Analyse herangezogen werden konnte.

Tabelle 2: Auswertung der histologischen Begutachtung individueller *cl^{eya}*; *cry^b* und ihrer Aktivitätsperioden

Kanal	Anzahl der H-B Äuglein	Periodenlängen in LL	Projektion H-B Äuglein
235	1	23,55	normal
237	1	23,10	normal
238	1	23,60	normal
242	1	23,90	normal
251	1	23,50	normal
234	2	arr.	irregulär/normal
249	2	23,25	irregulär/
254	2	23,56	irregulär/
233	1	23,30	irregulär
245	1	23,46	irregulär
240	0	23,66	-
241	0	23,38	-
252	0	23,16	-
256	0	23,30	-

Aufgetragen sind die individuellen Tiere, die durch ihre Kanalnummer identifiziert werden können, die Anzahl der gefundenen H-B Äuglein pro Tier, die individuelle Periodenlänge der einzelnen Tiere sowie das Verzweigungsmuster der gefundenen H-B Äuglein.

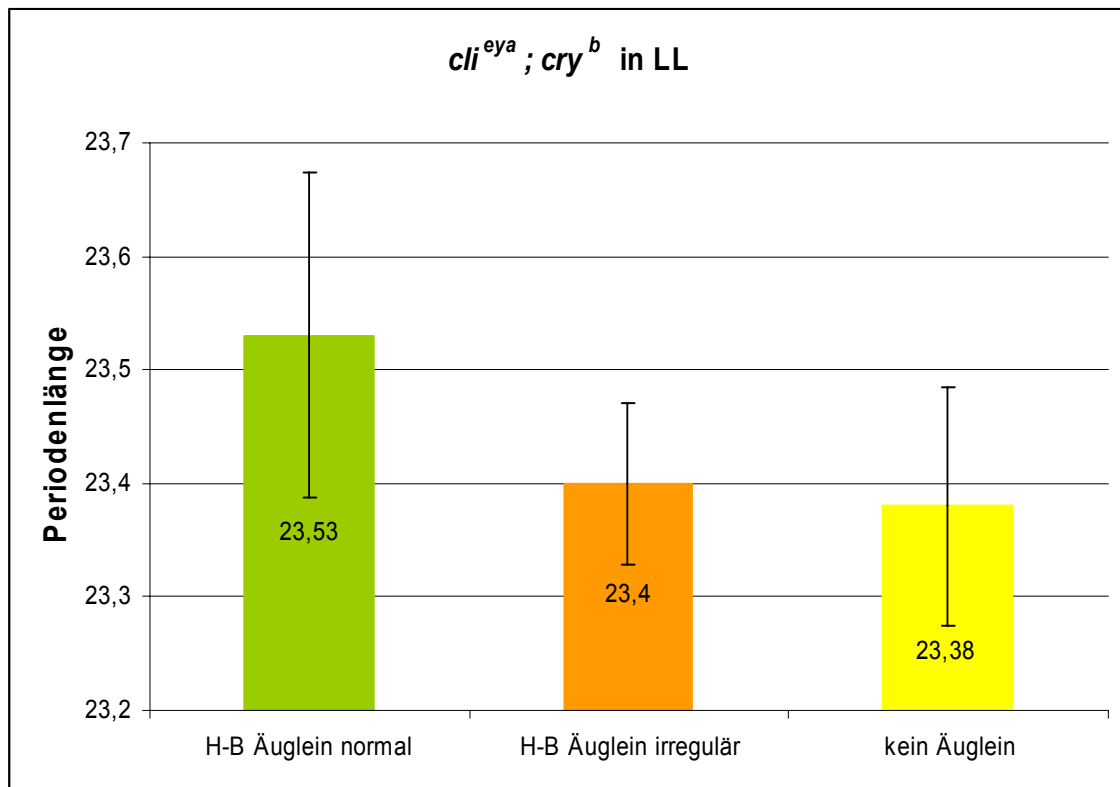


Abbildung 16: Mittlere Periodenlängen von *cli^{eya}; cry^b* Mutanten mit einem normal projizierendem H-B Äuglein (grün), einem irregulär projizierendem Äuglein (orange) und Tieren ohne H-B Äuglein (gelb). Die Unterschiede in den Periodenlängen sind nicht signifikant. Es zeigt sich aber, dass Tiere mit irregulär projizierendem H-B Äuglein und mit fehlendem H-B Äuglein eine ähnliche Periodenlänge haben. Die Periodenlänge der Tiere mit einem normal projizierendem H-B Äuglein ist etwas länger.

Es zeigte sich bei den mikroskopischen Untersuchungen, dass von den 28 untersuchten Hirnhemisphären 14 Hemisphären ein darstellbares H-B Äuglein mit Verzweigungen ins Gehirn hatten. Von den 14 H-B Äuglein waren jedoch 9 irregulär ins Gehirn verzweigt und lediglich 5 H-B Äuglein trafen annähernd ihr Zielgebiet, die akzessorische Medulla. Diese Gehirne wertete ich als "normal" projizierend.

Bei keinem Gehirn konnte ich in beiden Gehirnhemisphären gleichzeitig gut entwickelte und regulär projizierende H-B Äuglein finden. Die einzige Fliege mit einem normalen und einem irregulär projizierenden H-B Äuglein war arrhythmisch.

In Abbildung 17 sind exemplarisch Aktogramme für die drei unterschiedlichen Morphologien gezeigt. Die Aktivität der Tiere wurde für 19 Tage aufgezeichnet.

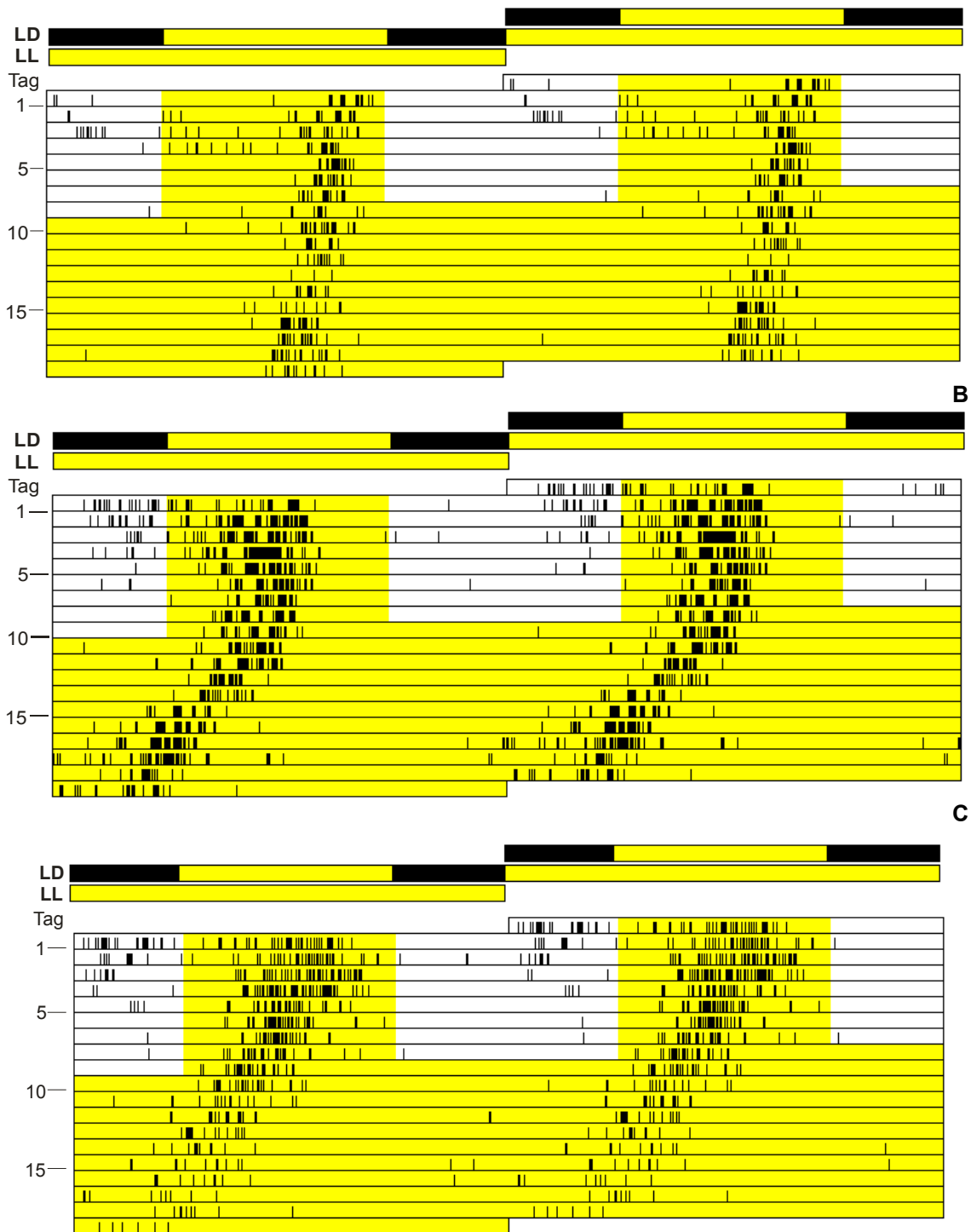


Abbildung 17: Aktogramme von *cl^{eya}; cry^b* Fliegen mit unterschiedlich entwickelten H-B Äuglein. Die ersten 8 Tage wurden die Fliegen in einem 12:12 LD bei $100\mu\text{W}/\text{cm}^2$ gehalten. Am neunten Tag wurde das Licht nicht ausgeschaltet. Die folgenden 10 Tage befanden sich die Tiere in Dauerlicht (LL). **A.** Fliege mit einem die akessorische Medulla normal innervierendem H-B Äuglein. Die Periodenlänge im LL betrug 23,9 Stunden. **B.** Fliege mit einem irregulär projizierendem H-B Äuglein. Im LL lief das Tier mit einer Periodenlänge von 23,30 Stunden frei. **C.** Fliege ohne nachweisbares H-B Äuglein. Hier betrug die Freilaufperiodenlänge im LL 23,38 Stunden.

Die Auswertung der aufgezeichneten Fliegen ergab einen kleinen Einfluss der H-B Äuglein auf die Aktivitätsrhythmik. Es scheint ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines normal in die akzessorische Medulla projizierenden H-B Äugleins und der Periodenlänge in Dauerlicht (LL) zu bestehen (Abb. 16). Wie an den aufgetragenen Fehlern bereits zu sehen ist, sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Die mittlere Periodenlänge aller getesteten Fliegen im LL liegt bei $23,73 \pm 0,05$.

Von den 8 *cl^{eya}* Kontrollen konnten 5 ausgewertet werden. Diese 5 Tiere zeigten unter LD12:12 eine mittlere Periodenlänge von 24 Stunden, unter dem Einfluss von Dauerlicht (LL) eine komplexe Rhythmik beziehungsweise arrhythmische Aktivität.

3.2.7 Ausschalten von Cryptochrom, den Komplexaugen und den Ocellen

Bei der *so¹; cry^b* Mutante ist Cryptochrom ausgeschaltet, es fehlen die Komplexaugen und die Ocellen, die H-B Äuglein sind jedoch noch vorhanden (Helfrich-Förster et al., 2002). 50% der *so¹; cry^b* Fliegen waren im LD12:12 zur Mitnahme fähig, nur sehr wenige im LD8:16 und LD16:8, und keine der Fliegen zu den extrem kurzen oder langen Photoperioden LD4:20 und 20:4 (Abb. 18A). Dies zeigt, dass die H-B Äuglein alleine, im Gegensatz zu Komplexaugen oder Cryptochrom, wenig effektive circadiane Photorezeptoren sind. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen an diesen Fliegen (Helfrich-Förster et al., 2002). *cl^{eya}; cry^b* Fliegen, die zusätzlich zu den H-B Äuglein noch die Ocellen besitzen, verhielten sich ähnlich (Abb. 18B). Im Vergleich zu *so¹; cry^b* Fliegen war der prozentuale Anteil der *cl^{eya}; cry^b*, die im LD16:8 synchronisieren konnten ein wenig höher, was darauf hindeutet, dass auch die Ocellen zur circadianen Photorezeption beitragen, aber deutlich weniger effektiv sind als die Komplexaugen und Cryptochrom. Bei beiden Mutanten sind die DN intakt. Daher kann angenommen werden, dass die DN, die ein unbekanntes Photopigment anstelle von Cryptochrom oder zusätzlich zu diesem verwenden, ebenfalls zur Mitnahme beitragen.

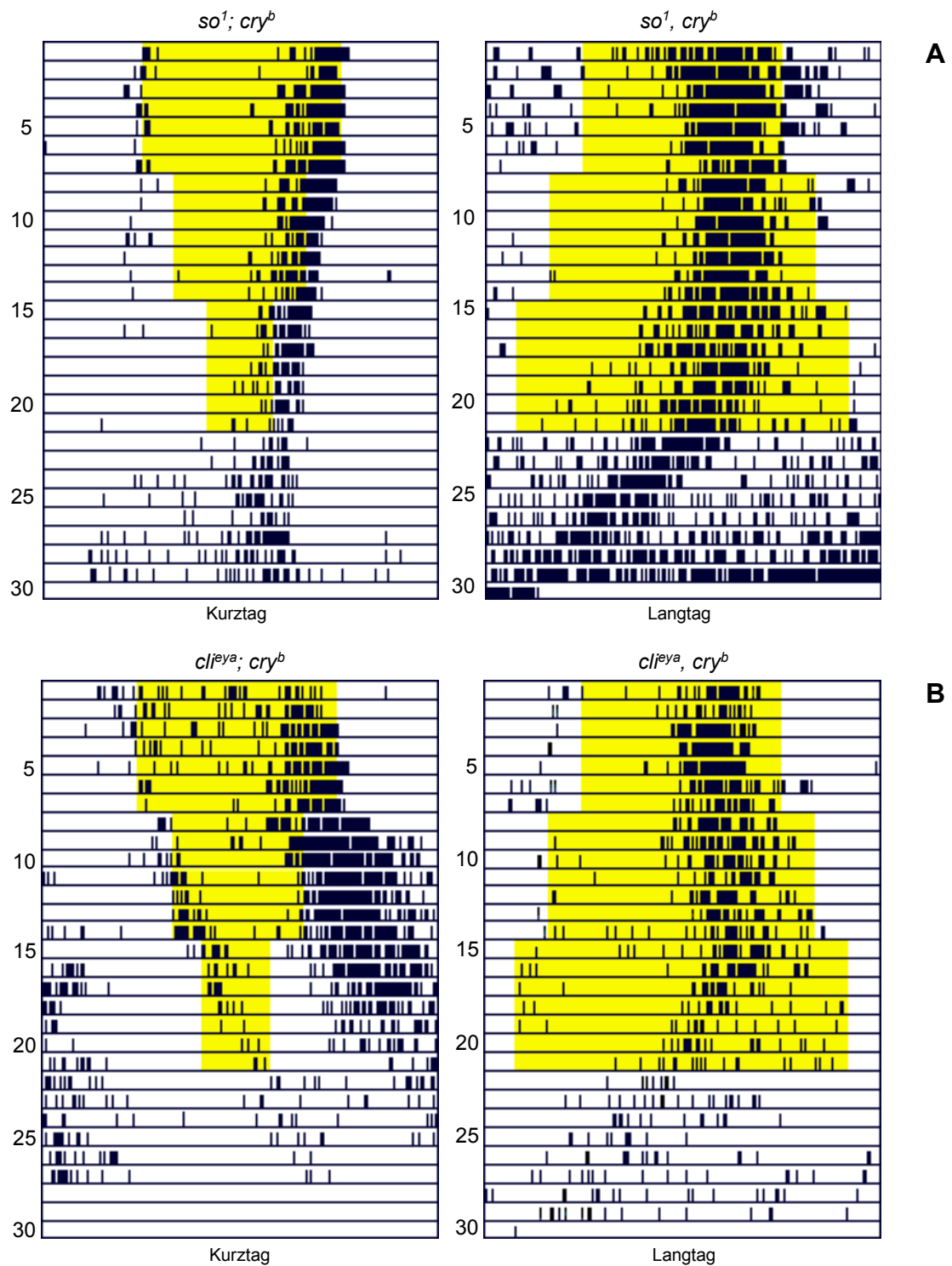


Abbildung 18: Repräsentative Aktogramme von *cl^{eya}; cry^b* und *so¹; cry^b* Mutanten im Kurztag und Langtag mit unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. **A.** *cl^{eya}; cry^b* Fliegen besitzen nur noch die Ocellen, das H-B Äuglein und das unbekannte Pigment in den DN. *cl^{eya}; cry^b* zeigte Mitnahme **B.** *so¹; cry^b* Mutanten besitzen nur noch das H-B Äuglein und das unbekannte Pigment in den DN. Die Fliegen beider Mutanten zeigen Mitnahme im LD12:12 und im moderaten Langtag (LD16:8), jedoch nicht im Kurztag.

Um den Beitrag der DN zur Synchronisation genauer zu bewerten, untersuchte ich Mutanten, bei denen sämtliche Photorezeptoren eliminiert sind mit Ausnahme des unbekannten Photopigments der DN.

3.2.8 Mutanten einzig mit dem unbekannten Photopigment in den DN

Ich benutzte hier die *hdc^{jk910}; cry^b* Mutante. Bei dieser ist die Funktion aller Photorezeptoren, bis auf das unbekannte Photopigment in den DN₃ eliminiert. Nur eine sehr geringe Anzahl dieser Mutanten war fähig im LD12:12 zu synchronisieren, und in den darauf folgenden Tageslängen waren alle Fliegen im Freilauf. Alle *hdc^{jk910}; cry^b* Mutanten, egal ob sie synchronisiert waren oder nicht, begannen ihre Aktivität am ersten Versuchstag zur selben Zeit (Abb. 19). Diese Phase war übereinstimmend mit dem LD Zyklus, dem die Tiere als Larve oder Puppe ausgesetzt waren. Dies zeigt, dass sie bereits während ihrer Entwicklung synchronisiert wurden, was mit der Hypothese übereinstimmt, dass das Bolwigsche Organ der circadiane Photorezeptor der Larve ist. Das Bolwigsche Organ ist in der *hdc^{jk910}* Mutante funktionsfähig, da dieses Acetylcholin und nicht Histamin als Neurotransmitter benützt (Pollack and Hofbauer, 1991; Yasuyama and Meinertzhagen, 1999; Wegener et al., 2004). Interessanterweise war die Freilaufperiode der *hdc^{jk910}; cry^b* Fliegen im LD12:12 nahe bei 24h und verlängerte sich kontinuierlich beim Verlängern oder Verkürzen der Tageslängen bis die recht lange Periodenlänge erreicht wurde, die unter DD Bedingungen zu beobachten war. Im Weiteren zeigten einige Fliegen relative Koordination: die Periode war nah bei 24h, wenn die Aktivität mit der Lichtphase übereinstimmte und wurde sehr lang, sobald die passende Phasenbeziehung zum LD verloren ging. Beide Phänomene zeigen, dass die Fliegen immer noch die Information über den LD Zyklus erhalten und versuchen, ihre Innere Uhr an den 24 Stunden Zyklus anzupassen. Je extremer die Tageslängen wurden, desto weniger waren die Fliegen zu dieser Anpassung in der Lage, und als Konsequenz näherten sie sich an die Freilaufperiode an oder sie zeigten relative Koordination. Mein Ergebnis zeigt, dass trotz des Einflusses des Licht-Dunkel-Zyklus auf die Aktivität einiger

weniger Fliegen die DN_3 alleine kaum in der Lage sind, den Aktivitätsrhythmus der Fliegen zu synchronisieren.

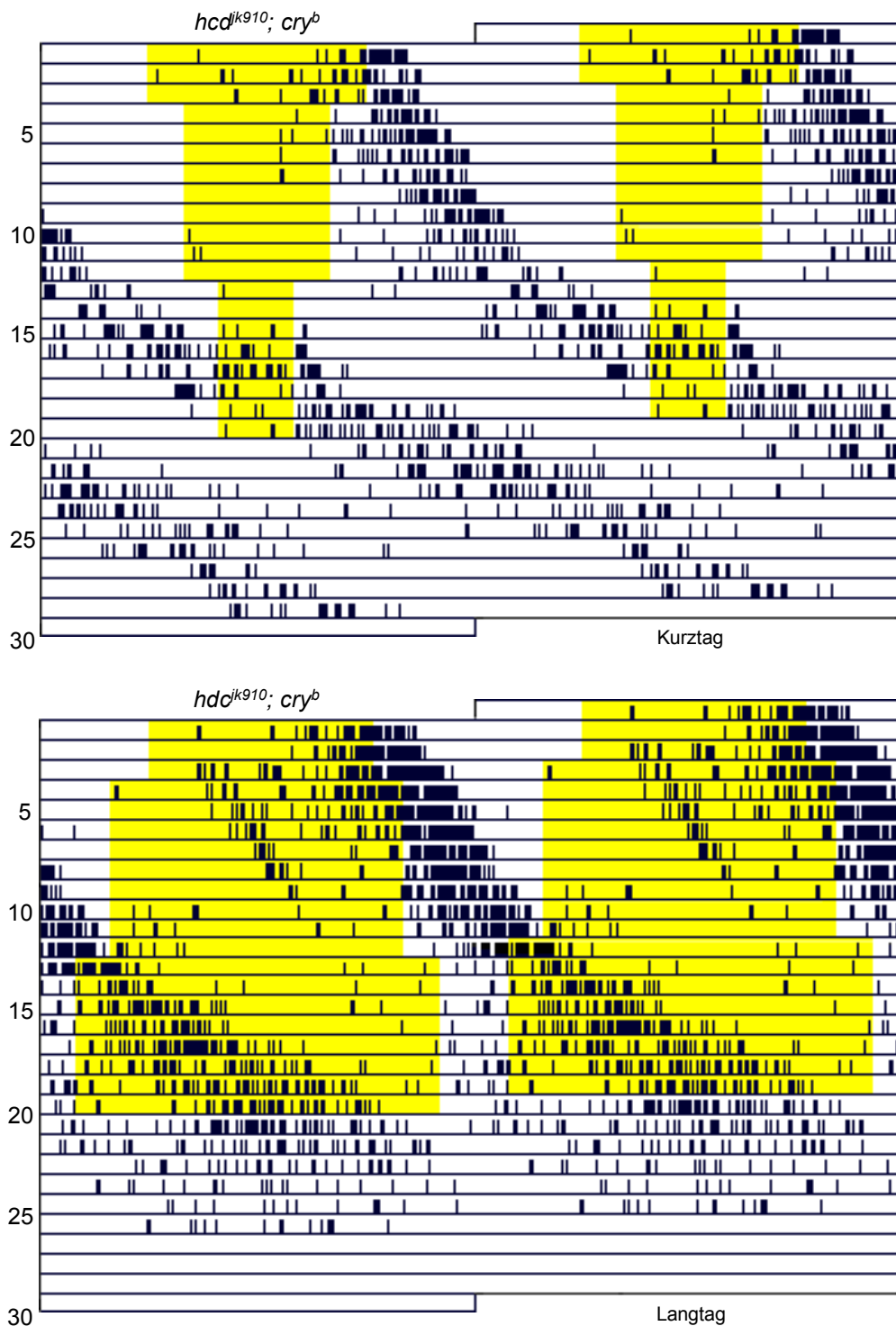


Abbildung 19: Repräsentative Aktogramme von $hdc^{ik910}; cry^b$ Fliegen im Kurztag und Langtag bei unterschiedlichen Photoperioden und sich anschließendem DD. Diese Linie besitzt außer dem unbekannten Photopigment in den DN keine photorezeptiven Organe, die noch Lichtinformation weitergeben können. Wie man sieht, befinden sich die Tiere von Anfang an im Freilauf. Sie sind bei keiner der verschiedenen Tageslängen zur Mitnahme fähig.

Zur Übersicht über das Verhalten aller untersuchten Mutanten im Kurz- und Langtag gibt Tabelle 3 und Abbildung 20 die Prozentsätze der synchronisierten Fliegen bei den verschiedenen Tageslängen wieder. Man kann sehen, dass die Anzahl der synchronisierten Fliegen deutlich zurückgeht, je mehr der verschiedenen Photorezeptoren und Photopigmente fehlen. Die Unfähigkeit zu synchronisieren wirkt sich besonders im Lang- und Kurztag aus. Im LD12:12 sind selbst in der am stärksten betroffenen Mutante (*hdc^{JK910}; cry^b*) noch einige Tiere zur Mitnahme fähig.

Tabelle 3: Prozentsatz der synchronisierten Fliegen zu den unterschiedlichen Tageslängen.

	LD04:20	LD08:16	LD12:12	LD16:08	LD20:04
<i>Canton-S</i>	90 % (21)	100 % (25)	100 % (59)	100 % (34)	97,1 % (24)
<i>y w</i>	87,5 % (24)	100 % (25)	100 % (51)	100 % (25)	94,4 % (18)
<i>cry^b</i>	63,3 % (30)	100 % (33)	100 % (59)	100 % (26)	94 % (16)
<i>cli^{eya}</i>	63.6 % (22)	96.2 % (26)	100 % (64)	81.6 % (38)	27.6 % (29)
<i>so¹</i>	34.5 % (29)	75.8 % (33)	100 % (55)	77.3 % (22)	0 % (13)
<i>hdc^{JK910}</i>	26.1 % (23)	76.0 % (25)	97.9 % (48)	56.5 % (23)	0 % (18)
<i>so¹; gl^{60j}</i>	33.3 % (33)	81.5 % (38)	100 % (59)	61.9 % (21)	0 % (14)
<i>Rh5/ttx, cry^b</i>	27% (33)	83% (42)	100% (91)	100% (49)	61% (44)
<i>cli^{eya}; cry^b</i>	0 % (19)	11.0 % (26)	51.7 % (59)	36.4 % (33)	0 % (30)
<i>so¹; cry^b</i>	0 % (21)	7.7 % (26)	39.2 % (51)	12 % (25)	0 % (21)
<i>hdc^{JK910}; cry^b</i>	0 % (15)	0 % (24)	13.6 % (44)	0 % (20)	0 % (15)

Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der getesteten Fliegen zum jeweiligen LD an.

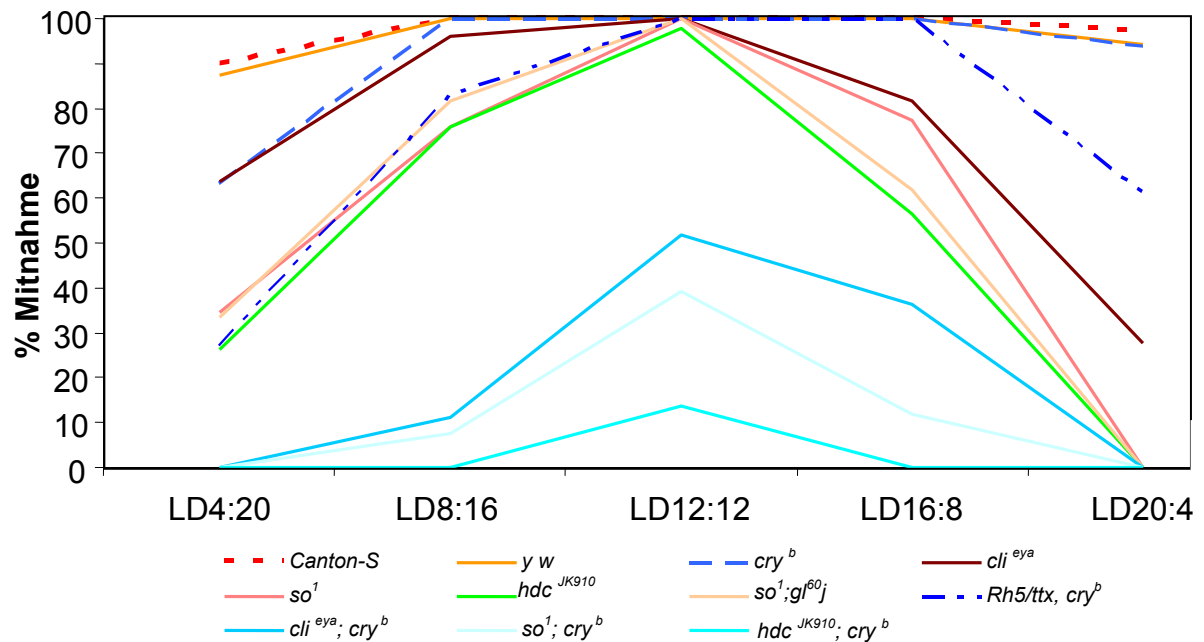


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Mitnahme der getesteten Fliegenstämme in Prozent. Deutlich ist die verminderte Fähigkeit zur Mitnahme bei den Doppelmutanten zu sehen. Ansonsten sind für die Mitnahme besonders die extremen Kurz- und Langtage ein Problem.

Zum Vergleich der durchschnittlichen Aktivitätsprofile aller synchronisierten Fliegen bei den unterschiedlichen Mutanten gibt Abbildung 21 diese als Übersicht wieder. Man kann auf einen Blick sehen, dass sich die Aktivitätsprofile von Mutanten ohne funktionierende Komplexaugen deutlich von Wildtypfliegen und *cry^b* Mutanten unterscheiden. Bei den „augenlosen“ Fliegen fehlen die normalen Maskierungseffekte des Lichts, d.h. es gibt keinen Licht-an Effekt und die Aktivität wird nicht durch Dunkelheit gehemmt. Die *cry^b* Mutanten scheinen dagegen eine etwas stärker ausgeprägte Maskierung zu haben. Besonders der Licht-an Effekt ist sehr deutlich, während der endogene Morgenpeak eher schwach ausgeprägt ist. Interessanterweise tritt bei einigen der „augenlosen“ Fliegen, denen noch zusätzliche Photorezeptoren fehlen (z.B. funktionelle H-B Äuglein, Ocellen und Cryptochrom), paradoxe Maskierung auf, d.h. die Aktivität wird bei Ausschalten des Lichts erhöht.

Neben der Maskierung gibt es einen weiteren deutlichen Effekt, der durch die Komplexaugen hervorgerufen wird. Während Wildtypfliegen und *cry^b* Mutanten die Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak mit zunehmender Tageslänge deutlich vergrößern, tun dies die augenlosen Fliegen nicht.

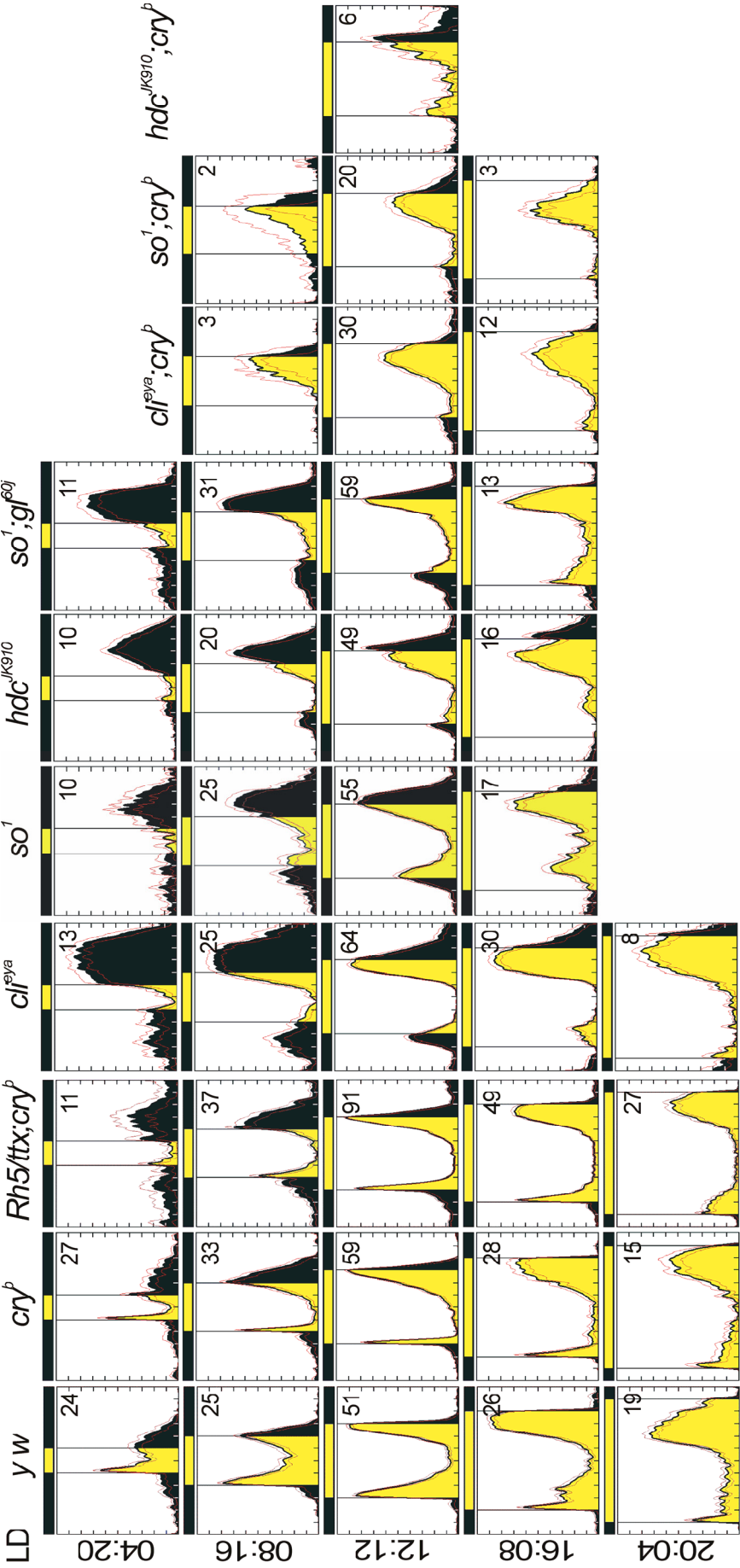


Abb. 21. Durchschnittliche Aktivitätsprofile aller untersuchter Fliegenlinien. Erläuterungen siehe Text

3.3 Diskussion 1

3.3.1 Die Mitnahme

Meine Versuche ergeben, dass alle unterschiedlichen Photorezeptoren und Photopigmente zur Mitnahme der Fliegen beitragen, dass sie sich jedoch in ihrem Beitrag hinsichtlich der Mitnahme in Kurz- oder Langtagen unterscheiden. Die wichtigsten photorezeptiven Strukturen für die Mitnahme in extremen Kurz- oder Langtagen (besonders aber in Langtagen) sind die Komplexaugen. Cryptochrom wiederum vermittelt bevorzugt die Mitnahme an Kurztagen. Vor allem die H-B Äuglein aber auch die Ocellen tragen zur Mitnahme unter Kurztags- und Langtagsbedingungen bei. Die Rolle des unbekannten Photopigments in den DN ist weiterhin schwer abzuschätzen. Mit diesem Photopigment als einzigem Photorezeptor erscheint die Mitnahme weitaus weniger effektiv als bei anderen Kombinationen.

Die Ansicht, dass die Komplexaugen wichtig für die Synchronisation unter Kurz- und Langtagen sind, wohingegen Cryptochrom bevorzugt für die Mitnahme unter Kurztagen verantwortlich ist, fußt auf folgender Beobachtung: Mutationen, die die Funktion der Komplexaugen eliminieren (*cl^{eya}*, *so¹* Mutante), konnten sich nur schwer an extrem lange Tage anpassen und zeigten eine reduzierte Mitnahme an extremen Kurztagen. Im Gegensatz dazu hatte die *cryptochrom^{baby}* Mutante hauptsächlich Schwierigkeiten, sich an extreme Kurztage anzupassen. Mutanten, denen sowohl die Komplexaugen als auch Cryptochrom fehlten (*cl^{eya}*; *cry^b*, *so¹*; *cry^b* Mutanten), konnten weder zu extrem kurzen noch zu extrem langen Photoperioden synchronisieren.

Die reduzierte Fähigkeit der *cry^b* Mutante zur Mitnahme bei kurzen Photoperioden steht in Übereinstimmung mit ihrer Unfähigkeit auf kurze Lichtpulse zu reagieren (Emery et al., 1998). Im Kontrast dazu steht die fast vollständige Unfähigkeit zur Mitnahme augenloser Fliegen an extrem langen Tagen, oder präziser, die Unfähigkeit der Unterscheidung zwischen extrem langen Photoperioden mit sehr kurzen Dunkelperioden und Dauerlicht (LL). Konstantes Licht ist dafür bekannt, die Periodenlänge der Inneren Uhr zu verlängern und schließlich zu arrhythmischem Verhalten zu führen (Konopka et

al., 1989). Dies ist exakt das, was wir bei den Fliegen ohne funktionierende Komplexaugen im extremen Langtag beobachten konnten. Sie zeigten eine Verlängerung der Periode und eine höhere Anzahl an arrhythmischen Fliegen, so als würden sie den Langtag als konstantes Licht wahrnehmen, ohne die 4 Stunden Dunkelheit zu erkennen. Dieses Verhalten war besonders offensichtlich, wenn die Mutationen die Ocellen (so^1) oder die Ocellen und das H-B Äuglein ($hdc^{JK910}, so^1; gl^{60J}$) zusätzlich zu den Komplexaugen betrafen, was darauf hinweist, dass alle diese Photorezeptoren zur Unterscheidung zwischen Licht und Dunkelheit beitragen. Die Periodenverlängerung und das arrhythmische Verhalten unter LD20:4 war abhängig vom Vorhandensein von Cryptochrom. Keine der getesteten Mutanten ohne funktionsfähiges Cryptochrom zeigte dieses Verhalten. Dieses stimmt mit älteren Ergebnissen überein: cry^b Mutanten zeigen nur eine leichte Periodenverlängerung unter Dauerlichtbedingungen (LL) (Helfrich-Förster et al., 2001) und werden nicht arrhythmisch (Emery et al., 2000b).

Dass sich die Rollen der Komplexaugen und des Cryptochroms in der circadianen Photorezeption ergänzend verhalten, wird durch die folgende Beobachtung noch hervorgehoben: Nach einer Phasenverschiebung des LD Zyklus von 8 Stunden hängt die neue Anpassung des Morgenmaximums hauptsächlich von den Komplexaugen ab, wohingegen die Anpassung des Abendmaximums hauptsächlich vom Vorhandensein von Cryptochrom abhängt (Emery et al., 2000a; Helfrich-Förster et al., 2001).

Meine Ergebnisse machen es notwendig, die bisherigen Beobachtungen neu zu interpretieren. Bisher unterschied man nicht zwischen dem Licht-an Maximum (Maskierung) und dem endogenen Morgenmaximum (circadian). Die cry^b Mutante zeigt einen sehr starken Licht-an Effekt. Daher sind möglicherweise Unterschiede in der Resynchronisation der Morgenaktivität Ausdruck dieses starken Licht-an Maximums, das sofort verschoben wurde und so das endogene Morgenmaximum maskierte. Wir können also nicht mit Sicherheit sagen, wie lange das endogene Morgenmaximum für seine Resynchronisation benötigte. In den Mutanten ohne funktionierende Komplexaugen (gl^{60J}) fehlte das Licht-an Maximum, so dass nur das Morgenmaximum die morgendliche Aktivität darstellte (Helfrich-Förster et al., 2001). Hier passte sich das

Morgenmaximum nur langsam an die acht Stunden Verschiebung an, was zu meiner Annahme führt, dass die Komplexaugen normalerweise für die Resynchronisation des Morgenmaximums zuständig sind. Diese Annahme mag weiterhin gültig sein, aber die Dauer der Resynchronisation des Morgenmaximums in der *cry^b* Mutante sollte nochmals ermittelt werden. Auch auf das Abendmaximum gibt es einen klar zu unterscheidenden Effekt von den Komplexaugen und Cryptochrom. Das Abendmaximum verschiebt sich in Wildtyp-Fliegen relativ schnell und benötigt nur in *cry^b* Mutanten mehr Zeit. Daher kann gesagt werden, dass frühere Interpretationen des Abendmaximums gültig bleiben. Die Ocellen und das H-B Äuglein sind weniger wichtig für die Mitnahme als die Komplexaugen und Cryptochrom, aber sie tragen deutlich zur Mitnahme unter Kurztags- und Langtagsbedingungen bei. Für die Ocellen fußt diese Schlussfolgerung auf dem Vergleich von *cll^{eya}* und *so¹* Mutanten. In *so¹* Mutanten, welchen die Ocellen und die Komplexaugen fehlen, konnten signifikant weniger Fliegen auf Kurz- und Langtage synchronisieren als bei der *cll^{eya}* Mutante (Tab.3). Solch eine reduzierte Fähigkeit zur Mitnahme war ebenso in der *so¹; cry^b* Mutante zu finden, wenn man sie mit der *cll^{eya}; cry^b* Mutante verglich. Im Unterschied zum H-B Äuglein haben die Ocellen keinen direkten Kontakt zu den Schrittmacherneuronen, jedoch sind indirekte Kontakte zwischen den Fasern der Schrittmacherneurone und der sekundären Interneurone der ocellären Photorezeptoren im dorsalen Protocerebrum denkbar. Das dorsale Protocerebrum ist eine wichtige Schaltstation, in der circadiane Information an nachgeschaltete Neurone weitergegeben wird. Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Ocellen an der circadianen Photorezeption in *Drosophila* beteiligt sind. Leider steht bisher noch keine Mutante zur Verfügung, die lediglich die Ocellen funktionsfähig lässt, aber sämtliche andere Photorezeptoren ausschaltet. Diese Fliegen würden uns die Möglichkeit geben, zu erforschen, ob schon alleine die Ocellen fähig sind, den Aktivitätsrhythmus der Fliegen zu synchronisieren.

Um den Beitrag der H-B Äuglein zur circadianen Mitnahme zu testen, verglich ich *so¹; cry^b* und *hdc^{JK910}; cry^b* Mutanten. *so¹; cry^b* Mutanten besitzen H-B Äuglein und das unbekannte Photopigment in den DN, wohingegen *hdc^{JK910}; cry^b* Mutanten nur noch das unbekannte Photopigment zur Synchronisation

besitzen. Ich fand eine signifikante Reduzierung in dem Prozentsatz synchronisierter Fliegen bei den *hdc^{JK910}; cry^b* Mutanten im Vergleich zu den *so¹; cry^b* Mutanten. Dies weist auf die Rolle der H-B Äuglein hin. Weiter zeigte die Untersuchung der F₁ Generation aus der *Rh5-Gal4; UAS-ttx* Kreuzung, dass die H-B Äuglein zur Mitnahme bei Kurztagen einen wichtigen Beitrag leisten. Eine Rolle der H-B Äuglein wurde auch bei einer früheren Studie gefunden (Helfrich-Förster et al., 2002). Diese zeigte, dass die H-B Äuglein für einen schmalen Sensitivitätspeak im Aktionsspektrum verantwortlich sind. In dieser Studie wurde allerdings die Mutante *so¹; gl^{60j}* untersucht, der zusätzlich zu den H-B Äuglein eine Untergruppe der DN1 - die DN_{1p} - fehlen. Daher war es unklar, ob der Sensitivitätspeak im Aktionsspektrum von den DN_{1p} oder dem H-B Äuglein stammt. Meine Untersuchungen zeigen eindeutig, dass die H-B Äuglein zur Mitnahme beitragen.

Die DN bestehen aus drei neuronalen Gruppen: den DN_{1a/p}, den DN₂ und den DN₃ (Kaneko and Hall, 2000, Shafer et al., 2006). Die DN₁ beinhalten etwa 15 Neurone mit einem heterogenen Verzweigungsmuster. 2 Neurone davon sind den DN_{1a} zuzuordnen, und neue Untersuchungen zeigen, dass sie Fasern bis in die akzessorische Medulla senden (Shafer et al., 2006). Die DN₂ bestehen lediglich aus zwei Neuronen, die bereits in der Larve angelegt sind und dort einen Teil der Inneren Uhr bilden. Die DN₃ sind die größte Gruppe bestehend aus 30 bis 40 Neuronen mit recht kleinem Soma. Die 3 DN Gruppen sind in allen untersuchten Mutanten außer in der *gl^{60j}* Mutation vorhanden. Den *gl^{60j}* Mutanten fehlen die adulten DN_{1p}, sie haben lediglich die 2 bereits im Larvenstadium angelegten DN_{1a} (Helfrich-Förster et al., 2001; Helfrich-Förster, 2003; Shafer et al., 2006). Das unbekannte Photopigment, das möglicherweise in den DN₃ vorhanden ist, scheint lediglich schwach zur Mitnahme beizutragen. Nur 14% der Fliegen, die nur das unbekannte Photopigment in den DN haben (*hdc^{JK910}; cry^b* Mutante), konnten zum LD12:12 synchronisieren, und keine der Fliegen war zu einer anderen Tageslänge zur Mitnahme fähig. Manche dieser Fliegen zeigten relative Koordination. Dies ist ein Phänomen, das Tiere zeigen, die ihre Grenze der Mitnahme erreicht haben (Moore-Ede et al., 1982). Relative Koordination ist ein Anzeichen dafür, dass die Fliegen versuchen, ihre endogene Periode an einen 24 Stunden Zyklus anzupassen und dieses auch

zeitweise schaffen, dann aber immer wieder ausbrechen. Dass auch die Fliegen, die nicht synchronisiert wurden, das Licht wahrnahmen, kann man daran sehen, dass ihre Periodenlänge von der Tageslänge moduliert wurde. Bei moderaten Tageslängen war sie näher bei 24 Stunden als bei extremen Tageslängen. Ihre Lichtsensitivität beruht vermutlich tatsächlich auf den DN und deren unbekanntem Photopigment.

3.3.2 Änderung der Periode der Inneren Uhr

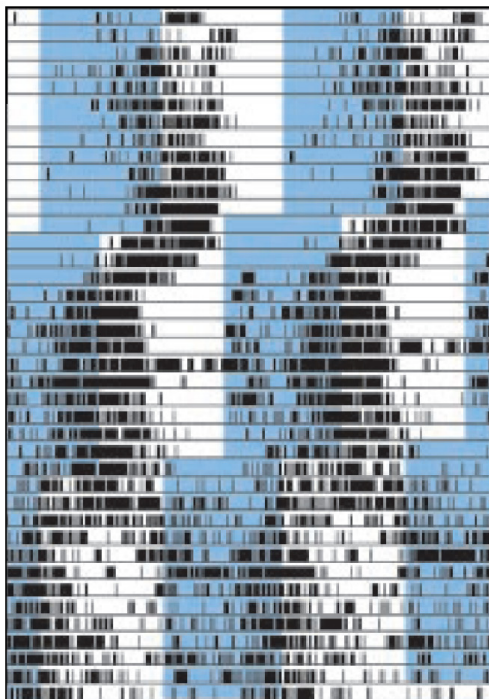
Bei den Kontrolltieren war die Freilaufperiode im DD stark von der Tageslänge beeinflusst, der die Tiere vor ihrem Übergang in DD ausgesetzt waren. Ihre Freilaufperiode war nach Langtagen signifikant länger und nach Kurztagen kürzer. Dies zeigt, dass die Lichtbedingungen die Geschwindigkeit der Inneren Uhr zumindest übergangsweise verändert haben. Solche Effekte der Umgebungsbedingungen auf die Innere Uhr sind als „aftereffects“ (Nacheffekte) bekannt (Pittendrigh and Daan, 1976; Moore-Ede et al., 1982). Interessanterweise sind Cryptochrom und das H-B Äuglein für diese Nachwirkungen notwendig: keine der Fliegen, welche die Mutation des *cry^b* Gens trug, zeigte solche Nachwirkung auf die Periode, und auch die Mutationen, die die Funktion des Äugleins eliminierten wie zum Beispiel *hdc^{JK910}* und *so¹; gl^{60j}*, zeigten keine „aftereffects“.

Die Auswertung der Aktivitätsrhythmik der Doppelmutante *cll^{eya}; cry^b* in Dauerlicht (LL) zeigt, dass die wenigen noch ausgebildeten Anlagen der H-B Äuglein nicht ausreichen, um eine signifikante Periodenverlängerung im Dauerlicht zu erreichen. Immerhin hat sich bei der Auswertung der Daten eine Tendenz zur Periodenverlängerung gezeigt, allerdings nur bei den Tieren, die wenigstens ein normales in die akzessorische Medulla projizierendes H-B Äuglein haben (siehe Tabelle 2). Die mittleren Periodenlängen der Tiere mit irregulär projizierenden oder ohne jegliches H-B Äuglein liegen dicht beisammen. Interessanterweise liegt die mittlere Periodenlänge im LL mit $23,73 \pm 0,05$ dicht bei dem Ergebnis, das wir bereits in einem anderen Experiment für eine Dauerlichtstärke von $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ermittelt haben (Rieger et al., 2006). In diesem Experiment fanden wir bei *cll^{eya}; cry^b* eine mittlere Periodenlänge von

$23,8 \pm 0,08$ in LL. Es ist anzunehmen, dass sich auch in diesem Experiment die mittlere Periodenlänge aus den Perioden von Fliegen mit unterschiedlich ausgebildeten H-B Äuglein zusammensetzt. Insgesamt bleibt die mittlere Periode in Dauerlicht (LL) zu Beleuchtungsstärken von $100\mu\text{W}/\text{cm}^2$ und $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ erstaunlich stabil.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die H-B Äuglein zur Periodenverlängerung der Aktivitätsrhythmik beitragen, wurde in der Arbeit von Helfrich-Förster et al. (2002) gefunden. Hier wurden *so*¹ Fliegen zweimal einer Phasenvorverschiebung von 6 Stunden ausgesetzt. Die *so*¹ Mutante besitzt keine Komplexaugen und keine Ocellen, aber die H-B Äuglein und das für die Mitnahme wichtige Blaulichtphotopigment Cryptochrom. Die Verschiebung wurde allerdings nicht bei Weißlicht durchgeführt, sondern einmal bei einer Wellenlänge von 420 nm und in einem weiteren Experiment bei 486 nm. Bei der Phasenverschiebung unter der Wellenlänge von 420 nm folgten die Tiere mit einer geringen Verzögerung dem neuen LD Regime, und zwar in der Richtung wie der LD verschoben wurde (Abb. 22).

so Mutanten bei einer Phasenverschiebung um 6 Stunden



bei 420nm



bei 486nm

Abbildung 22: Phasenverschiebung der *so* Mutante um 6 Stunden. Die Verschiebung wurde bei den Wellenlängen 420nm und 486nm vorgenommen. Aus Helfrich-Förster (2002).

Bei der Phasenverschiebung zur Wellenlänge von 486 nm passten sich die Fliegen ebenfalls dem neuen LD Regime an, allerdings diesmal von der der Verschiebung entgegengesetzten Richtung (siehe Abb. 22). Interessanterweise besitzt das H-B Äuglein seine maximale Empfindlichkeit bei 486nm. Man kann also annehmen, dass die H-B Äuglein für die neue Anpassung an den LD verantwortlich sind, da gerade sie die Fliege zu einer Periodenverlängerung befähigen.

3.3.3 Phasenanpassung

Tiere passen ihre Aktivitätsdauer an die Tageslänge an, sie zeigen ein enges Aktivitätsband unter Kurztagen und ein breites Aktivitätsband unter Langtagen (Aschoff, 1969). Dementsprechend zeigten Wildtypfliegen an Kurztagen eine engere Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendmaximum als ein Langtagen. Folglich hängt die Länge der Pause (=Mittagspause) zwischen dem Morgenmaximum und dem Abendmaximum von der Tageslänge ab. Dies könnte unter natürlichen Bedingungen eine nützliche Anpassung für die Fliegen sein, um sich an langen Sommertagen vor der Mittagshitze zu schützen. Majercak et al. (1999) fanden eine ähnliche Veränderung der Phasenbeziehung, als sie die Auswirkungen von Temperatur auf die Phase von Morgen- und Abendmaximum untersuchten. Im LD12:12 trat bei ansteigender Temperatur die Morgenaktivität früher und die Abendaktivität später auf. In unseren Experimenten war die Phasenanpassung an die Photoperiode (Veränderung der Phasenbeziehung von Morgenmaximum zu Abendmaximum) in der *cry^b* Mutante nahezu normal. In den Mutanten ohne funktionsfähige Komplexaugen gab es eine solche Phasenanpassung nicht. Diese Fliegen zeigten keine systematische Vergrößerung der Phasenbeziehung zwischen Morgenmaxima und Abendmaxima bei einer ansteigenden Tageslänge, was zeigt, dass die Komplexaugen die Anpassung an unterschiedliche Tageslängen vermitteln. Trotz allem erfolgte die Phasenanpassung selbst in Wildtypfliegen nur innerhalb bestimmter Grenzen: an extremen Kurztagen erschien das Morgenmaximum vor Licht-an und das Abendmaximum nach Licht-aus. Als Konsequenz wurden die Tiere unter diesen Bedingungen scheinbar nachtaktiv.

Wenngleich es sich hierbei um künstliche Bedingungen handelt, wie sie in der Natur nicht auftreten werden, zeigt dies eindeutig, dass Morgen- und Abendmaximum eine flexible Phasenbeziehung zueinander haben, die aber nicht unter eine bestimmte Grenze komprimiert werden kann. Bei Ratten ist die Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendmaximum noch stabiler. Sie konnte lediglich temporär verändert werden, wenn die Tiere unterschiedlichen Tageslängen ausgesetzt wurden (Siebert and Wollnik, 1993).

3.3.4 Maskierung

Ein Ziel meiner Untersuchung war, zwischen Maskierung und Mitnahme zu unterscheiden und den für die Maskierung maßgeblichen Photorezeptor zu finden. Ich fand zwei unterschiedliche Maskierungseffekte: normale und paradoxe Maskierung. Normale Maskierung zeigt sich durch einen raschen Anstieg der Aktivität nach Licht-an, das Licht-an Maximum, und durch eine Unterdrückung der Aktivität nach Licht-aus. Im LD12:12 überschneidet sich das Licht-an Maximum mit dem circadianen Morgenmaximum. Bei kurzen oder langen Photoperioden aber können diese Aktivitätsmaxima voneinander getrennt werden. Ich habe herausgefunden, dass das Licht-an Maximum ausschließlich durch die Komplexaugen vermittelt wird. Die augenlosen Mutanten *so*¹ und *cll*^{eya} besitzen kein Licht-an Maximum, aber sehr wohl ein Morgenmaximum. Der Maskierungseffekt wird nicht durch Cryptochrom induziert, da die *cry*^b Mutante ein ausgeprägtes Licht-an Maximum hat. Das Licht-an Maximum ist auch nicht abhängig von den Ocellen, da es in der Mutante *cll*^{eya} nicht zu finden ist, die zwar keine Komplexaugen hat, jedoch noch funktionstüchtige Ocellen besitzt. Auch tragen die H-B Äuglein nicht zu Maskierungseffekten bei, da die Äuglein sowohl in der Mutante *cll*^{eya} als auch in der Mutante *so*¹ noch vorhanden sind, und ich hier keine Maskierungseffekte feststellen konnte.

Paradoxe Maskierung zeigt sich in einem Anstieg der Aktivität nach Licht-aus. Im Unterschied zur normalen Maskierung ist die paradoxe Maskierung nicht abhängig von funktionierenden Komplexaugen, sondern tritt bei Mutanten auf, denen die unterschiedlichsten Photorezeptoren fehlen, einschließlich der

Komplexaugen. Dieses zeigt, dass sich der sensorische Apparat und der Mechanismus für die normale und die paradoxe Maskierung voneinander unterscheiden. Eine Schlussfolgerung, die bereits für nachtaktive Nager gezogen wurde (Mrosovsky et al, 1999). In Wildtyp Mäusen erscheint normale Maskierung (Unterdrückung der Aktivität durch Licht) als Reaktion auf helles Licht, paradoxe Maskierung hingegen (Aktivierung durch Licht) zeigt sich als Reaktion auf schwaches Licht. Die paradoxe Maskierung verschwindet bei Mäusen mit einer retinalen Degeneration (*rd/rd* Mäuse), im Gegensatz dazu ist in diesen Mäusen die normale Maskierung nicht beeinträchtigt oder sogar noch verstärkt (Mrosovsky et al, 1999; Mrosovsky, 2003a; Redlin et al., 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Prozesse an der normalen und der paradoxen Maskierung beteiligt sind, und sie decken weitere bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen Maus und Fliege auf. In beiden Tiergruppen sind die klassischen Photorezeptoren der Augen für die Aktivierung durch Licht verantwortlich. In der nachtaktiven Maus vermitteln die klassischen Photorezeptoren die paradoxe Maskierung (=Anstieg der Aktivität), währenddessen sie in der tagaktiven Fliege die normale Maskierung vermitteln und damit ebenfalls einen Anstieg der Aktivität.

Interessanterweise kann die normale Maskierung in Mäusen nach einer Läsion des visuellen Kortex, dem Hauptprojektionsort des visuellen Systems, auf paradoxe Maskierung umschalten (Redlin et al., 2003). In *Dmalpha1U* Fliegen wurde ebenfalls die normale Maskierung durch paradoxe Maskierung ersetzt (Nash et al., 2002). Das *Dmalpha1U* Gen codiert für Ionenkanäle und ist sehr stark im optischen Lobus und dem Zentralkomplex, einem höheren Koordinationszentrum des Gehirns, exprimiert. Ich konnte hier zeigen, dass Fliegen mit einem schweren Mangel an visueller Innervierung zu paradoxer Maskierung umschalten. Einige dieser Mutanten zeigen einen substantiellen Mangel an Interneuronen zweiter und dritter Ordnung im optischen Lobus, da diese durch die fehlende Innervierung degenerieren (Fischbach and Technau, 1984), mir ist allerdings nicht bekannt, ob sich dieser Mangel auch im Zentralkomplex fortsetzt. Die stärkste paradoxe Maskierung wurde in *gl^{60j}; cry^b* Mutanten gefunden, die den schwersten visuellen Defekt aufweisen (Helfrich-Förster et al., 2001). Diese Mutante besitzt lediglich die mit dem unbekannten

Photopigment ausgerüsteten DN₃, und ihr fehlen zahlreiche Neurone im optischen Lobus wie auch im dorsalen Gehirn, was auch die DN_{1p} beinhaltet (Helfrich-Förster et al., 2001). Im Vergleich mit der *gl^{60j}; cry^b* Mutante zeigte die biochemische Doppelmutante *hdc^{JK910}; cry^b* weniger paradoxe Maskierung. Die Einzelmutation *hdc^{JK910}* zeigte jedoch zumindest unter LD12:12 und LD16:8 starke paradoxe Maskierung. Offensichtlich ist die paradoxe Maskierung von noch unbekannten, unterschiedlichsten miteinander interagierenden Faktoren abhängig.

3.3.5 Die *cryptochrom^{baby}* Mutante und der genetische Marker *spineless (ss¹)*

Abschließend möchte ich noch einige kritische Bemerkungen zu der von mir verwendeten *cry^b* Mutante machen.

Eine deutliche Auswirkung, die die Mutation des Gens *cryptochrom* bei der *cry^b* Mutante hat, ist die Unfähigkeit der Tiere, bei der Gabe kurzer Lichtpulse (<15 min) mit einer Phasenverschiebung der Aktivitätsrhythmik zu reagieren. Im Weiteren führt die Gabe von Dauerlicht (LL) nicht zu arrhythmischem Verhalten der Tiere. Dies liegt in der Funktion des Cryptochroms als circadianem Photorezeptor begründet. In Wildtyp Fliegen interagiert Cryptochrom, sobald es durch Licht angeregt wurde, mit dem Timeless Protein, einem wichtigen Baustein der negativen Rückkopplungsschleife, die die Innere Uhr der Schrittmacherneurone bildet. Die Interaktion von angeregtem Cryptochrom mit dem TIM Protein führt zu dessen Ubiquitinierung und in Folge zum Abbau von TIM. TIM wird also während der Beleuchtung der Fliege permanent aus dem System der Rückkopplungsschleife entfernt (Abb.41). Der Abbau von TIM führt zum Rückstellen der Inneren Uhr und ermöglicht ihr dadurch, sich, innerhalb ihrer Grenzen, an ein neues Lichtregime anzupassen. Beim Wildtyp reichen hierfür schon die oben beschriebenen kurzen Lichtpulse aus. Bei einer Gabe von Dauerlicht (LL) wird aber der von TIM abhängige Teil der negativen Rückkopplungsschleife dauernd gehemmt, dadurch wird die Innere Uhr angehalten. Der Stillstand der Inneren Uhr führt dann zu arrhythmischem Verhalten der Fliege.

Obwohl neue Untersuchungen zeigen, dass Cryptochrom zumindest in peripheren Uhren, wie etwa in den Photorezeptoren, weiterhin auch als Genrepressor funktioniert, der einen Einfluss auf die Expression der Uhrproteine CLOCK und CYCLE hat, fanden sich keine Belege für solch eine Funktion in den circadianen Schrittmachern selbst (Collins et al., 2006). Allerdings gibt es in der *cry^b* Mutante eine Komplikation, die direkt die Photorezeption betrifft. Aus Gründen der besseren Handhabung werden Mutationen, die keinen direkt visuell überprüfbaren Phänotyp ausbilden, mit deutlich sichtbaren genetischen Markern gekoppelt. Hierdurch kann man bei Kreuzungen unterschiedlicher Stämme immer kontrollieren, ob die Tochtergeneration noch die gewünschte Mutation trägt. Im Fall der *cry^b* Mutation wurde von Dr. Ralf Stanewsky der Marker *spineless* (*ss¹*) gewählt. Bei *spineless* handelt es sich um eine Spontanmutation, die bereits 1914 von C.B. Bridges gefunden wurde (Bridges and Morgan, 1923). Die Mutation *spineless* zeigt sich phänotypisch durch die Verkürzung spezifischer sensorischer Borsten, diese haben nun stets die gleiche Länge wie die restliche Behaarung der Fliege (Melnick, M.B., Noll, E., Perrimon, N. 1993). Durch dieses Merkmal lassen sich Fliegen recht leicht voneinander unterscheiden. Neuste Forschung am *spineless* Genotyp zeigen allerdings, dass das Gen nicht nur für die Entwicklung bestimmter Borsten bei *Drosophila melanogaster* benötigt wird (Wernet M. et al., 2006), sondern auch entscheidend das Expressionsmuster von Rhodopsinen der Rezeptorzellen 7 und 8 im Komplexauge der Fliege beeinflusst. Wernet und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch die *spineless* Mutation die Rezeptorzellen 7 (R7) nicht mehr wie im Wildtyp in den „Yellow“ Typ (70%) und den „Pale“ Typ (30%) transformiert werden, sondern dass sie sich nun zu etwa 95% in den „Pale“ Typ (pR7) ausbilden. Die pR7-Zelle exprimiert Rhodopsin 3 (Rh3), diese Zellen kommunizieren mit der darunter liegenden R8-Zelle und entscheiden darüber, welches Rhodopsin in diesen R8-Zellen exprimiert wird. Die pR7-Zelle induziert nun in der R8-Zelle die Expression von Rh5. In den R8-Zellen wird nun also Rhodopsin 5 produziert. Neben dem pR7-Typ gibt es den „Yellow“ Typ (yR7). Eine yR7-Zelle ist nicht zu einer interzellulären Kommunikation mit der darunterliegenden R8-Zelle

befähigt. Die unter einer yR7-Zelle liegenden R8-Zellen exprimiert daher Rhodopsin 6 (Rh6). Siehe Abbildung 23

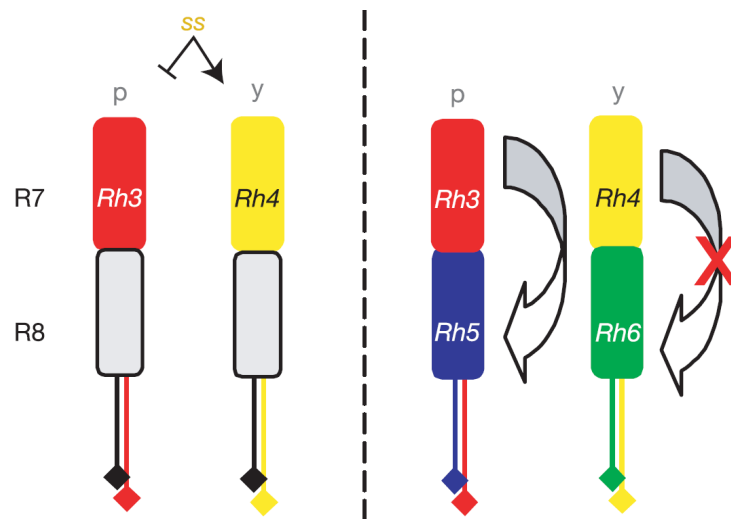


Abbildung 23: Beeinflussung der Genexpression der R7 und R8. Das Gen *spineless* führt in stochastischer Weise zur Ausbildung des pR7-Typs (30%) und des yR7-Typs (70%). Die pR7-Zellen können mit den R8-Zellen interzellulär kommunizieren und führen in diesen zur Aktivierung des Rhodopsin5-Promoters. Die yR7-Zellen können mit den unter ihnen liegenden R8-Zellen nicht kommunizieren, daher bleibt es in diesen von vorneherein bei der Aktivierung des Rhodopsin6 Promoters. Nach Wernet et al., 2006.

In meinen Experimenten verwendete ich unterschiedliche Stämme, die neben Mutationen, die hauptsächlich die Entwicklung der Komplexaugen (so^1 , cll^{eya}) oder deren Funktion (hdc^{jk910}) betrafen, auch die cry^b Mutation trugen. Diese Stämme beinhalten durch die genetische Markierung des cry^b durch ss^1 also auch die *spineless* Mutation mit all ihren Folgen für die Rezeptorentwicklung. In allen Fällen, in denen die Komplexaugen durch eine zusätzliche Mutation ganz fehlen (so^1 ; cry^b und cll^{eya} ; cry^b) oder durch den Mangel an Neurotransmitter (hdc^{jk910} ; cry^b) funktionslos sind, spielt die *spineless* Mutation aller Wahrscheinlichkeit nach keine Rolle. *spineless* betrifft meine Experimente aber zumindest in zwei Stämmen, nämlich in der cry^b Mutante selbst und in der Kreuzung der $Rh5-Gal4$; cry^b Linie mit der $UAS-ttx$; cry^b Linie. Für die cry^b Mutante kann man nach den oben beschriebenen Ergebnissen davon ausgehen, dass 95% der R8 Zellen der Mutante Rh5 anstatt von Rh6 exprimieren. Dies führt wahrscheinlich aber nur zu einer Verschiebung in der spektralen Empfindlichkeit der Komplexaugen, da Rh6 sein Maximum in der spektralen Empfindlichkeit bei 508 nm hat, Rh5 dagegen bei 437 nm (Mazzoni

et al., 2004). Man kann weiter höchstwahrscheinlich ausschließen, dass die anatomischen Verbindungen der R8 bei der *spineless* Mutation betroffen und dadurch verändert sind (Wernet et al., 2006). Da wir mit den Xenophot® Lampen ein breites kontinuierliches Lichtspektrum liefern können und innerhalb der Lichtphase selbst keine spektrale Verschiebung statt findet, sollten sich die genetisch bedingten Änderungen in der spektralen Empfindlichkeit wenig oder überhaupt nicht auswirken. Anderes gilt für die Abschaltung der synaptischen Transmission mittels Tetanustoxin im *cry^b* Hintergrund. Eigentlich sollte die Kreuzung der *Rh5-Gal4; cry^b* Linie mit der *UAS-ttx; cry^b* Linie die Funktion des H-B Äugleins unterbinden. Im H-B Äuglein ist der *Rh5*-Promotor aktiv. Hier lässt sich in der *Rh5-Gal4; cry^b* Linie der Transkriptionsfaktor Gal4 treiben. Die damit verbundene Aktivierung der UAS Sequenz führt zur Produktion von Tetanustoxin. Tetanustoxin unterbindet die Ausschüttung von Neurotransmitter in den synaptischen Spalt durch die proteolytische Zerstörung des für Verschmelzung der Transmittervesikel mit der präsynaptischen Membran notwendigen präsynaptischen Apparates. Die Produktion von Tetanustoxin findet nun wegen der genetischen Umprogrammierung durch das mutierte *spineless* Gen und der damit verbundenen Aktivierung des Rh5 Promotors ebenfalls in 95% der R8 statt. Die Problematik besteht nun darin, dass in der oben genannten Kreuzung die rund 1500 abgeschalteten R8 Zellen der beiden Komplexaugen den lediglich 8 abgeschalteten Rezeptorzellen der H-B Äuglein pro Tier gegenüber stehen. Aus der reinen Überzahl der umprogrammierten R8 heraus lassen sich die beobachteten Effekte auf die Synchronisation und Mitnahme bei extremen Photoperioden nicht mehr ausschließlich auf das H-B Äuglein dieser Tiere zurückführen. Als mögliche Ursache für die beobachteten Effekte kommen nunmehr auch die R8 Zellen mit dem aktiven Rh5 Promotor in Frage. Die Abschaltung der R8 Zellen in den Komplexaugen könnte also ebenso zu einer Verschlechterung der Mitnahme bei extremen Photoperioden führen. Einschränkend bleibt zu sagen, dass ich keine direkten Verbindungen der R8 zu den Verzweigungen der I-LN_v nachweisen konnte und daher die Abschaltung der R8-Zellen möglicherweise überhaupt keine Auswirkung auf die Mitnahme der Fliegen hat (siehe Teil 2 Funktion).

Im Gegensatz dazu aber ist eine funktionelle Verbindung des H-B Äugleins mit den lateralen Schrittmacherneuronen mehr als wahrscheinlich (Helfrich-Förster et al., 2006). Über den tatsächlichen Einfluss der *spineless* (*ss*¹) Mutation auf die Synchronisation von *Drosophila* können nur weitere Experimente mit dieser Mutante Aufschluss geben.

Zusammenfassend war ich in der Lage, die unterschiedlichen Auswirkungen des Lichts auf die Aktivitätsrhythmik den unterschiedlichen Photorezeptoren und Photopigmenten zuzuordnen. Dadurch konnte ich bei *Drosophila* bisher unbekannte Beiträge von Cryptochrom und Komplexaugen zur Synchronisation des Verhaltens aufdecken. Cryptochrom ist vorzugsweise wichtig für die Mitnahme bei kurzen Photoperioden, es vermittelt die Nachwirkungen des Lichts auf die Innere Uhr und ist für die Periodenverlängerungen bei Langtagen verantwortlich. Die Komplexaugen sind sowohl für die Mitnahme bei kurzen als auch langen Photoperioden wichtig, aber hier besonders für die Mitnahme an Langtagen. Im Weiteren sind sie verantwortlich für die Anpassung der Phasenlage an die Photoperiode und für die Unterscheidung zwischen Langtagen und Dauerlicht. Zusätzlich vermitteln die Komplexaugen die normalen Maskierungseffekte, die einen Aktivitätsanstieg nach Licht-an und eine Unterdrückung der Aktivität nach Licht-aus verursachen. Hierzu gibt es parallele Erscheinungen bei Säugern. Wie auch bei Fliegen tragen die retinalen Photorezeptoren der Mäuse zur Mitnahme und zur Maskierung bei (Mrosovsky, 2003b), wohingegen sie nicht für die von Dauerlicht hervorgerufenen Effekte verantwortlich sind (Periodenverlängerung) (Mrosovsky, 2003b) und auch nicht für die Phasenverschiebungen notwendig sind, die durch Lichtpulse hervorgerufen werden (Foster et al., 1991; Freedman et al., 1999). Letztere Funktion wird zumindest teilweise durch Melanopsin vermittelt, einem Photopigment, das in der Ganglienzellschicht der Retina enthalten ist (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002): Melanopsin „knockout“ Mäuse zeigen eine verminderte Periodenverlängerung unter Dauerlicht (Ruby et al., 2002). Andere Forschungsergebnisse belegen die Beteiligung von Cryptochrom in der Photorezeption von Säugetieren (Thresher et al., 1998; Selby et al., 2000; Thompson et al., 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die circadiane Photorezeption in Säugetieren eine ähnliche Komplexität aufweist

wie bei Fliegen und möglicherweise ähnliche Synchronisationsmechanismen vorhanden sind.

4 Teil 2: Funktion

Informationseingang aus dem photorezeptiven System in das circadiane System

4.1 Einleitung 2

4.1.1 Versuch des Nachweises einer funktionellen Verbindung der Komplexaugen mit den lateralen Schrittmacherneuronen

Durch die Arbeiten mit *Drosophila* unter Kurz- und Langtagsbedingungen konnte ich bereits zeigen, dass die Komplexaugen sowohl für direkte Reaktionen auf Licht (Licht-an Effekt und Maskierung) als auch für die Synchronisation der Inneren Uhr (Mitnahme) selbst verantwortlich sind. Bisher konnte noch keine direkte neuronale Verbindung der Komplexaugen zu den Schrittmacherneuronen der Inneren Uhr nachgewiesen werden. Als besonders naheliegende Strukturen für eine Verbindung zu den I-LN_v könnten die Rezeptorzellen 7 und 8 der Komplexaugen betrachtet werden. Diese Rezeptorzellen projizieren mit ihren Terminalen direkt in die Medulla und queren das dendritische Netzwerk der großen lateralen Neuronen auf der Oberfläche der Medulla (siehe Abb. 6). Dieses Netzwerk wird von Ausläufern der großen lateralen Neurone sowohl der ipsilateralen als auch der contralateralen Seite des Gehirns gebildet (Helfrich-Förster, 2007). Die Ausläufer bilden ein engmaschiges Netzwerk, dessen Verzweigungen synaptische Boutons tragen. Das Netzwerk wie auch die Buttons enthalten sehr viel PDF und sind daher stark anti-PDH immunreaktiv. Die Rezeptoren 7 und 8 lassen sich durch ihre unterschiedliche Eindringtiefe in die Medulla und ihre Morphologie sehr gut unterscheiden, die Rezeptorzellen 8 enden etwas mehr distal und tragen nicht die charakteristische Verdickung an ihrem Ende wie man sie bei den etwas weiter eindringenden Rezeptorzellen 7 beobachten kann (Pollack and Hofbauer, 1991). Um mögliche Überschneidungen der Rezeptorzellen 7 und 8 mit den dendritischen Verzweigungen der I-LN_v zu überprüfen, stellte ich immunhistologische Färbungen von Drosophilagehirnen her. Bei diesen ersten Doppelfärbungen, die ich mit dem Antikörper anti-PDH (Heiner Dirksen) und der Expression von GFP unter der Kontrolle des

Enhancers *gmr-Gal4* durchführte, konnte ich bereits sehen, dass weder die Terminalen der R7 noch der R8 direkt beim Netzwerk der lateralen Neuronen enden. Jedoch passieren die Axone von R7 und R8 das Netzwerk der Schrittmacherzellen. Deshalb könnten an den Überschneidungen synaptische Kontakte für die Weitergabe von Signalen zwischen den Rezeptorzellen 7 und 8 der Komplexaugen und den lateralen Neuronen bestehen. Synapsen könnten schließlich auch entlang der Terminalen ausgebildet werden. Um dies zu testen, nutzte ich eine Untersuchungsmethode mittels eines neuronalen Tracers, die von Tabuchi et al. (2000) als erfolgreich beschrieben wurde. Diese bedienten sich transgener Fliegen, welche hinter dem UAS Responder das Gen für das Pflanzenlectin Weizenkeimagglutinin (WGA) tragen. Das WGA Protein kann nun unter der Kontrolle einer *Gal4* Treiberlinie in unterschiedlichsten Zellen exprimiert werden. Bei einer synaptischen Übertragung und der daraus folgenden Abgabe von Transmittermolekülen in den synaptischen Spalt werden dann immer auch einige WGA-Moleküle abgegeben. Dieses WGA bindet an Oligosaccharide auf der postsynaptischen Membranoberfläche und wird dort durch Endocytose in die Postsynapse aufgenommen. Tabuchi et al. (2000) konnte in seiner Veröffentlichung zeigen, dass bei Expression von WGA (Weizenkeimagglutinin) in den Rezeptorzellen 1 bis 6 unter der Kontrolle von *Rh1-Gal4* dieses WGA auch in nachgeschalteten Interneuronen der Lamina nachgewiesen werden konnte. Zum Nachweis bediente er sich der Immunoelektronenmikroskopie.

Mein Ansatz war, dass ich WGA unter der Kontrolle von a) *pdf-Gal4* und b) *gmr-Gal4* in den Fliegen exprimierte und so untersuchen konnte, ob eine anterograde oder retrograde Weitergabe des WGA von den PDF Neuronen zu den Rezeptorzellen oder von den Rezeptorzellen zu den PDF Neuronen stattfindet. Zur Detektion des WGA diente die bei uns im Labor standardmäßig durchgeführte konfokale Laserscan Immunfluoreszenzmikroskopie.

4.1.2 Synapsin und Synaptobrevin als Marker für synaptische Endungen

Die Proteine Synapsin und Synaptobrevin sind beide mit dem synaptischen Apparat assoziiert und erfüllen dort unterschiedliche Funktionen (Abb. 24).

Synapsin kommt in unterschiedlichen Varianten vor. Bei *Drosophila* gibt es bis zu 5 Isoformen (Klagges et al.; 1996) und beim Säuger sind 4 Isoformen bekannt (Südhof et al.; 1989). Als Funktion von Synapsin wird beim Säuger die Verankerung der präsynaptischen Vesikel am Cytoskelett der Synapsen beschrieben. Die Depolarisation eines Neurons führt zu einer Phosphorylierung des Synapsinmoleküls. Dadurch wird der verankerte Vesikel vom Cytoskelett gelöst und steht für eine Ausschüttung an der Präsynapse zur Verfügung (Llinas et al., 1991; Benfenati et al., 1993). Für die genaue Funktion von Synapsin in *Drosophila* liegen noch keine detaillierten Untersuchungen vor, die Synapsin Null Mutante (*syn*⁹⁷) zeigt aber im Lernen, in der Ethanol Toleranz und in der Bewegungsfähigkeit Einschränkungen (Godenschwege et al., 2004). Synapsin Null Mutanten sind beim Säuger und bei *Drosophila* voll lebensfähig (Rosahl et al., 1993; 1995; Li et al., 1995; Godenschwege et al., 2004).

Da sowohl Synapsin als auch Synaptobrevin spezifisch für Synapsen sind, eignen sich beide als Marker für präsynaptische Terminalen. Für die Anfärbung von Synapsin gibt es einen Antikörper, für Synaptobrevin jedoch nicht. Bei beiden Molekülen besteht allerdings das Problem, dass sie in allen Neuronen zu finden sind. Dies erschwert die Identifizierung der präsynaptischen Endungen in den zu untersuchenden Zielneuronen (hier die Photorezeptorzellen). Deshalb muss die Synapsin bzw. Synaptobrevin-Markierung zunächst auf die entsprechenden Photorezeptorzellen beschränkt werden. Dies ist mit dem Gal4-UAS-System möglich.

Das Protein Synaptobrevin gehört zu einem komplexen Apparat, der die zur präsynaptischen Membran transportierten Transmittervesikel mit dieser verschmelzen lässt (Abb. 24). Diese Funktion ist grundlegend für die Abgabe von Transmittern in den synaptischen Spalt. Die hemmende Wirkung des Neurotoxins Tetanustoxin beruht auf der proteolytischen Zerstörung eben dieses Apparates. Durch die Zerstörung wird eine Freisetzung von Transmitter verhindert und eine Erregungsleitung

zwischen Neuronen unterbunden. Da das Tetanustoxinmolekül dabei selbst nicht zerstört oder verbraucht wird, wirken schon geringste Mengen verheerend auf die Transmitterfreisetzung. Synaptobrevin ist also ebenfalls ein weiteres Protein, das für die Markierung synaptischer Bereiche hervorragend geeignet sein sollte.

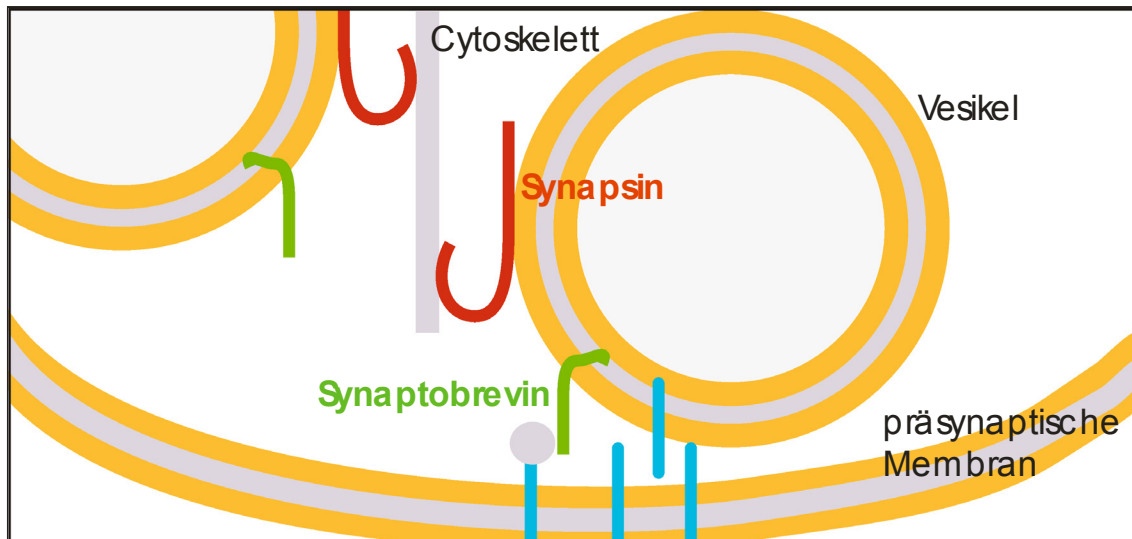


Abbildung 24: Synapse mit: Cytoskelett (grau), Synapsin (rot), Synaptobrevin (grün), Vesikel.

4.1.2 Synapsinexpression unter Kontrolle des *Rh5*-Gal4 Promotors

Die Expression von Synapsin und seine Anfärbung sind nötig, da man zwar den anatomischen Verlauf des H-B Äugleins auch mit der Expression von GFP darstellen kann, dies aber nichts über vorhandene synaptische Strukturen aussagt. Für die zielgerichtete Expression des Synapsinproteins stand uns ein UAS-Synapsin Stamm aus dem Labor von Dr. Erich Buchner (Würzburg) zur Verfügung (siehe Anhang). In diesem Stamm wurde hinter eine UAS Sequenz das Gen für Synapsin gekoppelt, der Stamm selbst exprimiert kein Synapsin, da er die Synapsin Null Mutation (*syn*⁹⁷) trägt. Um mit Synapsin im Weiteren sinnvoll arbeiten zu können, muss man erst für die zu untersuchenden Strukturen geeigneten Gal4 Linien in Synapsin Null Tiere (zum Beispiel *syn*⁹⁷) einkreuzen. Ich entschied mich für den *Rh5*-Gal4 Promotor, da dieser außer in den Rezeptorzellen 8 der Komplexaugen auch im H-B Äuglein transkribiert wird. Lediglich durch das Einkreuzen einer Gal4 Linie wird das Synapsin, im für diese Gal4 Linie spezifischen Expressionsmuster, produziert.

Für die Immunmarkierung stand mir ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, (Klagges et al., 1996) zur Verfügung.

4.1.4 Synaptobrevin-GFP Expression unter Kontrolle verschiedener Gal4-Promotoren

Ein weiteres Werkzeug für die Untersuchung synaptischer Verbindungen stellt das Konstrukt Synaptobrevin-GFP dar. Bei diesem Stamm wurde hinter die UAS Sequenz das Gen für das Protein Synaptobrevin und zusätzlich dazu noch das Gen für GFP gekoppelt. Bei einer *Gal4* gesteuerten Expression des Synaptobrevin Proteins wird gleichzeitig GFP exprimiert. Dabei werden beide Proteine auf eine Art und Weise gebildet, dass sie als voll funktionstüchtige Proteine miteinander gekoppelt bleiben. Durch diesen Kunstgriff kann das Protein Synaptobrevin ohne weitere Färbemethoden nachgewiesen werden. Synaptobrevin-GFP nimmt in der Zelle die gleiche Funktion wahr wie das wildtypische Protein (Abbildung 24). Durch die eigenständige Markierung des Synaptobrevin mit GFP ist man auch nicht gezwungen, in einem Synaptobrevin Null Hintergrund zu exprimieren. Da das GFP markierte Synaptobrevin mit dem wildtypischen Protein konkurriert, kann man davon ausgehen, dass besonders aktive synaptische Bereiche durch das Synaptobrevin-GFP deutlich markiert werden.

4.1.5 *In vitro* Nachweis von möglichen synaptischen Verbindungen zwischen Photorezeptoren und circadianen Schrittmacherneuronen

Neben den anatomischen Untersuchungen zur Lage der Photorezeptorendigungen der R7 und R8 als auch der Terminalen des H-B Äugleins wollte ich eine direkte funktionelle Verbindung dieser Rezeptoren mit den lateralen Neuronen des circadianen Systems zeigen. Die Experimente bauten auf der Annahme auf, dass falls die Rezeptoren wirklich mit den Schrittmachern verbunden wären, sie dann auf Histamin, dem einzigen bekannten Transmitter der Photorezeptoren bei adulten *Drosophila*, reagieren sollten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fliegen mit einer die

Histidindecaboxylase (*hdc*) betreffenden Mutation durch das hierdurch hervorgerufene Fehlen von Histamin blind sind (Pollak and Hofbauer, 1991; Melzig et al., 1996). Ihre Innere Uhr kann jedoch noch synchronisiert werden (siehe Teil 1 Verhalten). Doppelmutanten, bei denen zusätzlich noch Cryptochrom ausgeschaltet ist, sind auch „circadian“ blind, das heißt die Aktivitätsrhythmik adulter Tiere befindet sich in LD Zyklen bereits im Freilauf (Rieger et al., 2003). Für Larven ist dies nicht der Fall, da das Bolwigsche Organ, das Photorezeptororgan der Larven, Acetylcholin als Signaltransmitter benutzt (Wegener et al., 2004). Die Larven der *hdc*^{JK910} Mutante lassen sich also durch Licht noch ganz normal synchronisieren.

Hier wollte ich untersuchen, ob die LN_v in adulten Gehirnen *in vitro* auf Histamin reagieren. Hierfür entwickelte ich einen Versuchsansatz auf Basis der FRET Technik. Für *Drosophila melanogaster* stehen inzwischen unterschiedliche transgene Fliegenlinien für die FRET Technik zur Verfügung. Die mit Abstand am besten für meine Zwecke geeignete ist der Calciumsensor Cameleon (Miyawaki et al., 1997). Cameleon ist ein Protein, welches aus einem blaugrün fluoreszierenden Protein, dem „enhanced cyan fluorescent protein“ (ECFP) und einem gelb fluoreszierenden Protein, dem „enhanced yellow fluorescent protein“ (EYFP), besteht. Beide sind durch eine Calmodulinsequenz und das Targetpeptid M13 miteinander verbunden (Miyawaki et al., 1997). Wenn der Cameleonsensor durch ein Licht der Wellenlänge 440nm angeregt wird, emittiert das Cameleon-Konstrukt Licht der Wellenlänge 470nm. Ein Einstrom von Calcium in das Zytoplasma der Zelle führt zu einer Veränderung des Verhältnisses der ECFP/EYFP Emission. Dies geschieht als Folge einer von Calcium abhängigen Konformationsänderung des Calmodulinmoleküls und des Proteins M13. Die Konformationsänderung der Proteine zieht die beiden fluoreszierenden Moleküle in einen engeren räumlichen Bereich zueinander. Diese Änderung führt zum „fluorescence resonance energy transfer“, dem FRET Effekt, das heißt der Übertragung der Fluoreszenzenergie vom ECFP-Protein auf das EYFP-Protein (Abb. 25). Dadurch lässt sich ein Calciumeinstrom in das Zytoplasma fluoreszenzmikroskopisch darstellen und mittels Aufzeichnung und Computeranalyse der Bilder auswerten (Fiala et al., 2002; Diegelmann et al., 2002).

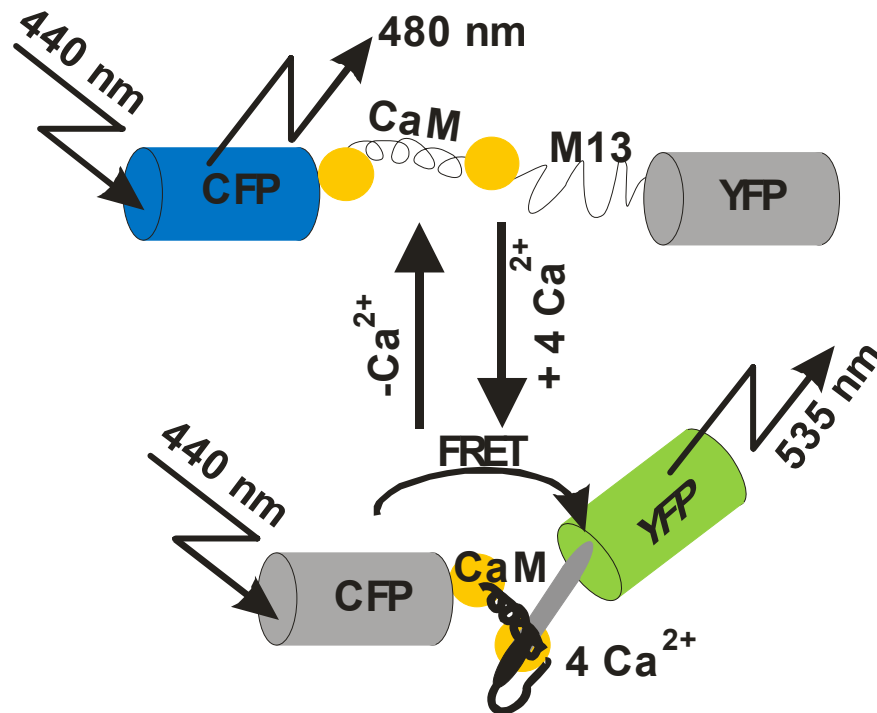


Abbildung 25: Darstellung der durch Calmodulin (CaM) und das Targetpeptid M13 gekoppelten fluoreszierenden Proteine CFP und YFP. Durch den Einstrom von Calcium in das Zytoplasma kommt es zu einer engeren räumlichen Beziehung der beiden Proteine. Hierdurch wird die von CFP aufgenommene Energie nicht als Emission abgestrahlt, sondern an das YFP übertragen. YFP emittiert dann eine Wellenlänge von 535nm. (nach Miyawaki et al., 1997)

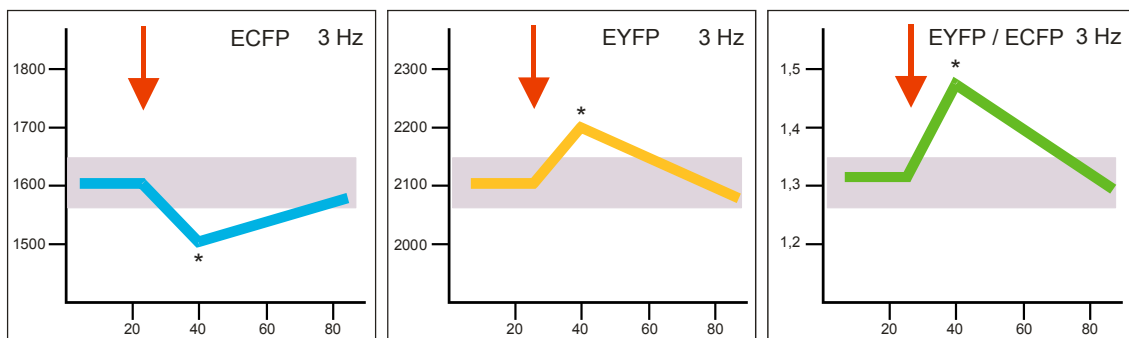


Abbildung 26: Veränderung in der relativen Fluoreszenz von ECFP und EYFP. Messgröße für die Auswertung ist immer das Verhältnis der EYFP zur ECFP Fluoreszenz, der so genannten RATIO. Die Abtastrate liegt in diesem Beispiel bei 3 Hz. Der rote Pfeil markiert die Zugabe einer Substanz. Wenn die Substanz zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytoplasma führt, sinkt die Fluoreszenz von ECFP. Im Gegenzug dazu steigt die EYFP Fluoreszenz. Dadurch vergrößert sich auch das Verhältnis der ECFP zur EYFP Fluoreszenz, die Ratio steigt an. Die Ratio muss einen gewissen Wert übersteigen, da es systembedingt zu Schwankungen kommt, die nicht dem Einfluss einer Substanz oder einer Erregung des Neurons zu Grunde liegt. Diesen Bereich habe ich mit einem grauen Balken unterlegt. Werte, die über diesen Bereich gehen, können als messbarer Effekt gewertet werden.

Meine Annahme war nun, dass die Photorezeptoren ein Transmittersignal an die dendritischen Anteile der lateralen Neurone abgeben und dass dieses

Signal zu einem Calciueinstrom in das Zytoplasma der lateralen Neurone führt. Dieses Calcium sollte dann mittels Cameleon2.1/82 detektiert werden.

Die Reaktion der lateralen Neurone sollte in diesem Experiment durch die kontrollierte Zugabe von Histamin zu einem funktionsfähigen Ganzgehirnpräparat ausgelöst werden. Hierbei sollte die Veränderung in der Fluoreszenz beobachtet werden. Für meine Untersuchung kreuzte ich die Treiberlinien *pdf-Gal4* mit der Responderlinie *UAS-Cameleon2.1/82*. Die F1 Generation dieser Fliegen untersuchte ich in Zusammenarbeit mit Dr. Andre Fiala (Biozentrum Würzburg).

4.2 Material und Methoden 2

4.2.1 Expression von WGA unter der Kontrolle der Treiber *pdf-Gal4* und *gmr-Gal4*

Ich kreuzte *pdf-Gal4* und *gmr-Gal4* Linien mit einer *UAS-wga* Linie. Diese trägt das *UAS-wga* Konstrukt auf dem dritten Chromosom. Die Tiere wurden auf Standardmedium R (siehe Anhang) bei 20°C aufgezogen. 5 Wochen alten männlichen Fliegen wurden dann die Gehirne aus der Kopfkapsel herauspräpariert. Die Präparation geschah in Phosphatpuffer. In einem weiteren Versuch präparierte ich Larvengehirne aus der entsprechenden Kreuzung. (Färbeprotokoll siehe Anhang)

4.2.2 Expression von Synapsin unter der Kontrolle des Treibers *Rh5-Gal4* in Synapsin⁹⁷ Tieren

Hier kreuzte ich die von mir hergestellte Treiberlinie *Rh5-Gal4*; *Syn*⁹⁷ Linie mit der Responderlinie *Syn*⁹⁷(*UAS-Synapsin*). Die Tiere wurden auf Standardmedium R (siehe Anhang) bei 20°C aufgezogen. 3 Tage alten Fliegen wurden dann die Gehirne aus der Kopfkapsel herauspräpariert. Die Präparation geschah in Phosphatpuffer. (Färbeprotokoll siehe Anhang).

4.2.3 Expression von Synaptobrevin-GFP unter der Kontrolle des Treibers *gmr-Gal4*

Ich kreuzte *gmr-Gal4* Linien mit einer *UAS-nsyb-GFP* Linie. Die Tiere wurden auf Standardmedium R (siehe Anhang) bei 20°C aufgezogen. 1-3 Tage alte Fliegen wurde dann das Gehirn aus der Kopfkapsel herauspräpariert. Die Präparation geschah in Phosphatpuffer. (Färbeprotokolle siehe Anhang)

4.2.4 Expression von Cameleon-GFP unter der Kontrolle des Treibers *pdf-Gal4*

Ich kreuzte die Treiberlinie *pdf-Gal4* mit einer der Responderlinie UAS-*Cameleon2.1/82*. Diese trägt das UAS-*Cameleon2.1/82* Konstrukt auf dem dritten Chromosom. Die Tiere wurden auf Standardmedium R (siehe Anhang) bei 20°C aufgezogen. 1 Woche alten Fliegen wurden unter Rotlicht die Gehirne aus der Kopfkapsel herauspräpariert. Die Präparation geschah in *Drosophila*-Ringer. Diese Lebendpräparate wurden dann in einem speziell für die Cameleon-Fluoreszenz ausgerüsteten Mikroskop untersucht. Für die Untersuchung wurden verschiedene Substanzen in die Badlösung eingebracht. Diese waren a) je 100µMol Histamin, b) 100µMol Acetylcholin und c) 100µMol Kaliumchlorid.

4.3 Ergebnisse 2

4.3.1 Immunfärbungen von larvalen *Drosophila*-Gehirnen der Kreuzung *gmr-Gal4 X UAS-wga*

Um eine mögliche anterograde WGA Übertragung von den larvalen Photorezeptorzellen an die PDF Neurone zu untersuchen, kreuzte ich die *gmr-Gal4* Treiberlinie mit der *UAS-wga* Responderlinie. Wie in Abbildung 27 dargestellt, lies sich WGA in den Photorezeptoren gut exprimieren und anfärben. Es zeigten sich keinerlei Hinweise auf eine Weitergabe an die PDF Neurone oder an andere Interneurone.

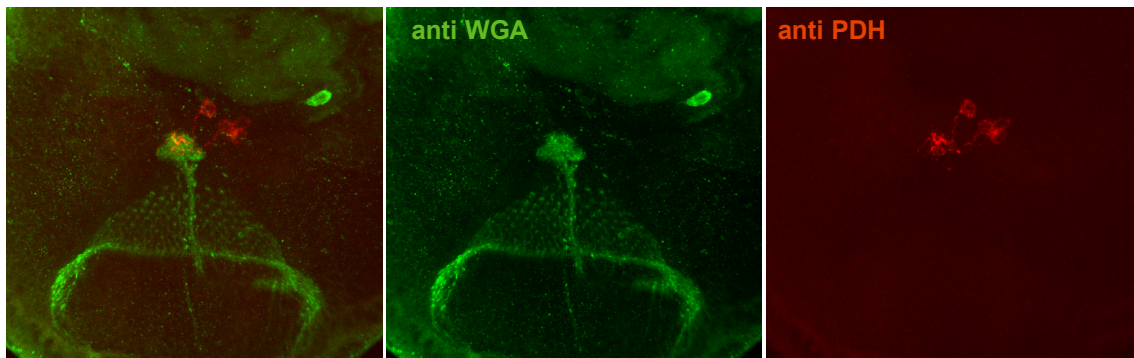


Abbildung 27: Ausschnitt aus einem Larvengehirn, das unter der Kontrolle des *gmr-Gal4* Treibers WGA in den Photorezeptoren exprimiert. Der WGA Antikörper ist grün fluoreszierend markiert, der PDH Antikörper rot fluoreszierend.

4.3.2 Immunfärbungen von larvalen *Drosophila*-Gehirnen der Kreuzung *pdf-Gal4 X UAS-wga*

Um einen möglichen retrograden Transport zu testen, wurde WGA unter Kontrolle von *pdf-Gal4* in den LN_v exprimiert. Es fand sich in den gefärbten Larvengehirnen eine gute Immunmarkierung der PDF Neurone mit dem WGA Antikörper. Es zeigte sich weiter in sechs von sechs präparierten und gefärbten Hirnen dasselbe eigentümliche Färbemuster mit der Anfärbung einer Region, die sich außerhalb der Fasern der PDF Neurone zu befinden scheint, diese aber quasi umfasst und zwar an der Stelle, wo die Neurone postsynaptische Endigungen ausbilden (siehe Abb. 28). Es handelt sich hierbei um das Gebiet, in dem sich das larvale optische Neuropil befindet. Wie man in Abbildung 28 sehen kann, in der das larvale optische Neuropil mittels anti-WGA angefärbt ist,

scheint es die Fasern der PDF-Neurone nahe ihrer Austrittsstelle zu umfassen. Dieser Bereich könnte ein Ort synaptischer Übertragung darstellen. In Abbildung 28 sieht man in einer Region, in der die Fasern der drei sichtbaren PDF Neurone zusammenfinden (weißer Stern) einen großen Bereich innerhalb der anti-WGA Färbung, in welchem sich WGA anscheinend konzentriert in Konglomeraten befindet. Dieser Bereich ist in Abbildung 29 nochmals vergrößert dargestellt.

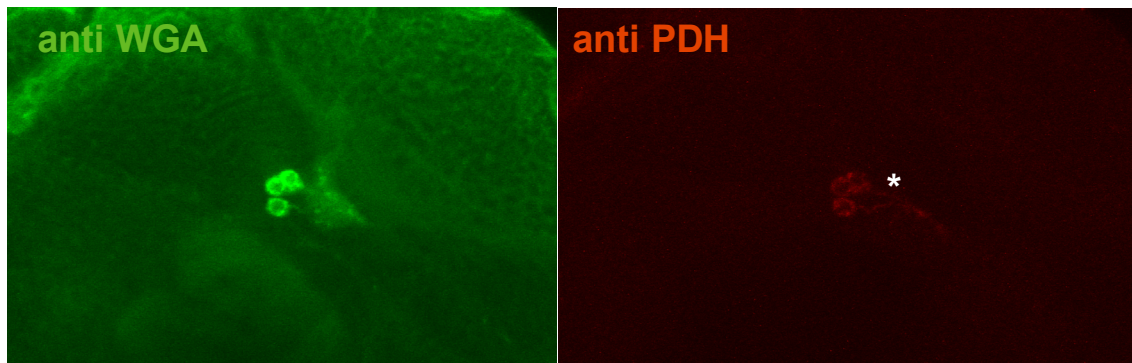


Abbildung 28: Ausschnitt aus einem Larvengehirn, das WGA unter der Kontrolle des *pdf*-Gal4 Treibers exprimiert. Der WGA Antikörper ist grün fluoreszierend markiert, der PDH Antikörper rot.

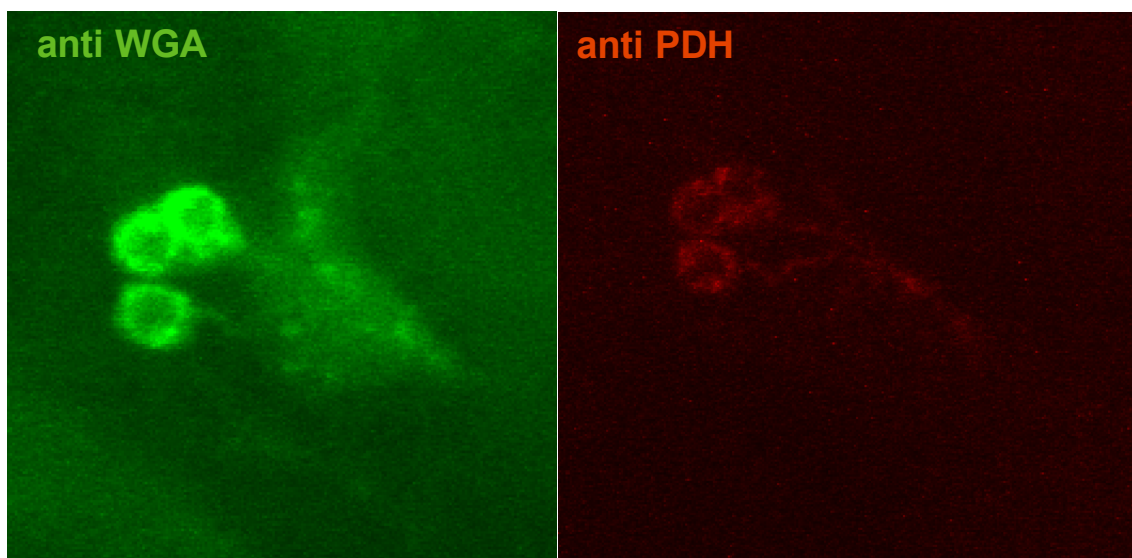


Abbildung 29: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 28. Deutlich sind die WGA enthaltenden Konglomerate zu sehen. Sie sind nicht genau mit den Fasern der PDF Neurone colokalisiert, befinden sich aber in nächster Nähe zu diesen. Möglicherweise durchkreuzen sie das WGA positive Areal.

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen eine deutliche Anreicherung von WGA in einem Bereich, der dem larvalen optischen Neuropil zugeordnet werden kann. Dies deutet auf eine hohe synaptische Aktivität in diesem Bereich hin.

4.3.3 Ergebnisse der WGA Expression in adulten Fliegen

In ersten Ergebnissen zeigte sich, dass wenige Tage alte adulte Fliegen bezüglich des WGA lediglich eine geringe Immunreaktivität bei den Färbungen aufwiesen (Abb. 30). Daraufhin ließ ich die Fliegen altern und stellte bei 5 Wochen alten Männchen die besten Resultate bei den Färbungen fest. Bei der Expression des WGA unter der Kontrolle des *gmr*-Gal4 Promotors konnte ich WGA zwar in den Rezeptoren 7 und 8 nachweisen, ich fand jedoch keine Anzeichen für eine anterograde Weitergabe des WGA in die Verzweigungen der I-LN_v oder in andere möglicherweise nachgeschaltete Interneurone (Abb. 31). Bei der Expression des WGA unter der Kontrolle des *pdf*-Gal4 Promotors erschien allerdings in den konfokalen Schnitten eine schwache Immunfärbung der Rezeptoren 7 und 8. Die gleiche Färbung fand sich allerdings in alten Wildtyp Fliegen, die kein WGA exprimieren sollten. Deshalb ist dies als unspezifische Reaktion des Antikörpers zu werten.

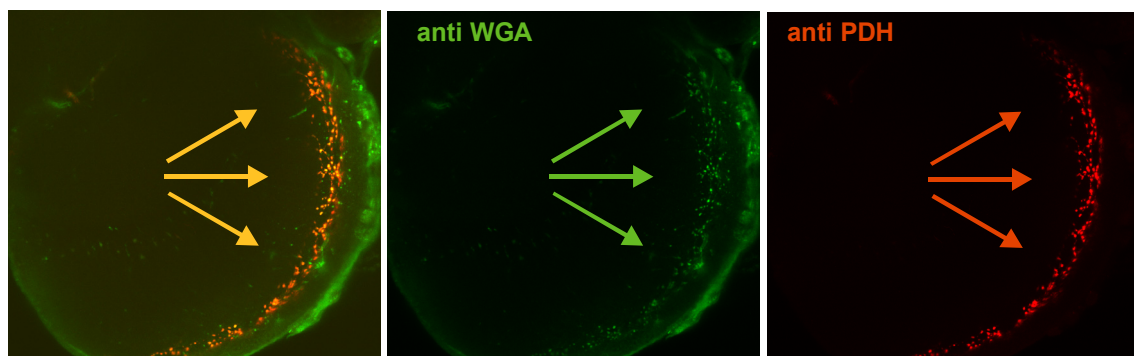


Abbildung 30: Ausschnitt aus dem Gehirn einer jungen adulten Fliege, die unter der Kontrolle des *pdf*-Gal4 Treibers WGA exprimiert. Der WGA Antikörper ist grün fluoreszierend markiert. Der PDH Antikörper rot. Gezeigt ist hier das Netzwerk auf der Medulla, welches von den I-LN_v gebildet wird. In Varikositäten, in denen sowohl PDF als auch WGA colokalisiert ist, erscheint die Fluoreszenz gelb (Bild links). Es sind keine Interneurone oder Photorezeptorendigungen WGA positiv.

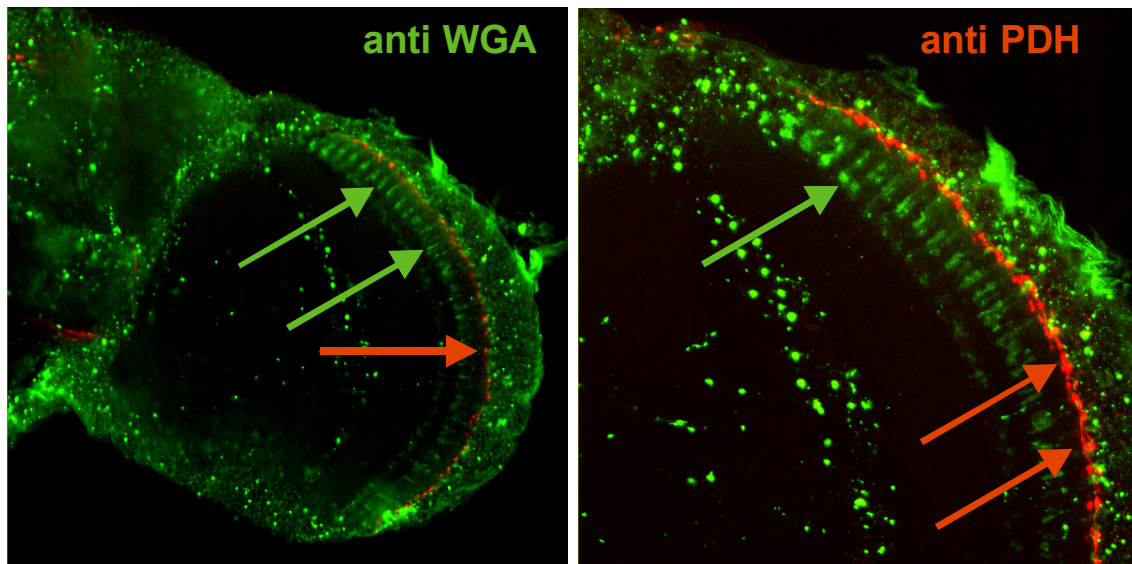


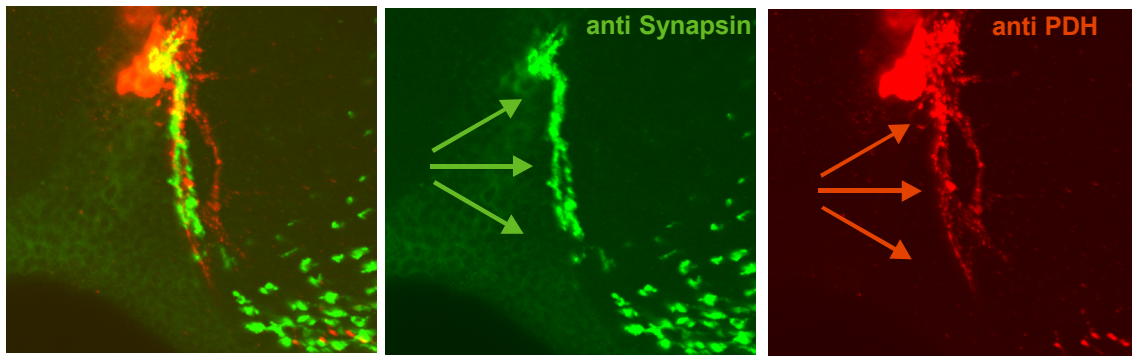
Abbildung 31: Ausschnitt aus dem Gehirn einer 5 Wochen alten adulten Fliege, die unter der Kontrolle des *gmr*-Gal4 Treibers WGA exprimiert. Der WGA Antikörper ist grün fluoreszierend markiert. Der PDH Antikörper rot. Gezeigt ist hier ein Ausschnitt des Netzwerks auf der Medulla welches von den I-LNv gebildet wird. Die Varikositäten sind stark PDF immunreaktiv (rote Pfeile). Die Endigungen der R7 und R8 sind WGA immunreaktiv. Es findet sich keine Colokalisation von WGA und PDF in den Varikositäten.

4.3.4 Anti-Synapsin / anti PDH Immunfärbung

4.3.4.1 Expressionsmuster der Kreuzung aus *Rh5*-Gal4; *syn*⁹⁷ und *syn*⁹⁷ UAS-*syn*

Bei dieser Kreuzung wird das für synapsenspezifische Protein Synapsin nur in den Rezeptoren des H-B Äugleins und in einer Untergruppe der Rezeptorzelle 8 der Komplexaugen gebildet. Von Interesse war bei dieser Färbung, ob es enge Kontakte zwischen den Terminalen des H-B Äugleins und der akzessorischen Medulla gibt. In Abbildung 32 kann man sehr deutlich die Terminalen des H-B Äugleins sehen, diese werden nahezu von Fasern der akzessorischen Medulla umfassen.

A



B

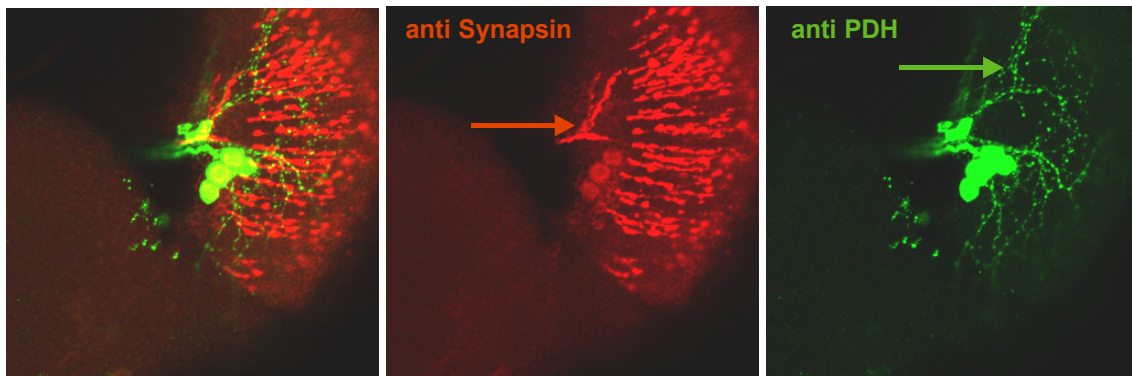


Abbildung 32: Expressionsmuster der Kreuzung aus *Rh5-Gal4; syn⁹⁷* und *syn⁹⁷ UAS-syn*. Der Synapsin Antikörper ist grün fluoreszierend markiert, der PDH Antikörper rot fluoreszierend. **A.** Deutlich sind einzelne Terminalen der Photorezeptoren der H-B Äuglein zu erkennen. In der gemeinsamen Projektion der Bilder links kann man sehen wie die Fasern der akzessorischen Medulla die Terminalen des H-B Äugleins umschlingen. **B.** Deutlich sind einzelne Terminalen der R8 und die der H-B Äuglein (roter Pfeil) zu erkennen. Die akzessorische Medulla ist auf dieser Darstellung nicht zu sehen, aber ein Anteil des varikösen Netzwerkes welches von den I-LN_v gebildet wird (grüner Pfeil).

4.3.5 Synaptobrevin-GFP / anti PDH Immunfärbung

4.3.5.1 Expressionsmuster der Kreuzung aus *gmr-Gal4* und *UAS-n-syb*

Im Wesentlichen sollte die Expression von Synaptobrevin-GFP zu derselben anatomischen Markierung führen wie man sie durch die anti-Synapsin Immunfärbung erhält. Tatsächlich zeigt sich auch hier, dass die Terminalen des H-B Äugleins in engem Kontakt zu den Fasern der akzessorischen Medulla stehen (Abb. 33). Die im Vergleich zu *Rh5-Gal4; syn⁹⁷ UAS-syn* Fliegen regelmäßigere Markierung der Terminalen der Komplexaugen ist in der Treiberlinie begründet. Das Gen *gmr* ist in allen Photorezeptoren aktiv und

daher wird Synaptobrevin in allen Rezeptorzellen exprimiert, während es in der anderen Linie nur in den Rh5 enthaltenden R8 Rezeptorzellen exprimiert wird. In der Abbildung sind neben den Terminalen des H-B Äugleins die Endigungen der Rezeptorzelle 7 und 8 markiert.

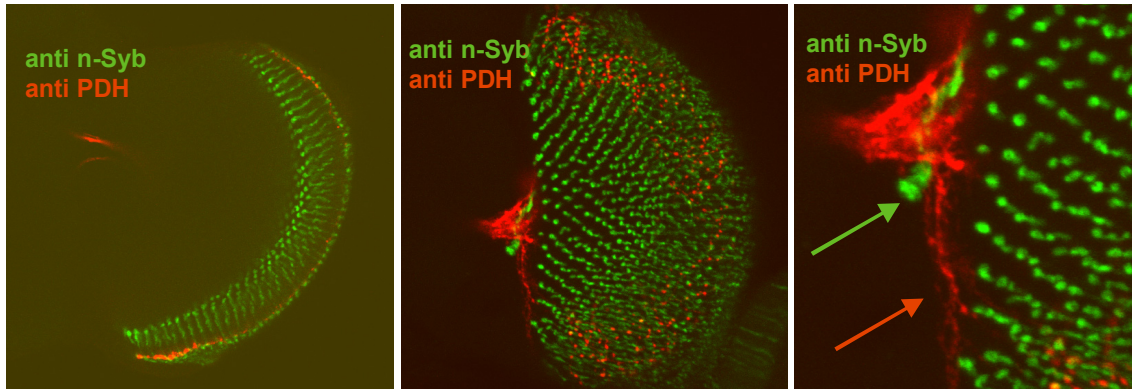


Abbildung 33: Expression von Synaptobrevin-GFP unter der Kontrolle der Treiberlinie *gmr-Gal4*. Synaptobrevin-GFP ist grün. PDH wurde rot fluoreszierend markiert. Im Bild rechts ist ein Anschnitt des optischen Lobus zu sehen. Am Rand verläuft das variköse Netzwerk der I-LN_v (rot). In die Medulla ziehen sehr regelmäßig die Terminalen der R7 und R8. Das Bild in der Mitte zeigt eine Überlagerung mehrerer konfokaler Schnitte. Man sieht hier die regelmäßige Verteilung der Endigungen der R7 und R8 in der Medulla. Im Ansatz der Medulla ist die Terminale des H-B Äugleins zu sehen. Im Bild rechts wurde der Bereich der akzessorischen Medulla vergrößert. Man sieht deutlich die Endigung des H-B Äugleins innerhalb des Ansatzes der akzessorischen Medulla.

4.3.6 Wirkung von Histamin auf die ventralen lateralen

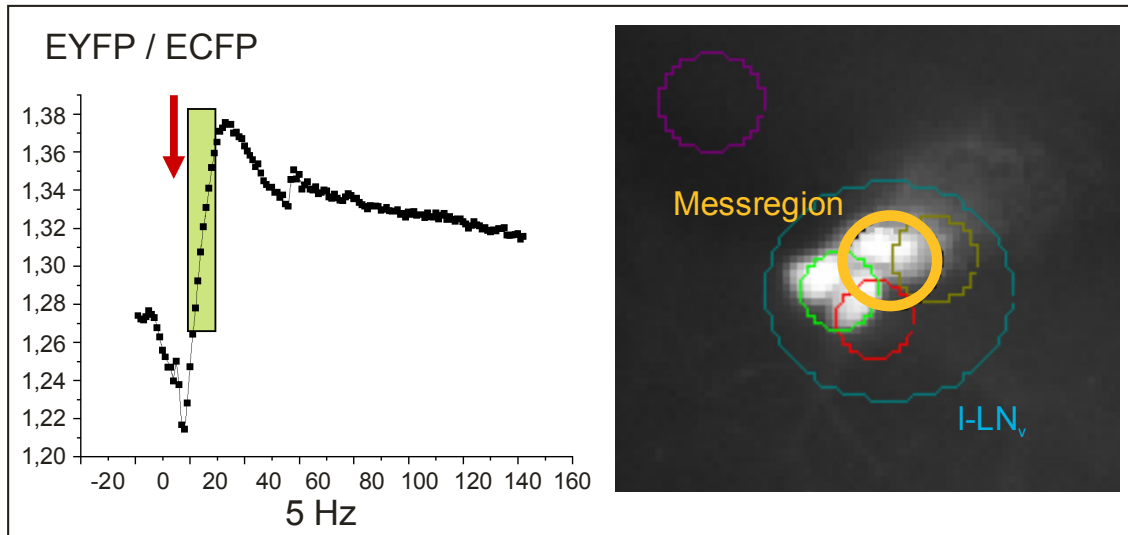
Schrittmacherneurone unter Zuhilfenahme der FRET Technik

Wie zuvor bereits beschrieben besteht eine gewisse Evidenz, dass die das Netzwerk an der Oberfläche der Medulla bildenden I-LN_v dort mit den Rezeptorzellen 7 und 8 der Komplexaugen eine Verbindung besitzen, sowie die s-LN_v und I-LN_v auf der Ebene der akzessorischen Medulla mit den Terminalen des H-B Äugleins eine gemeinsame neuronale Verschaltung haben.

Um zu sehen, ob eine funktionelle Verbindung zwischen Photorezeptoren und circadianen Schrittmacherneuronen besteht, untersuchte ich die Reaktion der s-LN_v und I-LN_v auf den Neurotransmitter Histamin *in vitro*. Dazu wurden Fliegen verwendet, die UAS-*Cameleon2.1/82* in den PDF-positiven LN_v exprimierten. Zunächst wurde die Funktion des Setups sowie der untersuchten Neurone durch Zugabe von 100µMol Kaliumchlorid getestet. Kaliumchlorid löst immer eine Freisetzung von Calcium in das Zytoplasma aus, und wie erwartet führte

die Zugabe zum Absinken der ECFP und zum Anstieg der EYFP Fluoreszenz (Abb. 34). Damit war klar, dass die Neuronen vital und voll funktionsfähig waren.

A



B

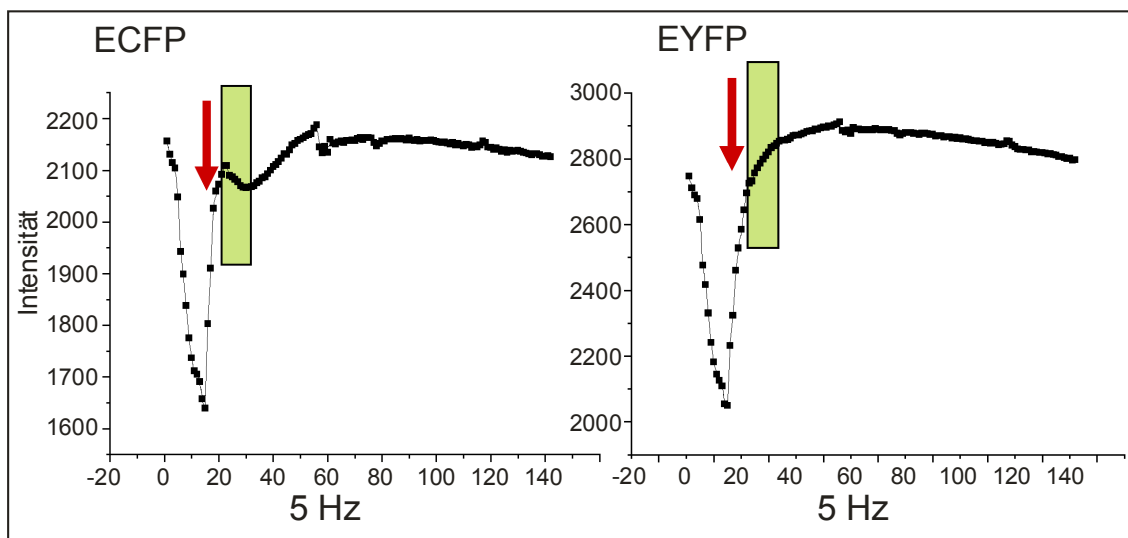


Abbildung 34: Veränderung der ECFP und EYFP Fluoreszenz nach der Zugabe von 100μMol Kaliumchlorid in den I-LN_v. Die Abtastrate betrug 5 Hz. Die Testapplikation diente der Überprüfung, ob die Zellen im Versuchsaufbau gemessen werden können. Durch die Zugabe von Kaliumchlorid werden alle internen Calciumspeicher entleert und die Zelle zeigt das maximale EYFP Fluoreszenzsignal. Nach der Zugabe von Kaliumchlorid zerstört das Übermaß an freiem Calcium die Zelle. Daher wird für gewöhnlich die Kaliumgabe am Ende einer Meßreihe durchgeführt. Hier zeigen sich nach der Applikation (roter Pfeil) ein Anstieg der EYFP/ECFP Ratio. Danach verkleinert sich die Ratio wieder (A). Betrachtet man die ECFP und EYFP Fluoreszenz getrennt, so führte die Kaliumchloridzugabe zum Absinken der ECFP Fluoreszenz und zum Anstieg der EYFP Fluoreszenz (B). Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe des Kaliumchlorids. Im Weiteren unterliegen beide Fluoreszenzproteine dem Ausbleichen durch das anregende Licht

Für die eigentliche Untersuchung wurden nun jeweils 100 μMol Histamin in die Badlösung zu den isolierten Gehirnen gegeben. Hieraufhin wurde die Änderung in der Fluoreszenz in den Somata der s-LN_v und l-LN_v und im Netzwerk der l-LN_v an der Oberfläche der Medulla gemessen (Abb. 35, 37).

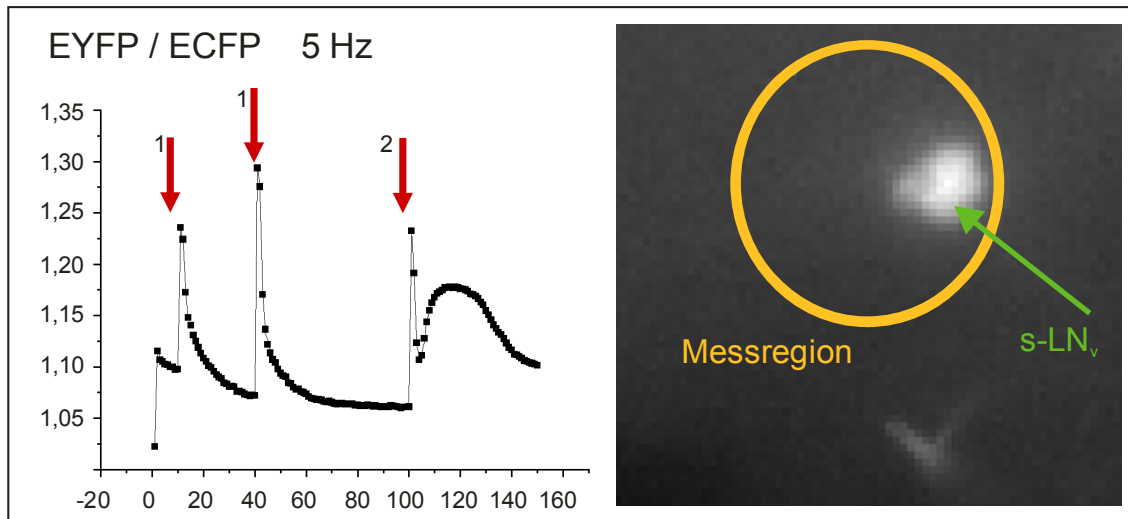


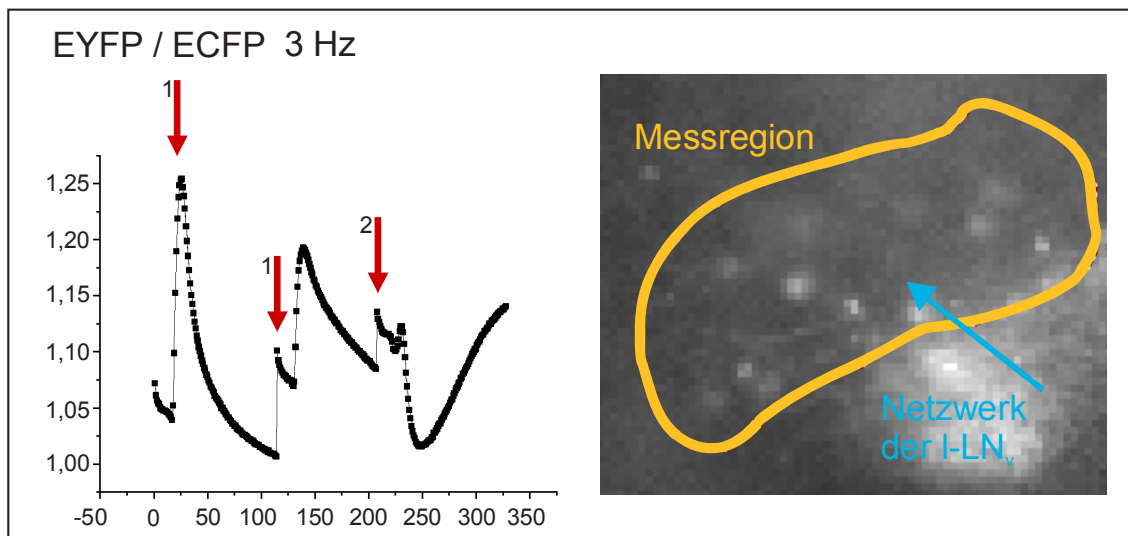
Abbildung 35: Messung des FRET Effekts an den s-LN_v. Zu 2 Zeitpunkten wurde in die Badlösung des Versuchsaufbaus 100 μMol Histamin zugegeben (roter Pfeil 1), zum dritten Zeitpunkt (roter Pfeil 2) wurde als Kontrolle das oben bereits erwähnte Kaliumchlorid (100 μMol) zugegeben. Die steilen Peaks, die in den Messungen auftraten sind Bewegungsartefakte. Diese entstehen durch Turbulenzen, die durch das Einpipetieren der Lösungen in die Badlösung verursacht wurden. Als reale Reaktion auf das Histamin ist die Reduzierung der EYFP/ECFP Ratio anzusehen. Beziehungsweise der Anstieg der Ratio nach der Gabe von Kaliumchlorid, welche auch beweist dass die Zellen lebend und funktionsfähig sind.

Durch ihre exponierte Lage zwischen optischem Lobus und Zentralgehirn sind von den Schrittmacherneuronen die LN_v für die Messung besonders gut geeignet. In Abbildung 35 sind zwei aufeinanderfolgende Applikationen von Histamin (roter Pfeil 1) und eine Applikation von Kaliumchlorid (roter Pfeil 2) gezeigt. Die Histamingaben führten sowohl bei der ersten Applikation als auch bei der zweiten zu einem leichten Absinken der EYFP/ECFP Ratio. Die danach folgende Kontrollapplikation von Kaliumchlorid führte zur normalen Reaktion der Zellen mit einem Anstieg der EYFP/ECFP Ratio, der einen Anstieg des freien intrazellulären Calciums anzeigt.

Abbildung 37 zeigt die Reaktion auf Histamin und Acetylcholin in den Varikositäten der l-LN_v. Auch hier führte die Applikation von Histamin zu einem leichten Absinken der EYFP/ECFP Ratio. Nach Acetylcholin leuchtete das Gewebe dagegen stark auf und war danach zerstört. Dies kann daran gesehen

werden, dass danach durch Kaliumchlorid nicht die typische Reaktion ausgelöst werden konnte (nicht gezeigt).

A



B

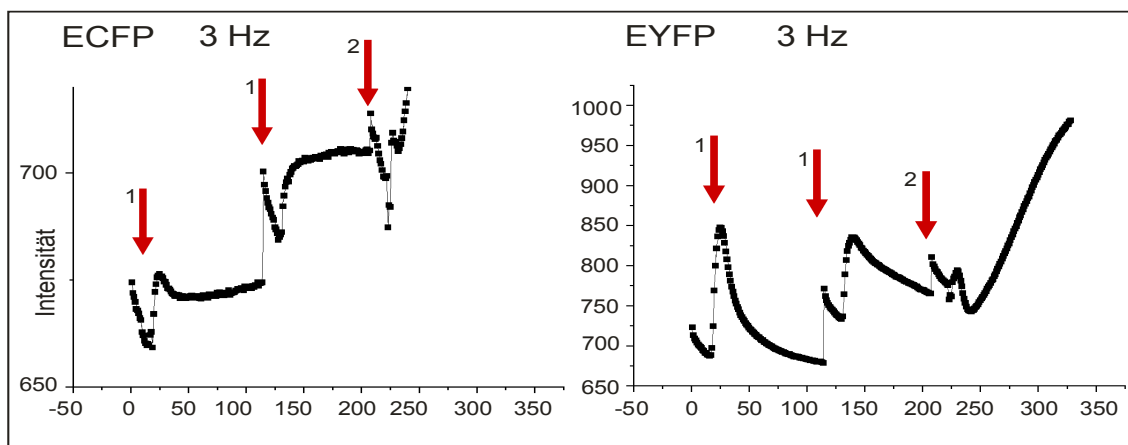


Abbildung 37: Reaktion der Varikositäten der I-LN_v auf die Zugabe von 100µMol Histamin (rote Pfeile 1) und 100µMol Acetylcholin (roter Pfeil 2). Histamin führte eher zu einer Abnahme der EYFP Fluoreszenz, die Zugabe von Acetylcholin dagegen zu einem starken Aufleuchten und letztendlich Zerstörung des Gewebes. Die Zugabe der Lösungen führte wiederum zu Bewegungsartefakten.

Entstehung von Bewegungsartefakten:

Das kurzzeitige Ansteigen der Fluoreszenz nach Zugabe von Lösungen ist auf Bewegungsartefakte zurückzuführen und hat nichts mit einer tatsächlichen FRET Fluoreszenz zu tun. Hier wirkt sich lediglich eine minimale Änderung der Position des Gehirns bei der Zugabe der Lösungen aus (Abb. 38).

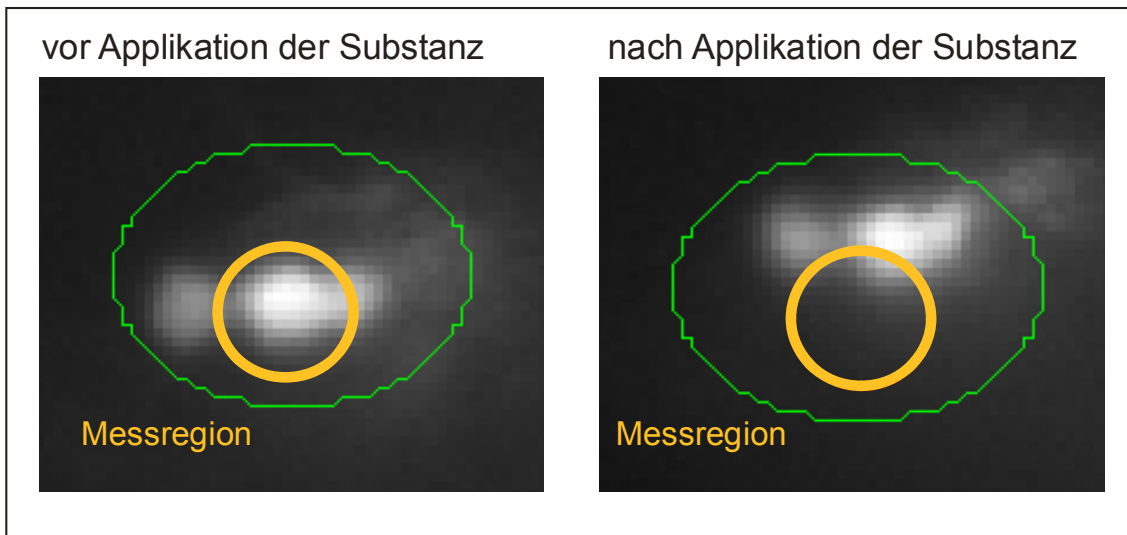


Abbildung 38: Bewegungsartefakt: Durch die Zugabe von Lösungen mittels einer Pipette können sich die Zellen aus dem zur Beobachtung ausgewählten Bereich herausbewegen. Dadurch kommt es zu Veränderungen in der Leuchtintensität der Messregion, dies führt zu falschen Messwerten.

Insgesamt waren die gemessenen FRET-Änderungen in den LN_v eher gering und auf keinen Fall trat eine Erhöhung der ECFP/EYFP Ratio auf. Damit kann ausgeschlossen werden, dass Histamin eine erregende Wirkung auf die circadianen Schrittmacherneuronen hatte. Die Ergebnisse sprechen eher für eine hemmende Wirkung von Histamin. Das benutzte Cameleon ist allerdings ungeeignet dafür, hemmende Wirkungen zuverlässig zu messen. So verließen meine Messungen nie den Bereich des Signalrauschens (Abb. 39).

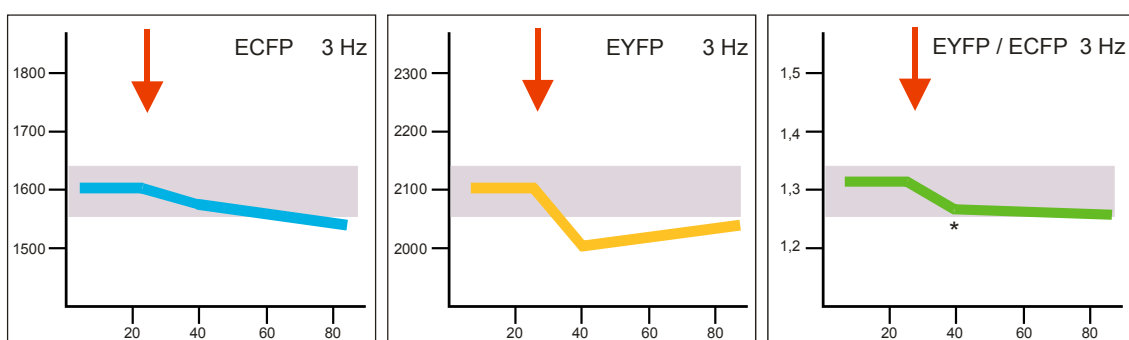


Abbildung 39: Grafische Darstellung der relativen ECFP und EYFP Fluoreszenz der kleinen und großen lateralen Schrittmacherneurone ($s-LN_v$ und $l-LN_v$) bei einer Zugabe von Histamin. Die Intensität der Fluoreszenz des ECFP sinkt bei der Zugabe leicht ab, bleibt aber innerhalb des grauen Bereichs. Die EYFP sinkt noch stärker ab. Dadurch ergibt sich eine Reduzierung der Ratio von ECFP/EYFP. Die ECFP/EYFP Werte verlassen nicht den grauen Bereich (Signalrauschen).

4.4 Diskussion 2

4.4.1 Anterograde oder retrograde WGA Übertragung?

Bei der Übertragung von WGA in nachgeschaltete Neurone findet sich ein prinzipielles Problem. WGA kann sowohl anterograd, das heißt in Richtung der Informationsausbreitung, als auch retrograd, also in der der Informationsausbreitung entgegengesetzten Richtung aufgenommen werden. Beide Fälle sind in der Literatur beschrieben (Yoshihara et al., 1999). Findet sich also bei einer Expression des WGA unter Kontrolle des *pdf*-Gal4 Promotors eine WGA Anfärbung in den Photorezeptoren bei adulten Fliegen, so bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass die Informationsrichtung von den PDF Neuronen zu den Rezeptorzellen 7 und 8 verlaufen muss. Da ich eher angenommen habe, dass die PDF Neurone Zielzellen für die Lichtinformation sind, würde das gefundene Färbemuster für eine retrograde Übertragung des WGA sprechen. Für meine Untersuchungen hätte dies nun bedeutet, dass tatsächlich synaptische Information von den Rezeptorzellen zu den Verzweigungen der I-LN_v übertragen wird. Leider zeigte sich in den folgenden Kontrollexperimenten, dass auch im Canton-S Stamm Photorezeptoren gefärbt wurden, obwohl hier keinerlei WGA exprimiert worden war. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den angefärbten Anteilen der Photorezeptorterminalen bei den Expressionsexperimenten um Proteine handelt, die altersbedingt in den Terminalen akkumulieren und die mit dem WGA Antikörper eine Kreuzreaktion eingehen. Somit wäre die Anfärbung der Rezeptorzellen unabhängig von der Expression des WGA und daher mit dieser Methode keine funktionelle Verbindung der Rezeptoren 7 und 8 mit den I-LN_v nachzuweisen. Im Weiteren könnte eine mögliche Ursache des misslungenen Nachweises der WGA Weitergabe auch in der zur Arbeit von Tabuchi et al. (2000) unterschiedlichen Nachweismethode liegen. Es könnte sein, dass die von ihm verwendete Methode der Immunoelektronenmikroskopie sensitiver ist als die von mir durchgeführte konfokale Laserscan Immunfluoreszenzmikroskopie. Tatsächlich würde dieses aber langjährigen Erfahrungswerten widersprechen, und es stünde dann immer noch die positive WGA Anfärbung des Kontrollstamms

Canton-S im Raum. Insgesamt kann man hier von einem negativen Resultat bei dem Versuch des Nachweises der synaptischen Übertragung zwischen den I-LN_v und den Rezeptoren 7 und 8 sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung ausgehen.

Inzwischen konnten die Arbeitsgruppen von Elzbieta Pyza und Friedrich Schürmann durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass es im Netzwerk der I-LN_v keine postsynaptischen Terminalen gibt (Miskiewicz et al., 2004). Dies macht es sehr unwahrscheinlich, dass das Netzwerk der I-LN_v auf der Medulla direkt oder indirekt von Photorezeptorzellen innerviert wird. Diese Tatsache unterstützt mein negatives Ergebnis der synaptischen Übertragung von WGA. Dies bedeutet, dass die positiven Färbungen in der Tat höchstwahrscheinlich auf die Kreuzreaktion des WGA Antikörpers mit im Alter akkumulierenden Proteinen zurückzuführen sind.

Bei den Untersuchungen der larvalen Gehirne stellen sich die Ergebnisse anders dar. Bei den Larven hat man es nicht mit Alterungseffekten zu tun, da die Larven bis zu ihrer Präparation gerade ein paar Tage alt sind. Eine Kreuzreaktion ist also aller Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Die Expression von WGA mittels der Treiberlinie *pdf-Gal4* erzeugte eine deutliche Färbung in einem Bereich, der dem larvalen optischen Neuropil zuzuordnen ist. Dies spricht für eine funktionelle Verbindung der larvalen Photorezeptoren mit den PDF exprimierenden Schrittmacherneuronen, wobei WGA in diesem Fall retrograd übertragen wurde. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass ich nicht ausschließen kann, dass das WGA von anderen Neuronen als den larvalen Photorezeptoren aufgenommen wurde, oder Gliazellen das WGA mit dem gleichen Mechanismus resorbiert haben wie sie zum Beispiel auch Transmittermoleküle aus dem synaptischen Spalt entfernen. Letztlich bleibt aber der Anschein, dass es sich bei der Überschneidung von PDF-Neuronen und dem larvalen optischen Neuropil um ein Gebiet mit hoher synaptischer Aktivität handelt.

4.4.2 Synapsenspezifische Immunmarkierung mit Synapsin und Synaptobrevin

Mit der selektiven Expression von Synapsin und Synaptobrevin stehen zwei Markierungsmethoden zur Verfügung, mit denen funktionelle Bereiche eines Neurons charakterisiert werden können. Genauer handelt es sich um den Bereich eines Neurons, an dem Information weiter gegeben wird. Ich war besonders daran interessiert, ob es zwischen den Terminalen des H-B Äugleins und der akzessorischen Medulla eine synaptische Überschneidungszone gibt. Meine Untersuchung an larvalen Gehirnen unter Zuhilfenahme der neuronalen Tracertechnik mittels WGA haben gezeigt, dass die Terminalen des Bolwigschen Organs in regem Kontakt zu den PDF Neuronen stehen (siehe oben). Die PDF Neurone der Larven bilden im adulten Tier als s-LN_v zusammen mit den l-LN_v die akzessorische Medulla aus, das H-B Äuglein wiederum stellt ein Organ dar, das aus den Rezeptoren des Bolwigschen Organs herausgebildet wird. Folglich ließe sich hieraus schließen, dass diese in der Larve bereits bestehende Funktionseinheit von Rezeptororgan und Zielzellen auch in der adulten Fliege weiter bestehen bleibt. Die Darstellung des synaptischen Bereiches des H-B Äugleins innerhalb der akzessorischen Medulla deutet auf den Erhalt und die Bedeutung der funktionellen Einheit beider Strukturen hin (Abb. 40).

Neben der Reduktion der Photorezeptoren des Bolwigschen Organs von 12 auf 4 beim H-B Äuglein findet auch ein Wechsel des für die Informationsweitergabe genützten Neurotransmitters statt. Im Bolwigschen Organ liegt Acetylcholin als Neurotransmitter vor, im H-B Äuglein wird dagegen Histamin als Neurotransmitter genützt. Histamin ist auch der Neurotransmitter der Photorezeptoren des Komplexauges und der Ocellen. Der Wechsel des Neurotransmitters deutet möglicherweise auf eine veränderte Integration der Signale zwischen den Photorezeptoren des H-B Äugleins zu den PDF Neuronen im Vergleich zur Verschaltung der Photorezeptoren des Bolwigschen Organs mit den PDF Neuronen hin.

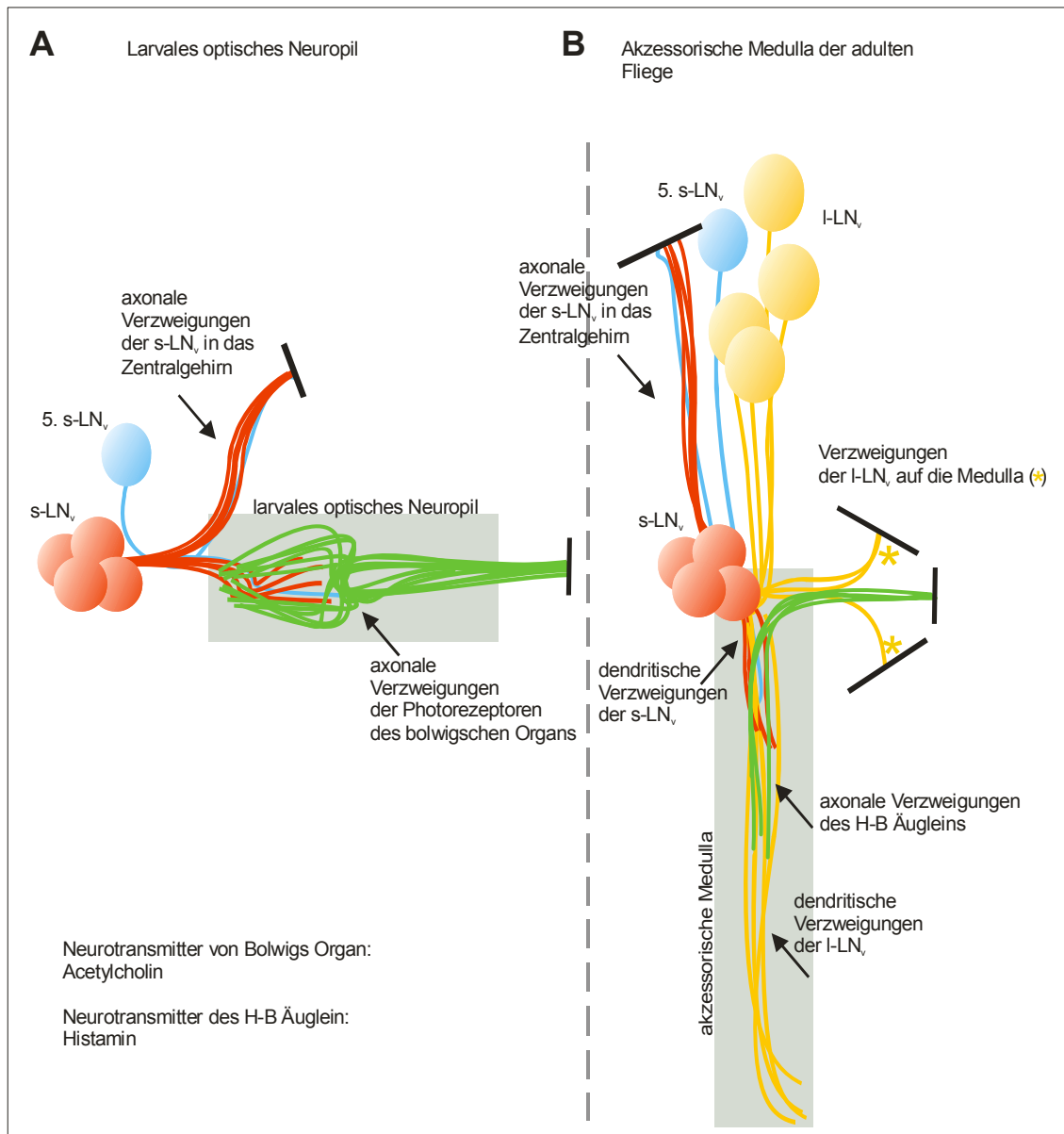


Abb. 40 Schematische Darstellung der Beziehung zwischen larvalen optischen Neuropil und den larvalen circadianen Schrittmacher-Neuronen (A) sowie zwischen akzessorischer Medulla und den adulten circadianen Schrittmacher-Neuronen (B).

A) Die dendritischen Verzweigungen der s-LN_v (PDF-positive s-LN_v (in Rot) und 5. s-LN_v (in Blau) bilden mit den Terminals der larvalen Photorezeptoren (in Grün) das larvale optische Neuropil (grau unterlegt).

B) In der Entwicklung der Larve zum adulten Tier werden die larvalen Photorezeptoren zum extraretinalen Auge (H-B Äuglein) umgebaut. Die dendritischen Anteile der s-LN_v des larvalen optischen Neuropils bilden zusammen mit dendritischen Ausläufern der I-LN_v (in Orange) die akzessorische Medulla (grau unterlegt). Die akzessorische Medulla umfängt die Terminals des H-B Äugleins. An diesem Ort werden höchstwahrscheinlich relevante Informationen des extraretinalen Auges in das circadiane Schrittmachersystem von *Drosophila* übertragen. Die schwarzen Balken zeigen an, dass die neuronalen Ausläufer an dieser Stelle weiter verlaufen würden.

4.4.3 Funktionelle Verbindung der Photorezeptoren mit den großen und kleinen lateralen Schrittmacherneuronen bei *Drosophila melanogaster* „in vitro“

Die FRET-Messungen ergaben allesamt keine analysierbaren Reaktionen auf die Histamingabe. Auch führte die Zugabe von Acetylcholin zu keinem Resultat. Die Kontrolle mittels der Zugabe von Kaliumchlorid zeigte aber, dass das System im Grundsatz funktionierte und die Zellen der Gehirne lebend und funktionstüchtig waren. Neben Problemen in experimentell technischer Hinsicht, wie zum Beispiel der Erschütterung des Präparates bei der Zugabe von Lösung, dem Verschieben des Präparates aus dem Fokus des Mikroskops und der daraus resultierenden Ungenauigkeit der Messung, zeigten sich noch weitere Probleme in der angewandten Methode. Die Untersuchung mittels Cameleon82.2 setzt eine Erregung des zu untersuchenden Neurons voraus. Durch die Erregung werden entweder extrazelluläre Kalziumeinströme induziert oder die intrazellulären Kalziumspeicher entleeren sich in das Zytoplasma. Beides ist bei einer Depolarisation der Fall, nicht jedoch bei einer Hyperpolarisation. Bei der Suche nach der Ursache der unbefriedigenden Untersuchungsergebnisse zeigte sich, dass in unserem Setup Histamin als ein hemmender Transmitter zu einer Hyperpolarisation führt und wir nicht in der Lage waren, dieses Signal innerhalb des grundsätzlich vorhandenen Rauschens der ECFP/EYFP Ratio zu detektieren. Weiter wäre ein Histamin-Agonist für die Untersuchung angebracht gewesen als die unmittelbare Untersuchung mit Histamin, da man davon ausgeht, dass die Neurone über potente Mechanismen verfügen, um das freie Histamin in kürzester Zeit aus dem intrazellulären Raum zu entfernen.

5 Teil 3: Molekularer Zustand der Inneren Uhr

5.1 Einleitung 3

Die Innere Uhr von Tieren wie zum Beispiel *Drosophila* setzt sich aus mehreren Schrittmacherneuronen zusammen (siehe Abb.6 und Einleitung 1). Die prinzipielle Grundvoraussetzung für ein Neuron solch ein Schrittmacher zu sein ist, dass das Neuron über eine funktionierende molekulare Uhr verfügt. Diese molekulare Uhr von *Drosophila* ist in der Einleitung zu Beginn der Arbeit bereits vereinfacht beschrieben (siehe Abb.2). Das beschriebene Modell verfügt über zwei molekulare, miteinander gekoppelte, negative Rückkopplungsschleifen die bereits eine Oszillation der Inneren Uhr unter Konstantbedingungen (DD oder LL) aufrechterhalten könnten. Tatsächlich kommen solche einfache Uhren in der Natur wahrscheinlich nicht vor. Eine essentielle Eigenschaft Innerer Uhren ist ihre Kopplung an die Umwelt. Wie in Teil 1 (Verhalten) und Teil 2 (Funktion) dargelegt geschieht diese Kopplung (Entrainment) hauptsächlich über Licht, und es gibt zumindest in der akzessorischen Medulla funktionelle Kontakte zwischen Photorezeptorzellen und circadianen Schrittmacherneuronen. Außerdem wird das Blaulichtphotopigment Cryptochrom in den meisten Schrittmacherneuronen exprimiert. Von Cryptochrom ist bekannt, dass es nach der Aktivierung durch Licht mit TIM interagiert. Diese Interaktion führt zur Modifikation von TIM (Ubiquitinierung), so dass es anschließend im Proteasom abgebaut wird. Aus diesem Grund muss das von mir gezeigte Modell der molekularen Uhr zunächst um den Faktor des Lichteingangs mittels Cryptochrom (CRY) ergänzt werden. Wie in Abb. 41 dargestellt greift CRY direkt in die Synchronisation der Inneren Uhr im Licht-Dunkel-Wechsel ein. Es vermittelt sowohl parametrische als auch nichtparametrische Effekte des Lichts, und es macht die Innere Uhr extrem lichtempfindlich. So kann sich die Innere Uhr der Fliege innerhalb eines Tages an eine Phasenverschiebung des Lichts von 6 Stunden anpassen (Helfrich-Förster et al. 2001). Diese Phasenverschiebung entspricht einem Interkontinentalflug von Frankfurt nach New York, und die Innere Uhr eines Säugetieres, die nicht durch Cryptochrom direkt lichtempfindlich ist, braucht für diese Umstellung gut eine Woche.

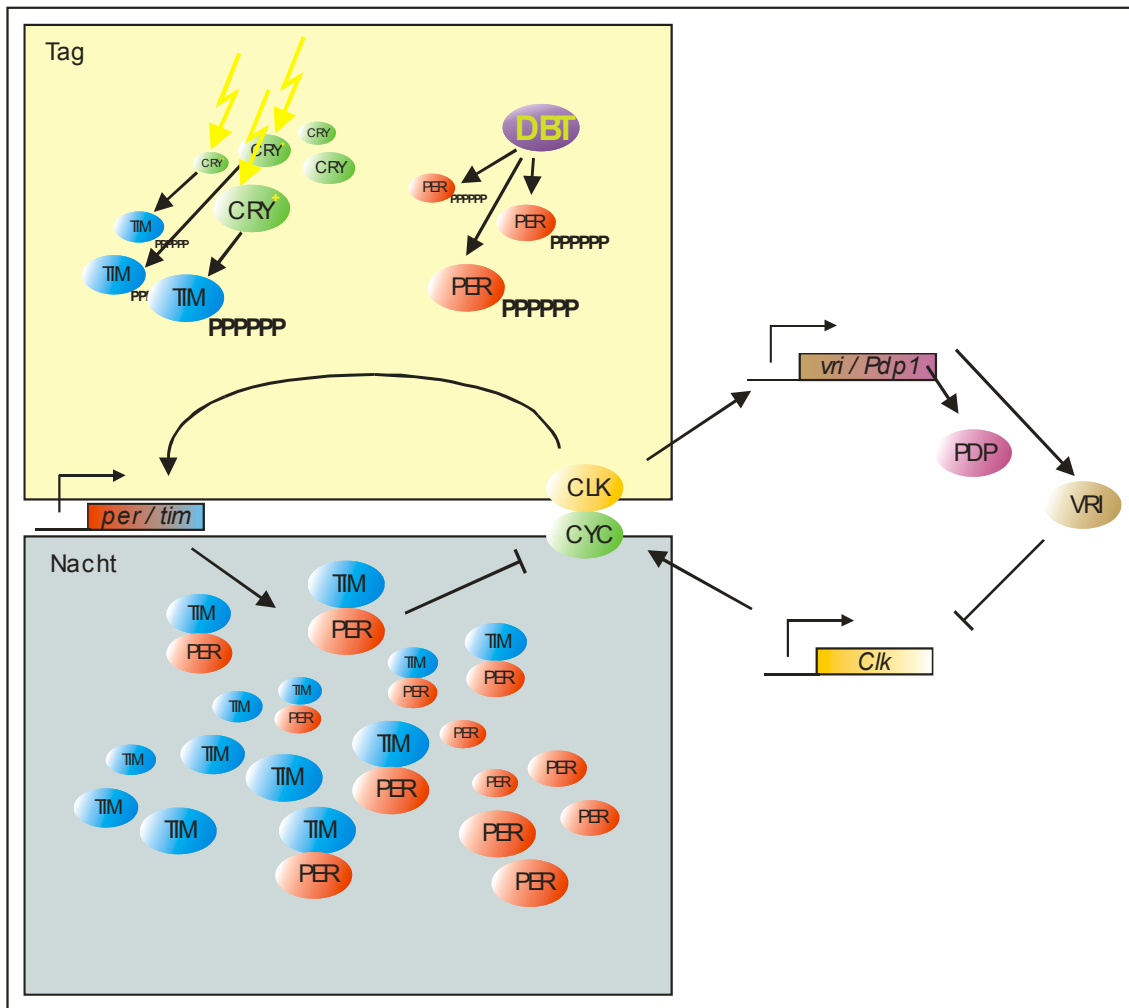


Abbildung 41: Molekulare Rückkopplungsschleifen bei Tag und Nacht. Der Focus der Darstellung liegt im Aufbau von TIM und PER. Am Tag werden PER und TIM, unter der Kontrolle des CLK/CYC-Komplexes, kontinuierlich gebildet; allerdings wird TIM durch den Einfluss von lichtaktiviertem Cryptochrom (CRY) ständig abgebaut. Dadurch kann auch PER nicht akkumulieren; es wird durch die Kinase Doubletime phosphoryliert und anschließend ebenfalls abgebaut. Die beiden Proteine reichern sich daher am Tag nicht an. In der Nacht wird TIM nicht mehr durch Interaktion mit Cryptochrom zerstört und akkumuliert nun. Es bildet gemeinsam mit PER einen Komplex, welcher wiederum PER vor der Kinase Doubletime schützt. Durch diesen Mechanismus findet die Synchronisation der molekularen Uhr auf Licht statt.

Wie ich in Teil 1: Verhalten der Arbeit bereits zeigen konnte, lässt sich *Drosophila* jedoch auch ohne Cryptochrom hervorragend synchronisieren. Allerdings entspricht die circadiane Empfindlichkeit der Fliege dann der eines Säugers. Ohne Cryptochrom braucht die Innere Uhr der Fliege etwa 7 Tage, um einer Phasenverschiebung des Lichts um 6 Stunden zu folgen (Helfrich-Förster et al., 2001). Die Synchronisation erfolgt nun durch die Komplexaugen, das H-B Äuglein, die Ocellen und das unbekannte Photopigment in den DN₃, wobei die Komplexaugen nach meinen Untersuchungen die wichtigste Rolle spielen. Will

man nun neben der Wirkung des Cryptochroms mehr über die Auswirkungen von Licht auf die circadianen Schrittmacher und vor allem auch über den Beitrag der anderen Photorezeptoren erfahren, so muss man zuerst die Funktion von Cryptochrom ausschalten. Dies ist am einfachsten mit *cry^b* Mutanten zu verwirklichen (siehe auch Teil 1). Nimmt man den circadianen Photorezeptor Cryptochrom aus dem System wirken sich alleine die verbliebenen photorezeptiven Eingänge der Inneren Uhr aus. Diese haben im Gegensatz zu Cryptochrom nicht die Fähigkeit, die molekulare Uhr durch Dauerbeleuchtung (LL) aus dem Gleichgewicht zu bringen und damit arrhythmisches Verhalten der Tiere zu verursachen. Damit eignet sich die *cry^b* Mutante ausgezeichnet für Dauerlicht-Experimente.

Wie in der allgemeinen Einleitung am Anfang meiner Arbeit bereits dargelegt, war eines meiner Ziele, das zwei-Oszillatoren-Modell von Pittendrigh und Daan an *Drosophila* näher zu testen. Grima et al. (2004) und Stoleru et al. (2004) hatten die Hypothese aufgestellt, dass bestimmte Untergruppen der Lateralen Neurone (die s-LN_v und die LN_d) als Morgen- und Abendoszillator fungieren. Sie hatten aber nicht gezeigt, dass diese beiden Gruppen unterschiedlich auf Licht reagieren. Eine wichtige Forderung von Pittendrigh und Daan (1976) war, dass der Morgenoszillator durch Licht beschleunigt wird während der Abendoszillator durch Licht verlangsamt wird. Auf diese Weise würde der Morgenoszillator in langen Sommertagen an den Morgen koppeln, während der Abendoszillator dem Abend folgen würde und so die Tiere während der entstehenden langen Mittagspause die Mittagshitze der Sommertage vermeiden könnten. Dass bei Fliegen die Phasen von Morgen- und Abendaktivität in Langtagen tatsächlich weiter auseinander liegen als in Kurztagen, konnte ich im Teil 1 meiner Arbeit zeigen. Eine weitere Konsequenz des Modells wäre allerdings, dass Morgen- und Abendoszillator unter Dauerlichtbedingungen mit verschiedenen Perioden freilaufen müssten. Dies wollte ich auf Verhaltens- und neuronaler Ebene an Wildtyp und *cry^b* Fliegen testen. Um zu sehen, welche Rolle die Komplexaugen beim Verhalten in Dauerlicht spielen, untersuchte ich zusätzlich augenlose *cry^b* Mutanten.

5.2 Material und Methoden 3

5.2.1 Fliegenstämme und Aufzeichnung der Laufaktivität

Ich verwendete eine rotäugige *cry^b* Mutante (+/+; *cry^b rec9ss*) (Stanewsky et al., 1998), die *cll^{eya}; cry^b* Doppelmutante (Rieger et al., 2003, siehe auch Teil 1: Verhalten, und Teil 2: Funktion) und den Wildtyp Stamm *Canton-S* für die Experimente. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den *cry^b* Mutanten und der *cll^{eya}; cry^b* Doppelmutante ist das Fehlen der Komplexaugen in den *cll^{eya}; cry^b* Fliegen. Die Fliegen wurden auf einem Standardmedium R (siehe Anhang) bei einer Temperatur von 20°C und einem 12 Stunden Licht-Dunkel Wechsel (LD12:12) herangezogen. Im Alter von ein bis drei Tagen wurden einzelne männliche Fliegen in die Aufzeichnungskammern überführt. Die Laufaktivität wurde wiederum Photoelektrisch bei einer Temperatur von 20°C aufgezeichnet. Halogenlampen dienten als Lichtquelle (Osram; Xenophot®), und die Lichtintensität wurde mit einem Dimmer auf 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ eingestellt. Die Aktivität wurde für 7 Tage im LD aufgezeichnet, danach wurden die Fliegen in LL mit derselben Lichtintensität wie im LD überführt. Um das Erscheinen der Morgenaktivität, welche gewöhnlich vor Licht-an auftritt, aber in der *cry^b* Mutante durch Dunkelheit unterdrückt wird (siehe Teil 1, Maskierung), besser zu sehen, wurde eine Gruppe der Fliegen während der Nacht einem schwachen Licht (0,25 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, was in etwa Vollmondlicht entspricht) und somit einem LM (Licht/Mondlicht) Zyklus ausgesetzt (Abb.49). Danach wurden sie ebenfalls wie die erste Gruppe in einen LL mit der Lichtintensität 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ überführt. Wildtypische *Canton-S* Fliegen wurden zusätzlich zu der LL Aufzeichnung bei 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ Lichtintensität bei LL mit der Mondlichtintensität von 0,25 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ aufgezeichnet, da bei der hohen Lichtintensität alle Fliegen sofort arrhythmisch wurden.

5.2.2 Datenanalyse

Um die Aktivitätsmuster zu bewerten, wurden die Rohdaten als Aktogramme (Doppelplots) dargestellt. Die Perioden im LL wurden mit der Sokolove-Bushell

Periodogrammanalyse ermittelt (Programm El Temps; Diez-Noguera, Barcelona, Spanien). Um das Verhalten aller *cry^b* Fliegen am Tag 1, 5, und 11 im LL aufzuzeigen, wurden gemittelte Aktivitätsprofile (\pm SE) dieser einzelnen Tage berechnet (beschrieben in Helfrich-Förster, 2000).

5.2.3 Immunhistochemie und Quantifizierung der Färbeintensität

Die Menge von PER und TIM wurde immunhistochemisch in den verschiedenen Schrittmacherneuronen bestimmt. Zur genauen Identifikation der Uhrneurone wurde die Immunfärbung zunächst zum Maximum von PER und TIM durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 10 Wildtypfliegen und 10 *cry^b* Mutanten eine Stunde vor Licht-an im LD abgesammelt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Menge an TIM und PER Protein in den Schrittmacherneuronen annähernd am höchsten (siehe Abb. 3). Um das Ausmaß der neuronalen Desynchronisation im LL zu messen, wurden jeweils 10 Wildtypfliegen und 10 *cry^b* Fliegen an vier verschiedenen Zeitpunkten im LL (Zeitpunkt a und b am ersten Tag in LL und Zeitpunkt c und d am fünften Tag in LL) abgesammelt (siehe Abb.42). Als zusätzliche Kontrolle wurden 10 augenlose *cl^{eya}*; *cry^b* Fliegen an ihrem Aktivitätsminimum und 10 Fliegen an ihrem Aktivitätsmaximum am fünften Tag in LL abgesammelt. An den verschiedenen Sammelzeitpunkten im LL wurden die Fliegen rasch durch Eintauchen in eine 4%ige Paraformaldehydlösung auf Phosphatpufferbasis (PP), welcher zusätzlich 0,5% Triton X-100 beigelegt war, getötet. Nach zwei Stunden Fixierung wurden die Fliegen dreimal für 15 Minuten in PP gespült und die Gehirne wurden als Totalpräparate entnommen. Nach dem Blocken über Nacht mit 5%igem Ziegenerum ("normal goat serum"= NGS) wurden dreifach Immunfärbungen an den Gehirnen durchgeführt. Als Antikörper kamen zum Einsatz: Kaninchen anti-PER Serum [Verdünnung 1:1000 (Stanewsky et al., 1997)], Ratte anti-TIM Serum [Verdünnung 1:1000 (Kaneko et al., 1997)], und der monoclonalen Mausantikörper nb33 (Verdünnung 1:100). Dieser erkennt den Precursor von PDF (pigment-dispersing factor) (Waltenspiel B, 2005) und somit die PDF-positiven Neurone (Veleri et al., 2003). Die Antikörperfärbung wurde für 48 Stunden bei 4°C vorgenommen. Nach fünfmaligem Spülen mit PP (0,5% Triton

X-100) wurden die folgenden sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper aufgebracht und über Nacht belassen: Alexa Fluor 488 (Ziege anti-Kaninchen), Alexa Fluor 568 (Ziege anti-Ratte) und Alexa Fluor 647 (Ziege anti-Maus), alle in einer Verdünnung von 1:200 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Die Dreifachfärbung (grüner Kanal, PER; roter Kanal, TIM; infraroter Kanal umgewandelt in blau, PDF) wurde durch ein konfokales Laserscan Mikroskop sichtbar gemacht (LSM 510 META; Zeiss, Jena, Deutschland). Um ein Durchstrahlen der jeweils anderen Kanäle zu verhindern, führte ich sequenzielles Scanning durch. Die in den Abbildungen dargestellten Bilder bestehen aus Überlagerungen mehrerer konfokaler Bildstapel.

Nach der Unterscheidung der verschiedenen Neuronen in den überlagerten Bildstapeln wurden Messungen der Färbeintensitäten an einzelnen optischen Schnitten durchgeführt. Diese Schnitte enthielten den Zellkern eines jeden einzelnen Neurons. Für die Messung wurden der grüne (PER) und der rote (TIM) konfokale Kanal getrennt voneinander in Graustufen umgewandelt. Die Graustufenbilder wurden in das Programm NIH Image J (Version 1.33u; Wayne Rasband, Freeware erhältlich unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) eingeladen, und für jedes Neuron wurde die mittlere Pixelintensität der PER und TIM Färbungen im Zytoplasma und im Zellkern gemessen, abhängig davon welcher Teil der Zelle stärker gefärbt war. Lediglich die Untergruppe 3 der dorsalen Neurone (DN₃) wurden als gesamte Gruppe gemessen, da diese Zellen zu klein und zahlreich waren, um sie einzeln zu messen (unter Verwendung des Zauberstabs des Plug-in Yaw 2D). Der Graustufen Bereich lag zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß). Für alle Neurone innerhalb einer Gruppe wurde eine mittlere Färbeintensität berechnet (für jede Hirnhälfte getrennt). Innerhalb der LN_d war eine Zelle durchgehend stärker gefärbt als die restlichen Zellen. Die Färbeintensität dieses einen Neurons wurde nicht mit den anderen verbleibenden Neuronen der Gruppe gemittelt sondern wurde separat als "extra LN_d" berechnet. Die Höhe der Hintergrundfärbung wurde im Umfeld jeder neuronalen Gruppe gemessen und von der mittleren Pixelintensität der gemessenen Zellen abgezogen. Ein Färbeindex für jede Zellgruppe wurde durch Multiplizieren der Färbeintensität (minus Hintergrund) mit der Anzahl der gefärbten Zellen und Dividieren durch die Anzahl der maximal gefärbten Zellen

innerhalb des gefärbten Clusters ermittelt. Die maximale Anzahl der Zellen für jede Zellgruppe war wie folgt: PDF-positive s-LN_v, 4; PDF-negative s-LN_v, 1; große (l)-LN_v, 5; extra LN_d, 1; restliche LN_d, 6; DN₁, 17; DN₂, 2; und DN₃, 40.

5.2.4 Statistik

Die Färbeindizes wurden auf den signifikanten Einfluss des Stammes oder des Zeitpunkts durch die Verwendung der „two-way“ ANOVA getestet. Ein anschließender *post hoc* Test mit Bonferroni Anpassung wurde für den paarweisen Vergleich der Färbeintensitäten vorgenommen (Systat 10; SPSS, Cicago, IL). Die Werte wurden bei einem p Wert von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

5.3 Ergebnisse 3

5.3.1 Aktivitätsrhythmus

Der Aktivitätsrhythmus von 20 Wildtypfliegen, 40 *cry^b* Mutanten und 33 *cll^{eya}*; *cry^b* Doppelmutanten wurde für 7 Tage im LD und anschließend für drei Wochen im LL (Lichtintensität 500µW/cm²) aufgezeichnet. Im LD zeigten alle Fliegen das typische bimodale Aktivitätsmuster bestehend aus Morgen- und Abendaktivität (siehe Abb. 42 und 43). Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen war die Menge der Morgenaktivität geringer als die der Abendaktivität. Nach dem Transfer in Dauerlicht (LL) wurden alle Wildtypfliegen sofort arrhythmisch, die Doppelmutante *cll^{eya}*; *cry^b* blieb unter diesen Bedingungen rhythmisch und zeigte Aktivität im Freilauf mit einer Periode nahe bei 24 Stunden (Tabelle 4, Abb. 43).

Tabelle 4: Rhythmik und Aktivitätsmuster von Wildtyp Fliegen und *cry^b* Mutanten im LL

Genotyp Lichtstärke	n	arrhythmisch	eine rhythmische Komponente	tau(h)	zwei rhythmische Komponente	tau ₁ (h)	tau ₂ (h)	komplette Über- kreuzung	tau(h) ohne Kreuzung
WT/LL (500µW/cm ²)	16	16(100%)							
WT/LL (0,25µW/cm ²)	23	1(4%)	7(30%)	27,3 ±0,18	15(65%)	27,3 ±0,13	28,2 ±0,31	7(47%)	27,5 ±0,35
<i>cry^b</i> /LL (500µW/cm ²)	40	0(0%)			40(100%)	22,5 ±0,04	25,2 ±0,05	21(53%)	23,5 ±0,03
<i>cll^{eya}</i> ; <i>cry^b</i> /LL (500µW/cm ²)	33	0(0%)	33(100%)	23,8 ±0,08					

In der Mehrheit der *cry^b* Mutanten wurde die Morgenaktivität nach dem Transfer in Dauerlicht (LL) unsichtbar (Abb. 42). Die Aktivität änderte sich also von einer bimodalen zu einer unimodalen Form mit einer Hauptaktivität die mit der Abendaktivität in Übereinstimmung lag. Das gleiche Verhalten ist typisch für Wildtypfliegen, die in Dauerdunkel (DD) überführt werden, was jedoch nicht heißt dass der mögliche Morgenoszillator seine Aktivität verliert (Helfrich-Förster, 2001). Für mehr Klarheit will ich nun das Augenmerk auf die deutlich sichtbare Abendaktivität legen und später noch einmal auf die Morgenaktivität zurückkommen. Nach ein paar Tagen in LL zeigte die Abendaktivität interne

Desynchronisation in zwei Aktivitätskomponenten mit jeweils einer kurzen und einer langen Periode (Abb. 42).

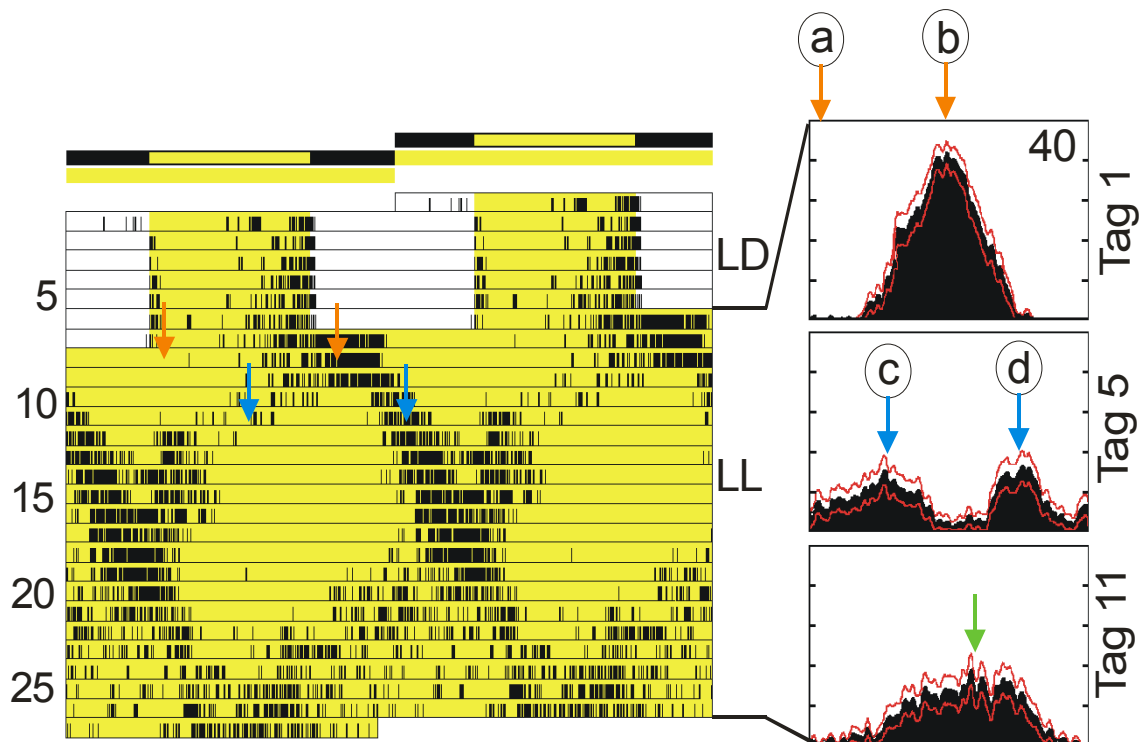


Abbildung 42: Interne Desynchronisation in der *cryptochrom^{baby}* Mutante. Gezeigt ist das Aktogramm einer typischen *cry^b* Mutante, diese wurde für 7 Tage im LD aufgezeichnet und anschließend für weitere 20 Tage im LL. Das Lichtprogramm ist durch die farbigen Balken dargestellt. Die Lichtintensität betrug $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Das Aktogramm ist als Doppelplot aufgetragen und zeigt im LL zwei Freilaufkomponenten, eine mit einer kurzen Periode ($\tau \sim 22\text{h}$) und eine längere Periode ($\tau \sim 25$). Am ersten Tag im LL (T1) waren die beiden Rhythmen in Phase und der ermittelte Durchschnittstag (\pm SE) aus 40 Fliegen zeigte ein einzelnes Aktivitätsmaxima (oben rechts). Am fünften Tag im LL (T5) waren die kurze und die lange Aktivitätsperiode 12 Stunden außer Phase, diese sind auch deutlich im berechneten Durchschnittstag (Mitte rechts) zu sehen. Am elften Tag im LL überkreuzten sich die Aktivitätskomponenten wieder und bildeten so wieder ein Aktivitätsmaxima im Durchschnittstag ab (unten rechts). Für die immunhistologische Untersuchung wurden die Fliegen am Tag 1 und 5 zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten fixiert.

Für die Häufigkeit der internen Desynchronisation konnte früher schon ein positiver Zusammenhang mit der Lichtstärke hergestellt werden, ebenso wurde die Periode der kurzen Komponente mit ansteigender Lichtintensität kürzer und die der langen Komponente länger (Yoshii et al., 2004). Beide Ergebnisse zeigen, dass die interne Desynchronisation graduell mit der Lichtintensität ansteigt. In meinem Experiment zeigten alle 40 Fliegen interne Desynchronisation und liefen mit kurzperiodischer Komponente (im Mittel 22,5 Stunden) und einer langperiodischen Komponente (im Mittel 25,2 Stunden) frei (Tabelle 4). Dies steht in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die

Yoshii et al. (2004) bei den entsprechenden Lichtintensitäten beobachtet hat. Am 5. Tag in Dauerlicht sind beide Komponenten genau 12 Stunden außer Phase und am 11. Tag sind sie wieder in Phase. Dieses Verhalten hat in allen Fliegen einen sehr ähnlichen Zeitverlauf und man kann dies in den mittleren Aktivitätsprofilen aller 40 Fliegen am Tag 1,5 und 11 gut sehen (Abb. 42). Bei der Hälfte der Fliegen trennten sich die Komponenten komplett wieder, nachdem sie am Tag 11 zusammengetroffen waren, in der anderen Hälfte der Tiere blieben die Komponenten gekoppelt und zeigten eine intermediäre Periode mit einer Länge von 23,5 Stunden. Die intermediäre Periode war deutlich näher an der Periode der kurzen Komponente als an der der langen.

Die augenlosen *cl^{eya}*; *cry^b* Fliegen wurden getestet, um die für die Verkürzung und Verlängerung der Periode in Dauerlicht verantwortlichen Photorezeptoren zu identifizieren. Die hierfür verantwortliche Struktur bilden höchstwahrscheinlich die Komplexaugen, da sie für die zeitliche Anpassung der Morgenaktivität und der Abendaktivität an langen Sommertagen und kurzen Wintertagen notwendig sind (siehe Teil 1: Verhalten). Wie bereits erwähnt ist dies eine zentrale Aufgabe des Morgen- und des Abendszillators. Tatsächlich zeigte keine der 16 *cl^{eya}*; *cry^b* Doppelmutanten interne Desynchronisation und alle waren mit einer wildtypischen Periode im Freilauf (Abb. 43). Dies zeigt, dass die Komplexaugen die Photorezeptoren enthalten, welche die Lichtinformation zu den mutmaßlichen Morgen- und Abend Oszillatoren vermitteln, und so in den einen zu einer Periodenverkürzung und in den anderen zu einer Periodenverlängerung führen. Um sicher zu gehen, dass die beobachtete interne Desynchronisation nicht eine Besonderheit der *cry^b* Mutante ist, untersuchte ich ebenfalls das Verhalten von 23 Wildtypfliegen in Dauerlicht mit einer sehr geringen Lichtintensität ($0,25 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Unter diesen Bedingungen wurde nur eine Fliege arrhythmisch, 7 Fliegen waren mit einer sehr langen Periode (27 Stunden) im Freilauf und 15 Fliegen zeigten zwei Freilaufperioden; eine mit einer mittleren Länge von 23,7 Stunden die zweite von 28,2 Stunden (Abb. 43). Die kurzperiodische Komponente war nicht so deutlich wie in den *cry^b* Mutanten, sie konnte aber in allen Aktogrammen für mindestens drei Tage gesehen werden. Ich folgerte daraus, dass die Fähigkeit durch Licht interne Desynchronisation und die Aufspaltung in zwei

Aktivitätskomponenten zu zeigen, eine generelle Funktion der Inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* ist.

Wildtyp

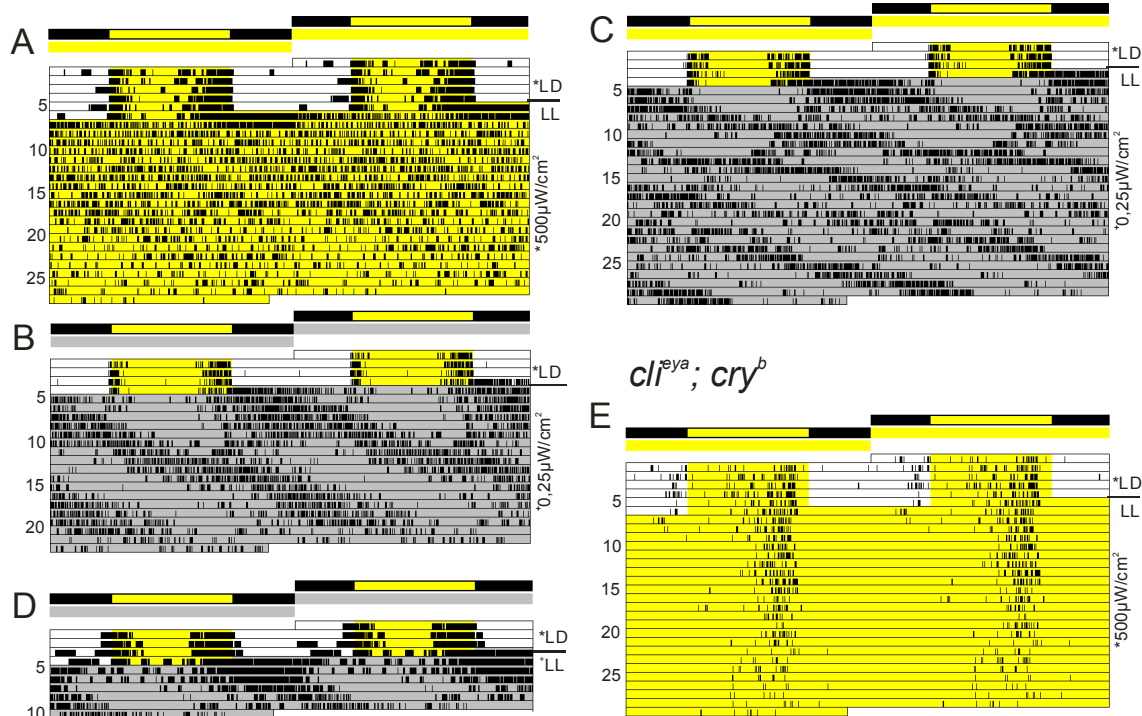


Abbildung 43: Aktogramme von Wildtypfliegen in Dauerlicht und konstantem Schwachlicht. Konstantes Schwachlicht erzeugt in Wildtyp Fliegen Arrhythmie und/ oder Desynchronisation. Hier sind die Aktogramme von vier wildtypischen Fliegen (A-D) und einer *cli^{eya}; cry^b* Mutante (E) gezeigt. Die Fliegen wurden zuerst unter LD Bedingungen und anschließend unter Dauerlichtbedingungen (LL) aufgezeichnet. Das Lichtprogramm ist durch die farbigen Balken dargestellt. Die Aktogramme sind zur besseren Übersicht als Doppelplots aufgetragen. Die Lichtintensität während des LD betrug bei allen Fliegen $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$. In LL wurde bei der *cli^{eya}; cry^b* Fliege (E) und der wildtypischen Fliege (A) die Lichtintensität bei $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ belassen; bei allen anderen wildtypischen Fliegen wurde die Lichtintensität auf $0,25\mu\text{W}/\text{cm}^2$ reduziert. Bei der Dauerbeleuchtung mit $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ starkem Licht wurde die wildtypische Fliege sofort arrhythmisch (A), die *cli^{eya}; cry^b* Fliege dagegen blieb rhythmisch (E). Bei der Dauerbeleuchtung mit der Lichtstärke von $0,25\mu\text{W}/\text{cm}^2$ zeigten die wildtypischen Fliegen interne Desynchronisation, die Aktivität teilte sich in zwei Freilaufkomponenten auf. Eine mit einer kurzen Periode, die andere mit einer längeren (siehe Tabelle 4). Das Verhalten der Freilaufperioden variierte, so zeigte sich zum Beispiel bei der der wildtypischen Fliege im Aktogramm B, dass sich die Freilaufkomponenten nach der ersten Überkreuzung aneinander koppelten und mit der langen Periode weiter frei liefen. Im Aktogramm C einer wildtypischen Fliege überkreuzten sich die Freilaufperioden mehrmals ohne sich zu beeinflussen. Bei den Aktogrammen B und D scheint die kurze Freilaufperiode von der Morgenaktivität zu stammen.

Wie in den *cry^b* Mutanten zeigte die Hälfte der Wildtypfliegen ein vollständiges Überschneiden der Aktivitätskomponenten (Abb. 43C), während in der anderen Hälfte die Komponenten aneinander koppelten und die Aktivität dann mit einer intermediären Periode weitergeführt wurde (Abb. 43B). Zu beachten ist, dass eine Fliege eine sehr ausgeprägte Morgenaktivität im LD zeigte (Abb. 43D). Bei

dieser Fliege schien die kurze Komponente von der Morgenaktivität auszugehen. Unglücklicherweise verstarb dieser Fliege am Tag 10, so dass ich das weitere Verhalten nicht beobachten konnte.

5.3.2 Charakterisierung der unterschiedlichen Gruppen von Uhrneuronen

Wie bereits dargestellt besitzt *Drosophila melanogaster* sechs Gruppen circadianer Schrittmacherzellen: drei Gruppen lateraler Neurone (die s-LN_v, l-LN_v und die LN_d) und drei Gruppen dorsaler Neurone (die DN₁, DN₂, und DN₃). Die Gruppe der s-LN_v kann weiterhin in vier Zellen unterteilt werden in denen PDF gebildet wird und in eine Zelle die kein PDF enthält und als die fünfte s-LN_v bekannt ist (Kaneko et al., 1997).

Ziel war es diese Schrittmacherzellen eindeutig voneinander zu unterscheiden. In einer ähnlichen Studie (Yoshii et al; 2004) gelang diese Unterscheidung aus technischen Gründen nicht. In der Studie wurden Horizontalschnitte von anti-PER gefärbten Gehirnen durchgeführt. Da die großen ventralen lateralen Neurone (l-LN_v) und die dorsalen lateralen Neurone (LN_d) in ihrer Lage überlappen können, sind sie in horizontalen Schnitten nahezu nicht voneinander zu trennen. Die 5. s-LN_v kann ohne Doppelmarkierung mit anti-PDH und zum Beispiel anti PER nicht von den l-LN_v unterschieden werden zwischen denen sie oft liegt (siehe Tabelle 5). Die Schrittmacherzellen sollten auch hinsichtlich ihrer zytoplasmatischen oder nukleären PER und TIM Färbungen unterschieden werden. Dieser Punkt scheint trivial doch es zeigt sich, dass die beiden Proteine immer wieder nahe an der Kernmembran lokalisiert waren, was es äußerst schwierig machte zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Färbung zu unterscheiden. Generell definierte ich die Färbung als nukleär wenn substantielle Teile des Kerns ebenfalls gefärbt waren und als zytoplasmatisch, wenn in diesen Bereichen keine Färbung vorhanden war. Um die Identität der einzelnen Uhrneurone bestimmen zu können, führte ich Dreifachfärbungen mit den Antikörpern gegen die Uhrproteine PER und TIM sowie gegen das Neuropeptid PDF zu einem Zeitpunkt durch, zu dem die Konzentration der Proteine PER und TIM nahezu am höchsten ist (eine Stunde vor Licht-an im LD). Um sicher zu gehen, dass es zwischen den sekundären

Antikörper gegen Ratte und Maus keine Kreuzreaktion gibt, applizierte ich beide sekundäre Antiseren auf Gehirne, die entweder nur mit dem Maus anti-nb33 Antikörpern oder mit dem Ratte anti-TIM Antikörper markiert waren. Ich fand keine Kreuzreaktion des sekundären Ziege-anti-Maus Antikörpers mit dem Ratte-anti-TIM Antikörper, aber es zeigte sich eine schwache Kreuzreaktion des sekundären Ziege-anti-Ratte Antikörpers mit dem nb33 Antikörpern aus der Maus. Diese Kreuzreaktion beschränkte sich auf das Zytoplasma der I-LN_v. Diese enthalten eine sehr hohe Menge an PDF und waren daher sehr stark durch den nb33 Antikörpern markiert. Alle anderen PDF positiven Strukturen wie zum Beispiel die stark markierten Verzweigungen der I-LN_v, wie auch die Verzweigungen der s-LN_v waren nicht durch den sekundären anti-Ratte Antikörper markiert. Daraus schloß ich, dass die sekundären Antikörper ausreichend spezifisch für meine Zwecke waren, schloß aber trotzdem die TIM Färbung des Zytoplasmas der I-LN_v von weiteren Analysen aus. Die anti-PDF Markierung war für die Unterscheidung der PDF positiven s-LN_v und I-LN_v (Helfrich-Förster, 1995; Renn et al., 1999) von den LN_d und der fünften PDF negativen s-LN_v notwendig. Die 5. s-LN_v wurde bisher nur in der Larve beschrieben, da sie hier sehr leicht von den anderen larvalen Uhrneuronen unterschieden werden kann (Kaneko et al., 1997). Während der Metamorphose beginnen die Gliazellen ebenfalls die Uhrproteine zu exprimieren, und da viele PER positive Gliazellen in enger Nachbarschaft zu den LN Zellen gefunden werden, ist es in adulten Fliegen schwer unter ihnen die 5. s-LN_v zu finden. Interessanterweise fand ich nur eine schwache Färbung von PER und TIM in den Gliazellen und konnte daher eindeutig eine gegen PER und TIM positiv gefärbte aber PDF negative Zelle zwischen den I-LN_v sehen. Ich betrachtete diese Zelle als die 5. PDF negative s-LN_v. Dieses Neuron war nicht zwischen den vier PDF positiven s-LN_v gelegen, sondern lag zwischen den mehr anterior positionierten vier bis fünf PDF positiven I-LN_v. Abhängig von der Position der I-LN_v in der dorsoventralen Achse lag die 5. s-LN_v zwischen ihnen, dorsal von ihnen oder ein wenig ventral zu ihnen.

Die I-LN_v waren die Zellen mit der variabelsten Position. In nahezu der Hälfte der Gehirnhemisphären war zumindest eine der I-LN_v dorsal verlagert und zwischen den LN_d zu finden (Tabelle 5; siehe Abb. 45A-D). In zwei

Gehirnhälften (von unterschiedlichen Wildtypfliegen) waren drei von vier gefärbten I-LN_v nicht nur dorsal sondern zusätzlich noch in posteriorer Richtung verlagert. Die Zellen befanden sich auf der posterioren Oberfläche des Gehirns statt auf der anterioren. In einer Gehirnhälfte einer *cry^b* Fliege waren alle vier I-LN_v ventral verlagert. Dies war der einzige Fall in dem ich eine ventrale Verlagerung der I-LN_v fand. Die Position der LN_d war die zweitvariabelste. In 20-30% der Gehirnhälften waren sie dorsal zwischen die DN₃ verlagert. Die s-LN_v besaßen die konstanteste Position, aber auch hier fand ich bei 5 - 10% der Gehirnhälften eine bis drei s-LN_v in eine dorsale Position verlagert. Die *Chi²* Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied in Verlagerung der Zellgruppen zwischen Wildtypfliegen und *cry^b* Fliegen. Zusätzlich zur variablen Position waren die LN_d zu unterschiedlichen Graden mit PER und TIM Antikörper gefärbt. In 65% der Gehirne war eine LN_d sehr viel stärker gefärbt als die anderen. Dieses einzelne Neuron zeichnete sich durch einen etwas größeren Kern und etwas mehr Zytoplasma im Vergleich zu den restlichen LN_d aus. Diese Zelle soll im Weiteren als extra LN_d bezeichnet werden.

Tabelle 5: Position der 5. s-LN_v und Verschiebungen der Lage der restlichen Lateralen Neurone (I-LN_v, LN_d und s-LN_v)

		Lage der 5. s-LN _v		
Genotyp	n	zwischen den I-LN _v	leicht dorsal von den I-LN _v	leicht ventral von den I-LN _v
WT	20	10 (50%)	7(35%)	3(15%)
<i>cry^b</i>	20	9(45%)	9(45%)	2(10%)
		$\chi^2=0,50;p=0,78^*$		
		Hirnhemisphären mit Verschiebungen der		
Genotyp	n	I-LN _v	LN _d	s-LN _v
WT	20	9(45%)	6(30%)	1(5%)
<i>cry^b</i>	20	8(40%)	4(20%)	2(10%)
		$\chi^2=0,16;p=0,92^*$		

* zwischen dem Wildtyp und der *cry^b* Mutante wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Lage der lateralen Neurone.

Bei den DN Zellgruppen behielten die zwei DN₂ am konstantesten ihre Position bei und waren sehr einfach zu identifizieren, da sie immer mit den Terminalen der PDF positivsten s-LN_v assoziiert waren. Die DN₁ waren schwerer zu charakterisieren. Sie bestanden aus bis zu 17 Zeilen mit sehr variablen Positionen; in etwa der Hälfte der Fälle bildeten sie ein Cluster und in der

anderen Hälfte waren sie mehr im dorsalen Gehirn verteilt. Die Färbeintensität innerhalb der DN₁ war sehr variabel. Etwa die Hälfte der DN₁ Zellen war stark durch anti-PER und anti-TIM gefärbt, wohingegen die andere Hälfte nur schwach markiert war. Mit bis zu 40 Zellen war das Cluster der DN₃ die größte Gruppe. Die große Mehrheit dieser Neurone war ziemlich klein, aber in etwa einem Drittel der Fälle fand ich bis zu fünf größere Neurone in einer etwas lateralen Position. Diese Zellen waren eindeutig verschieden zu den dorsal verlagerten LN_d.

Zusammengefasst kann ich sagen, dass die LN_d, die DN₁ und die DN₃ keine homogenen Gruppen von Neuronen repräsentieren und dass dieser Tatsache bei der Studie Beachtung geschenkt werden muss. Gleiche Beobachtungen wurden in der Studie von Shafer et al. (2006) gemacht.

Zu Abbildung 44 (nächste Seite): Die dorsalen Neurone von *cry^b* Mutanten. Markierung der Neurone mit anti-PER (grün), anti-TIM (rot) und anti-PDH (blau). Die Fixierung der Fliegen erfolgte eine Stunde vor Licht-an in einem LD-Zyklus (A-C) und am fünften Tag im LL (D, E) zum Zeitpunkt c (siehe Abb. XX). Eine Stunde vor Licht-an befindet sich PER und TIM im Kern der meisten dorsalen Neurone (DN₁, DN₂ und DN₃) mit Ausnahme weniger DN₃ Neurone (Pfeil in A). Die DN₁ bestehen aus bis zu 17 Zellen die eine unterschiedliche Intensität in der PER und TIM Markierung zeigten. Etwa die Hälfte der Zellen war schwach gefärbt während die andere Hälfte stark angefärbt war (B, C). Die 2 DN₂ Zellen waren immer in nächster Nähe zu den Verzweigungen der s-LN_v (blau) und zeigten eine ziemlich schwache TIM Färbung. Am fünften Tag im LL war die TIM Markierung in allen dorsalen Neuronen schwach und auf das Zytoplasma der Zellen begrenzt (D, E). In manchen DN₁ war PER im Kern lokalisiert, in anderen im Zytoplasma. Zu beachten ist, dass in zwei DN₁ Neuronen PER im Nukleus gefunden wurde, obwohl die Zellen keinerlei TIM Markierung zeigten (Pfeile in D). Bild A besteht aus 12 konfokalen Schnitten mit einer Dicke von 5µm. Bei B bis E sind fünf konfokale Schnitte mit einer Stärke von 2µm überlagert. Alle Bilder besitzen dieselbe Vergrößerung. Der Meßbalken entspricht 20µm.

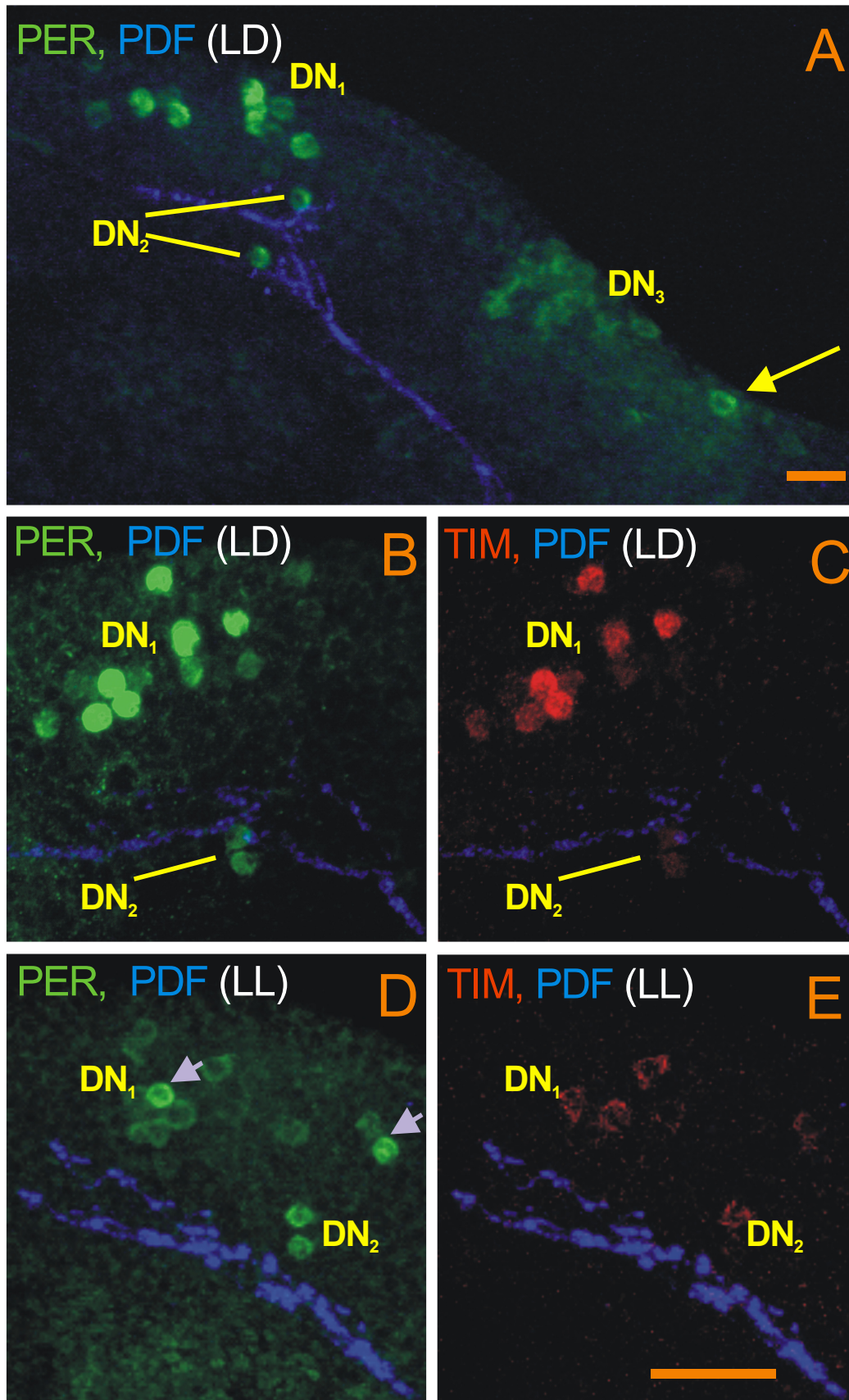


Abb. 44: Text siehe vorherige Seite

5.3.3 Intrazelluläre Lage von PER und TIM

Wie erwartet fand ich PER und TIM eine Stunde vor Licht-an im LD hauptsächlich im Kern. Die Proteine waren nicht einheitlich im Kern verteilt, sondern waren auf bestimmte Kompartimente begrenzt. Unmarkierte Stellen innerhalb des Kerns könnten hierbei mit dem Ort des Nukleolus übereinstimmen. Die stärkste PER Immunfärbung wurde an der Grenze des Kerns nahe an der Kernmembran gefunden (Abb. 45). TIM zeigte eine ähnliche Verteilung, jedoch war die stärkste TIM Immunfärbung leicht lateral zu der PER Immunfärbung, was bedeutet das TIM einen Ring um die Kernmembran bildet und zumindest teilweise auf der zytoplasmatischen Seite verbleibt, während PER hauptsächlich innerhalb des Kerns zu finden ist (Abb. 45). Dies traf für alle Uhrneurone zu, wird in Abbildung 44 aber exemplarisch nur für die Gruppen der lateralen Neurone gezeigt. Da PDF komplett im Zytoplasma verbleibt, dient es als vorzügliche Markierung für das Zytoplasma in den s-LN_v und l-LN_v. Die l-LN_v zeigen eine größere zytoplasmatische Region als die s-LN_v, die nur eine geringe Menge an Zytoplasma um den Kern herum besitzen. Das Zytoplasma der PDF-negativen fünften s-LN_v, die immer in Nachbarschaft zu den l-LN_v gefunden wurde war wesentlich schwerer zu bewerten, schien aber gleich dem der s-LN_v zu sein (Abb. 44H-K).

Zu Abbildung 45 (nächste Seite): PER, TIM und PDF Expression in den lateralen Neuronen von wildtypischen Fliegen. A-C, E-G, H-K und L-O zeigen denselben optischen Schnitt. Die Gehirne wurden im LD eine Stunde vor Licht-an fixiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich PER und TIM deutlich im Kern aller lateralen Neurone: den LN_d (E-G), den l-LN_v (H-K), der 5. s-LN_v (Pfeil in A-D, H-K) und den s-LN_v (L-O). Die stärkste PER und TIM Markierung wurde nahe der Kernmembran gefunden, wobei TIM auch immer etwas außerhalb von PER zu finden war (Pfeile in G und O). PDF fand sich ausschließlich im Zytoplasma der l-LN_v (J) und s-LN_v (N) sowie in deren Verzweigungen (wie zum Beispiel dem Netzwerk auf der Medulla in D). Zu beachten ist, dass der Kern aller lateralen Neurone von mehr oder weniger gleicher Größe ist. Das Zytoplasma der l-LN_v war jedoch deutlich größer. Die 5. s-LN_v konnte durch das Fehlen von PDF von den anderen Zellen unterschieden werden. Diese Zelle liegt zwischen den l-LN_v (A-D, H-K). Die LN_d sind gewöhnlich um den vorderen optischen Trakt gruppiert (voT; E-G) und zwar an der Stelle an der dieser in das Zentralgehirn mündet. Eine Zelle der LN_d war meist stärker gefärbt als die anderen und erschien etwas größer (Pfeil A-C, E-G). Im in D gezeigten Gehirn waren die LN_d in Richtung der DN₃ dorsal verschoben (die DN₃ sind hier nicht in der Focusebene). Weiterhin waren zwei der l-LN_v und drei der s-LN_v in Richtung der normalen Position der LN_d verschoben. In A-C, war eine l-LN_v in Richtung der LN_d verschoben. Zu beachten ist, dass die extra LN_d (Pfeil), die 5. s-LN_v und die PDF positiven s-LN_v die Zellen sind die am stärksten mit anti PER gefärbt sind (A). In den Bildern A-D wurden zehn 5µm dicke konfokalen Schnitte überlagert, E-O bestehen aus Überlagerungen von fünf 1µm dicken Schnitten A-D und E-O stellen die gleich Vergrößerung dar, Messbalken entspricht 20µm.

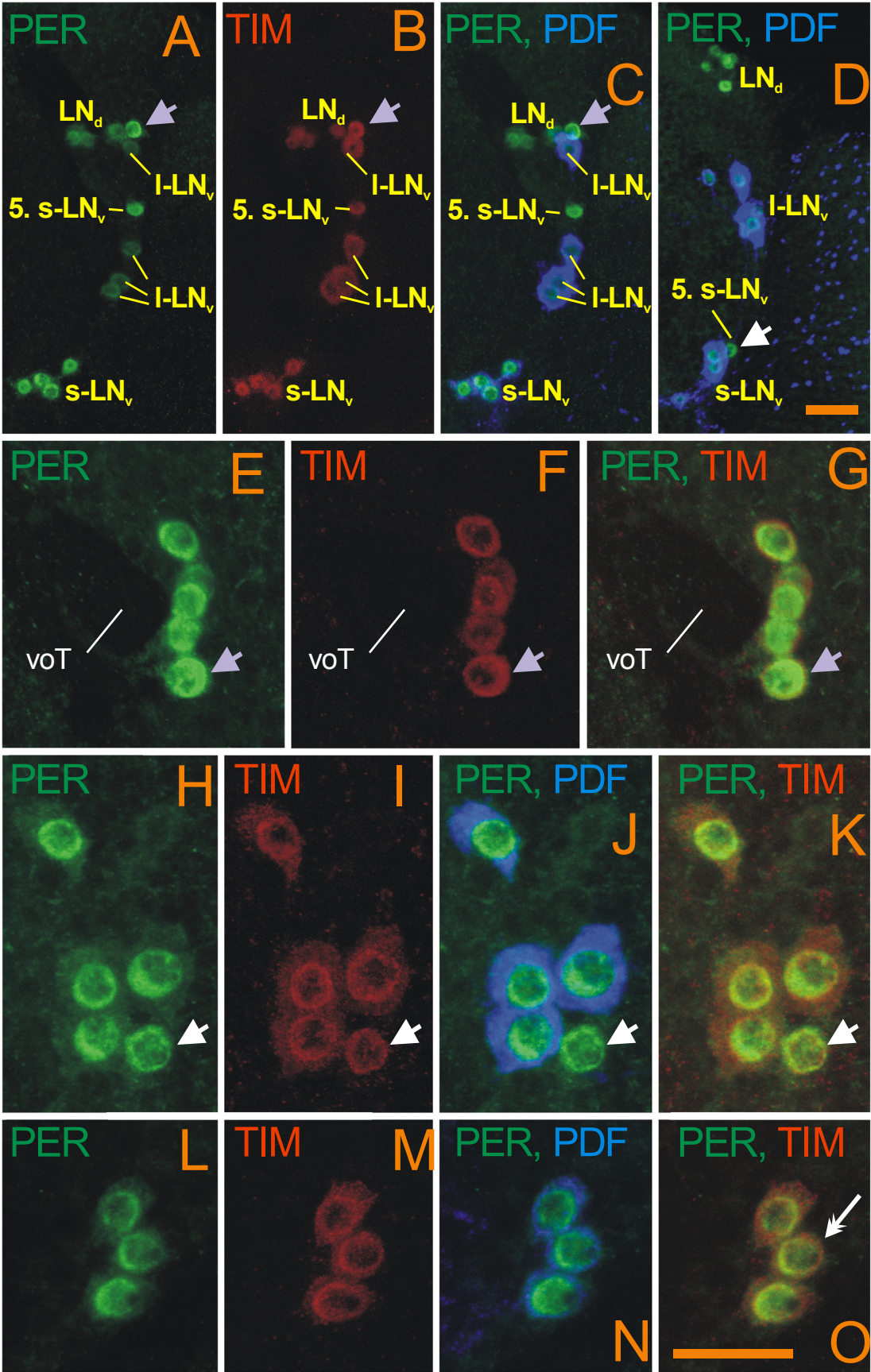


Abb. 45. Text siehe vorige Seite

5.3.4 Rhythmus der Uhrproteine im Dauerlicht (LL)

Nachdem ich sicher war, die unterschiedliche Gruppen von Uhrneuronen eindeutig unterscheiden zu können, prüfte ich, ob der molekulare Ablauf der einzelnen Schrittmacherneurone nach einigen Tagen im Dauerlicht (LL) in einer Art und Weise intern desynchronisiert wie es in der Aktivitätsrhythmik der Fall war. Im Unterschied zu dem bimodalen Aktivitätsmuster im LD zeigen wildtypische Fliegen einen unimodalen Rhythmus in der Anreicherung der Uhrproteine. Die Menge von PER und TIM ist ungefähr drei Stunden vor Lichtan am höchsten und 12 Stunden später am niedrigsten, was mittels Westernblot von Kopfextrakten gezeigt werden konnte (Marrus et al., 1996). Dies bedeutet das das PER und TIM Protein ihren höchsten Gehalt zum Zeitpunkt der Morgenaktivität haben und den niedrigsten Gehalt zum Zeitpunkt der Abendaktivität. Die Periode von PER und TIM in den Uhrneuronen wurde durch zahlreiche Forschungen immunhistochemisch nachgewiesen (Zerr et al., 1990; Shafer et al., 2002). Diese Studien zeigten keine bedeutenden Phasendifferenzen zwischen den unterschiedlichen neuronalen Gruppen. Die Periodik aller Neurone erschien mehr oder weniger in derselben Phase und die geringste Menge der Uhrproteine zeigte sich zur Hauptaktivität der Fliegen, der Abendaktivität. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls für die *cry^b* Mutante, allerdings war die Amplitude der Proteinmenge in den LN_d, I-LN_v und DN₂ reduziert (Helfrich-Förster et al., 2001; Yoshii et al., 2004). Ich erwartete nun, dass alle Uhrneurone am ersten Tag im Dauerlicht (LL) in derselben Phase waren, wohingegen sie nach einigen Tagen im Dauerlicht, durch den Zustand der internen Desynchronisation, außer Phase liegen sollten. Dies sollte bei Wildtypfliegen und *cry^b* Mutanten gleichermaßen geschehen. Es war jedoch bei der *cry^b* Mutante am einfachsten zu untersuchen, da hier bei allen Fliegen die Aktivitätskomponenten am ersten Tag im LL in Phase waren, fünf Tage später aber 12 Stunden außer Phase.

Um das periodische Verhalten der molekularen Inneren Uhr aufzudecken führte ich dreifach Markierungen mit anti-PER, anti-TIM und anti-PDF zu vier verschiedenen wichtigen Zeitpunkten durch: (1) am Hochpunkt und am Tiefpunkt der Hauptaktivität am Tag 1 an dem beide Komponenten in Phase

waren und (2) am Tag 5 zum Hochpunkt beider Komponenten als diese 180° außer Phase waren. Bei den Wildtyp Kontrollfliegen war der Gehalt von PER und TIM Protein in den Uhrneuronen bereits am ersten Tag im Dauerlicht sehr niedrig und am Tag 5 fand sich keine Färbung mehr. Diese Ergebnisse stehen gut in Übereinstimmung mit dem arrhythmischen Verhalten der Fliegen im Dauerlicht bei 500µW/cm². Bei den *cry^b* Mutanten blieb die periodische Anreicherung von PER und TIM in den s-LN_v und LN_d erhalten (Yoshii et al., 2004). Am ersten Tag fand ich eine starke Immunfärbung zum Tiefpunkt der Abendaktivität und eine schwache Immunfärbung an seinem Hochpunkt, was sehr gut mit den Ergebnissen vorheriger Studien zusammenpasst (Yoshii et al., 2004; Abb. 46). Hoch signifikante Anreicherung der Uhrproteine wurde in der 5. s-LN_v, den PDF positiven s-LN_v und der extra LN_d gefunden. Die extra LN_d war nun in 95% der Gehirne als besonders stark gefärbt wahrnehmbar. Die Uhrproteine waren zum Tiefpunkt der Abendaktivität nukleär und an seinem Hochpunkt zytoplasmatisch, was zeigt, dass sie nicht nur eine Oszillation in der Anreicherung zeigen sondern auch in ihrer subzellulären Lokalisation (Abb. 46). Das gleiche Ergebnis wurde bereits für Wildtypfliegen in Dauerdunkelbedingungen (DD) gezeigt (Shafer et al., 2002). Zwischen den PER Protein- und TIM Proteinmenge in den s-LN_v zeigten sich Abweichungen. Obwohl der Unterschied in der PER Färbung zu den zwei Zeitpunkten einen hoch signifikanten Unterschied zeigte ($p < 0,001$), war die TIM Färbung zu diesen Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich in den s-LN_v (Abb. 46). Trotzdem war TIM zum Zeitpunkt der stärksten PER Färbung im Nukleus und zur schwächsten PER Färbung im Zytoplasma. Es zeigt sich also das TIM deutlich periodisch zwischen den subzellulären Bereichen in den PDF positiven s-LN_v wechselt. Dasselbe galt für die verbleibenden LN_d und für die DN₂. Auch hier gab es periodische Wechsel der subzellulären Lokalisation, jedoch stellten sich die beobachteten Unterschiede in der Färbeintensität in einem *post hoc* Test mit Bonnferroni Anpassung als nicht signifikant dar. Die l-LN_v, DN₁ und DN₃ zeigten insgesamt ähnliche Färbeintensitäten zu beiden Zeitpunkten.

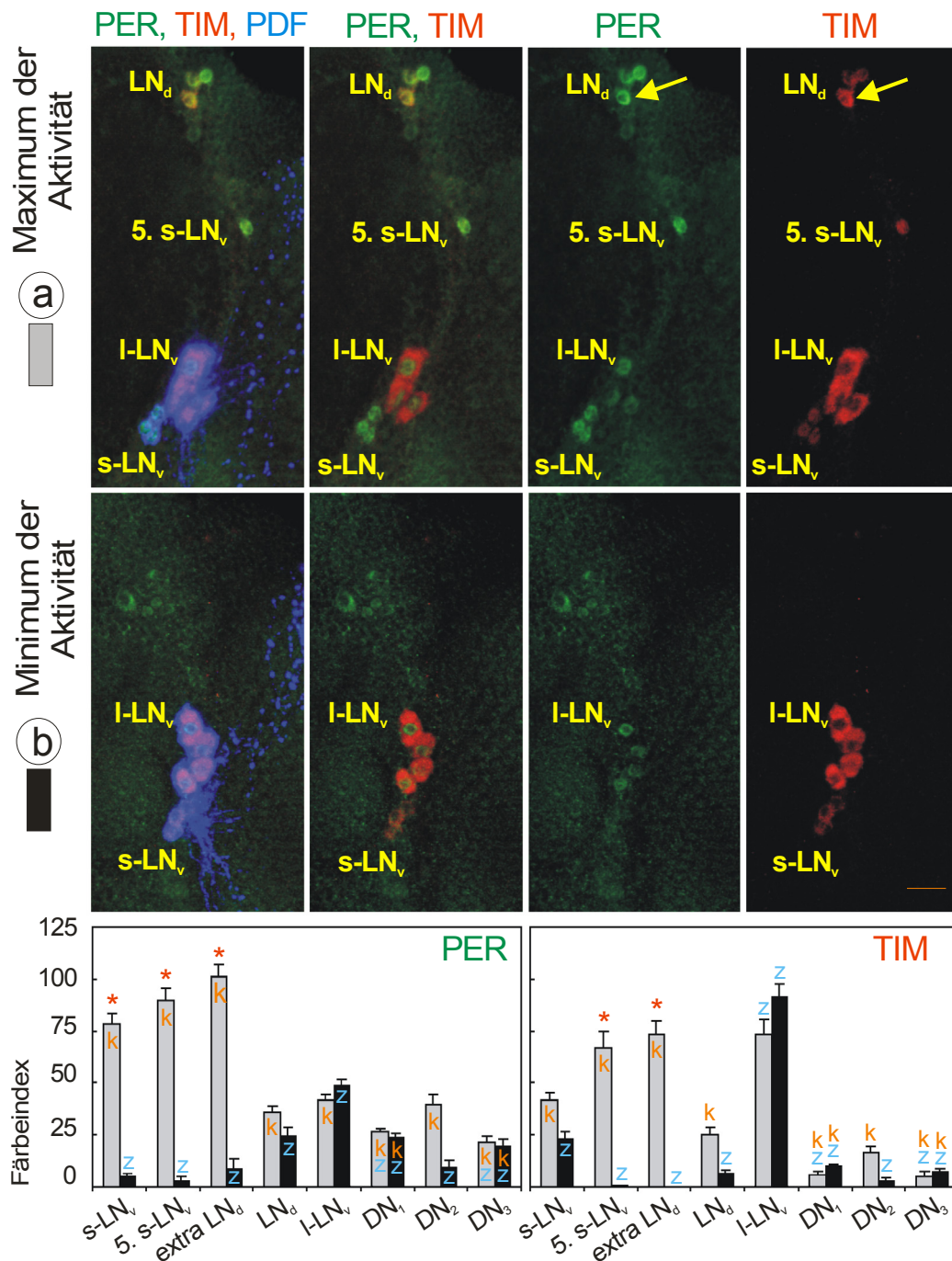


Abbildung 46: Laterale Neurone von intern desynchronisierten *cry^b* Mutanten im ersten Tag in Dauerlicht gefärbt. Die Fliegen wurden jeweils zum Zeitpunkt hoher und niedriger Aktivität durch anti-PER, anti-TIM und anti-PDF (nb33) Antikörper gefärbt. Anti-PDF diente als Markierung für die vier s-LN_v und die I-LN_v einschließlich ihrer Fasern. Zum Zeitpunkt a wurde in allen Neuronen TIM besonders stark im Kern gefunden, mit Ausnahme der I-LN_v bei denen TIM hauptsächlich zytoplasmatisch war. Zum Zeitpunkt b war die PER und TIM Anfärbung in den meisten Zellen schwach und hauptsächlich zytoplasmatisch. In den I-LN_v blieb PER im Kern und TIM fand sich im Zytoplasma, so wie es auch schon im Zeitpunkt a zu sehen war. Die gelben Pfeile zeigen zur extra LN_d, die unter den LN_d die stärkste Färbearbeitung zum Zeitpunkt a erreichte und im Zeitpunkt b das größte Zytoplasma von allen LN_d zeigte. Der Maßbalken entspricht 20µm. Untere Grafik: Quantifizierung der Färbearbeitung aller Neurone zum Zeitpunkt a (graue Balken) und Zeitpunkt b (schwarze Balken). Lokalisation der Proteine: k, Kern; z, Zytoplasma; k+z, in manchen Zellen im Kern in anderen im Zytoplasma. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder. Ein Stern markiert den signifikanten Unterschied in der Färbearbeitung zweier Zeitpunkte (p < 0,001).

In den $l-LN_v$ befand sich das PER Protein in beiden Zeitpunkten im Kern wohingegen das TIM Protein im Zytoplasma zu bleiben schien. Dies zeigt, dass es in den $l-LN_v$ keine Oszillation der Uhrproteine mehr gibt, gleiches fand man in Wildtypfliegen bei Dauerdunkelbedingungen (DD) (Kaneko et al., 2000; Yang and Sehgal, 2001; Veleri et al., 2003). Es sollte allerdings angemerkt werden, dass Peng et al. (2003) nach neun Tagen Dauerdunkel einen wiederkehrenden Rhythmus in der *tim* mRNA gefunden hat. In den DN_1 und DN_3 wurden die beiden Uhrproteine bei manchen Zellen im Kern und bei anderen im Zytoplasma gefunden. Dies bedeutet, dass diese Gruppen zumindest aus zwei zellulären Untergruppen bestehen, die zueinander außer Phase sind. Da ich keine spezifische Markierungsmöglichkeit für diese Untergruppen hatte war es mir nicht möglich diese Gruppen eindeutig von den bereits oben beschriebenen Zellen (den unterschiedlichen DN_1 und den lateral verlagerten DN_3 mit den größeren Zellkörpern) zu unterscheiden.

Auch am fünften Tag in LL war kein periodisches Verhalten in der PER und TIM Expression in den $l-LN_v$, DN_1 und DN_3 zu beobachten. Zu den zwei Zeitpunkten gab es keinen bedeutenden Unterschied in der Menge der Uhrproteine oder deren Lokalisation. Die anderen neuronalen Gruppen behielten die periodische Anreicherung von PER und TIM bei, was sich allerdings wiederum für die LN_d und die DN_2 als nicht signifikant erwies (Abb. 47). Besonders bemerkenswert war, dass die Phase der vier PDF positiven $s-LN_v$ umgekehrt zu der der anderen neuronalen Schrittmacher war. Die PDF positiven $s-LN_v$ waren zum Hochpunkt der langen Aktivitätsperiode stark gefärbt (dies entspricht dem Aktivitätstiefpunkt der kurzen Aktivitätsperiode) wohingegen die anderen neuronalen Gruppen (besonders die 5. PDF negative $s-LN_v$ und die extra LN_d) maximal zur Hauptaktivität der kurzen Periode gefärbt waren (dem Aktivitätstiefpunkt der langen Periode) (Abb. 47). Dies zeigt, dass die vier PDF positiven $s-LN_v$ die kurzperiodische Komponente kontrollieren und die fünfte PDF negative $s-LN_v$ und die extra LN_d zusammen die langperiodische Komponente. Offensichtlich hat die interne Desynchronisation zwischen den PDF positiven $s-LN_v$ einerseits und der fünften $s-LN_v$ gemeinsam mit der extra LN_d andererseits stattgefunden.

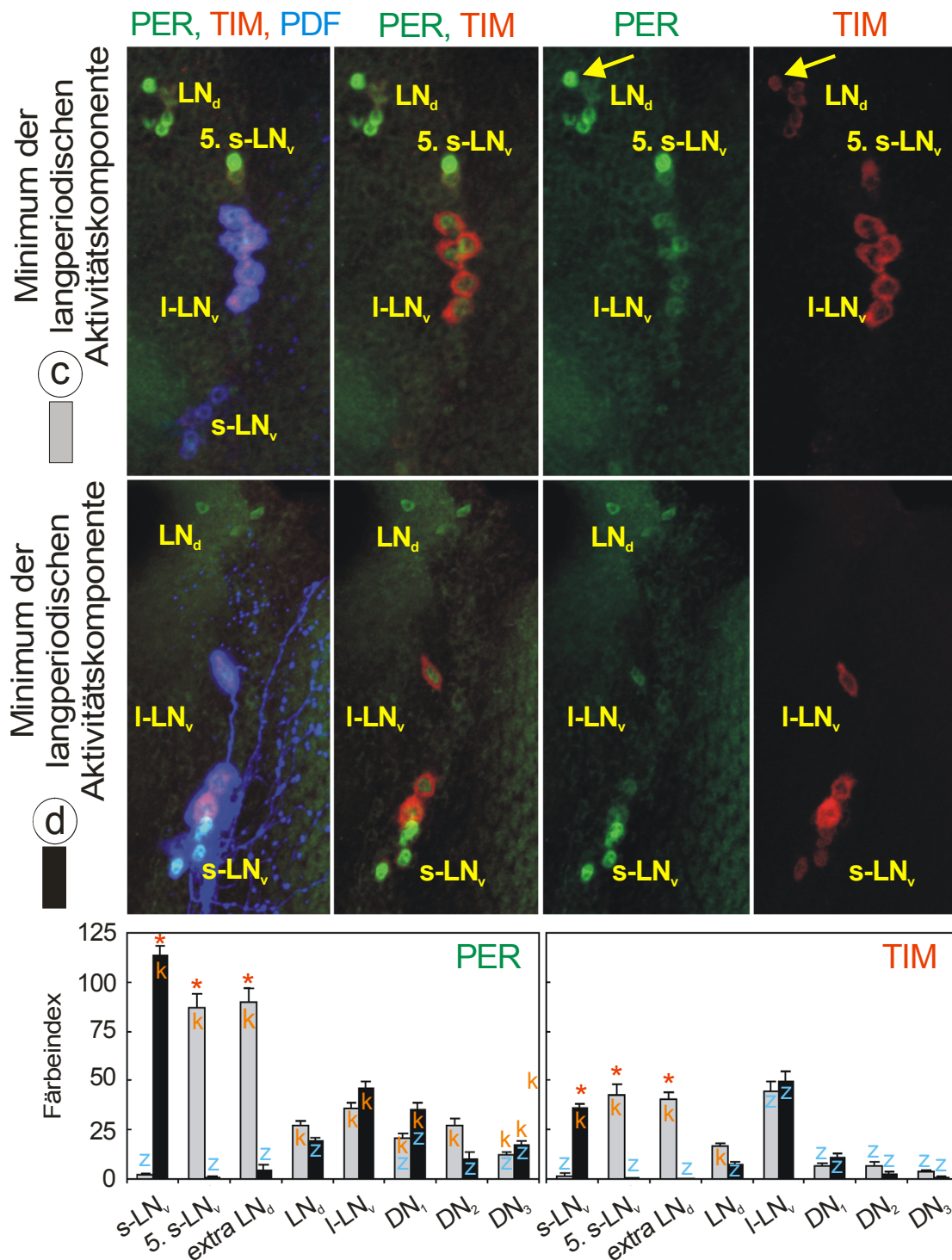


Abbildung 47: Laterale Neurone von intern desynchronisierten *cry^b* Mutanten am fünften Tag in Dauerlicht gefärbt mit anti-PER, anti-TIM und anti-PDF (nb33), erstens zur Aktivitätspause der langen Periode (Zeitpunkt c) und zweitens der Aktivitätspause der kurzen Periode (Zeitpunkt d), Markierung wie in Abbildung 46 beschrieben. Zum Zeitpunkt c wurde eine starke PER und TIM Färbung im Kern der LN_d (besonders der extra LN_d, gelber Pfeil) und der PDF negativen 5. s-LN_v gefunden. Zu beachten ist, dass die LN_d Neurone unterschiedlich gegen PER und TIM angefärbt sind (Details siehe Ergebnisse). Zum Zeitpunkt d konnte eine starke PER- und TIM-Färbung in den Kernen der PDF positiven s-LN_v gefunden werden. Die I-LN_v zeigten zu beiden Zeitpunkten PER im Kern und TIM im Zytoplasma. Unten: Quantifizierung der Färbereintensität der Zeitpunkte c und d. Zu beachten ist, dass die Färbereindizes für TIM ziemlich gering sind und das Protein in allen drei DN Gruppen hauptsächlich im Zytoplasma zu finden ist.

Es scheint also, dass der Informationseingang aus den Komplexaugen die Periode der PDF positiven s-LN_v verkürzt, aber die Periode der fünften PDF negativen s-LN_v und der extra LN_d verlängert. Um sicherzugehen dass die interne Desynchronisation zwischen den PDF positiven s-LN_v und den anderen Neuronen tatsächlich mit dem Aufteilen des Aktivitätsrhythmus in den *cry^b* Fliegen korreliert und nicht generell nach einigen Tagen im Dauerlicht Auftritt, färbte ich auch *cll^{eya}*; *cry^b* Fliegen zum Hochpunkt der Abendaktivität und deren Tiefpunkt am Tag 5. Diese Fliegen zeigen in der Verhaltensrhythmik keinerlei Desynchronisation am Tag 5 im Dauerlicht (siehe Abb. 43), und in Übereinstimmung mit der Verhaltensrhythmik konnte ich keinerlei interne Desynchronisation der neuronalen Gruppen feststellen (Abb. 48). Ich konnte feststellen, dass alle Zellgruppen miteinander in Phase waren. Tatsächlich war das Färbemuster sehr ähnlich dem der *cry^b* Fliegen am ersten Tag im Dauerlicht (LL), mit der Ausnahme, dass die TIM-Protein Gehalte geringer waren und eher denen der *cry^b* Fliegen am Tag 5 im LL ähnelten.

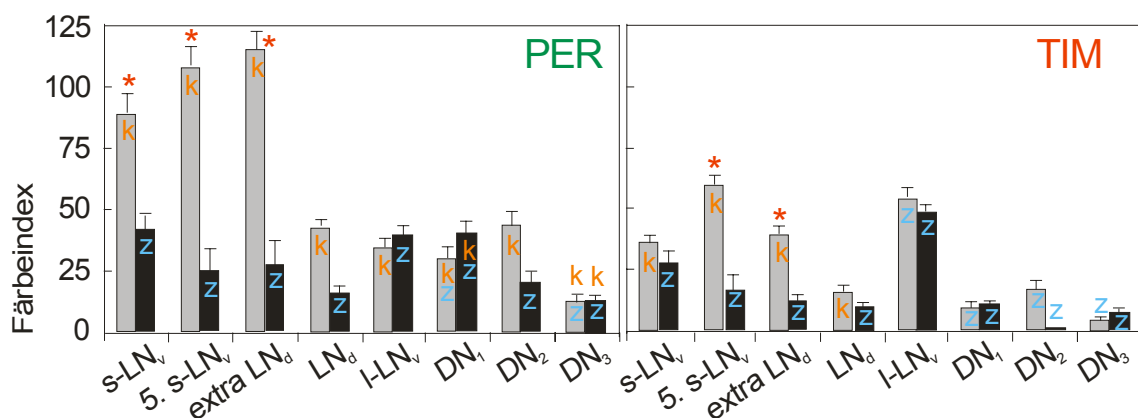


Abbildung 48: Quantifizierung der Färbeintensität für PER und TIM in augenlosen *cll^{eya}*; *cry^b* Fliegen am fünften Tag im LL zu den Zeitpunkten der niedrigsten und der höchsten Aktivität (Markierung der Zellen wie oben). Zu beachten ist, dass alle Neurone die einen signifikanten Unterschied (Stern) in der Färbeintensität zeigten in Phase sind. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die interne Desynchronisation zwischen den neuronalen Gruppen ein stationärer Zustand der *cry^b* Fliegen ist, färbte ich die Fliegen am Tag 5 an zwei zusätzlichen Zeitpunkten, nämlich genau zwischen den Aktivitätsmaxima der beiden Aktivitätskomponenten. Hier fand ich intermediäre Färbeintensitäten in allen Neuronen (Daten nicht gezeigt), was zeigt, dass sich der PER- und TIM-Gehalt in den Neuronen tatsächlich periodisch verändert. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Yoshii et al.

(2004), der die Fliegen am Tag 1, an den Tagen 4 und 5 sowie zusätzlich am Tag 9, an dem beide Aktivitätskomponenten und die dazugehörigen Neurone wieder in Phase waren, durchgängig alle drei Stunden färbte.

Auch wenn meine Studie von korrelativer Natur ist, unterstützen die Ergebnisse der Experimente das Modell bei dem die Desynchronisation der Aktivitätsrhythmik durch die interne Desynchronisation zwischen den PDF positiven s-LN_v auf der einen Seite und der 5. s-LN_v zusammen mit der extra LN_d auf der anderen Seite verursacht wird.

5.3.5 Unterschiede in der PER und TIM Immunmarkierung

Die Periode beider Uhrproteine scheint prinzipiell parallel zu verlaufen, allerdings beobachtete ich in der PER und TIM Immunmarkierung im LL bestimmte Unterschiede. Die TIM Färbung war, zu allen untersuchten Zeitpunkten, generell schwächer als die PER Färbung (außer bei den l-LN_v, die eine starke TIM Markierung im Zytoplasma zeigten, was zum Teil aber durch die Kreuzreaktion der sekundären anti-Maus und anti-Ratte Antikörper verursacht wird. Daher möchte ich diesen Umstand nicht weiter betrachten). Die geringen TIM-Proteinmengen sind besonders deutlich in den dorsalen Neuronen nach 5 Tagen im Dauerlicht. Das TIM-Protein war in allen drei DN-Gruppen ziemlich schwach und hauptsächlich im Zytoplasma. Dies legt nahe, dass die dorsalen Neurone ein zusätzliches Photopigment besitzen, welches von CRY unterschiedlich ist, aber auf ähnliche Weise zu einem lichtabhängigen Abbau des TIM Proteins führt. Die Existenz eines solchen immer noch unbekannten Photopigments ist in früheren Studien vorhergesagt worden (siehe oben, Teil 1: Verhalten; Veleri et al., 2003). Interessanterweise hatte die faktische Abwesenheit des TIM-Proteins nur einen geringen Effekt auf die Menge des PER-Proteins in diesen Zellen. Tatsächlich wurde das PER-Protein weiterhin in den Zellkern transportiert. Diese Ergebnisse bekräftigen frühere Studien durch Shafer et al. (2002, 2004), welche zeigten dass PER und TIM nicht notwendigerweise ausschließlich zusammen in den Nukleus der Schrittmachneurone eintreten können. Als Unterstützung für diese

Behauptung deckten ich mögliche Phasendifferenzen zwischen PER und TIM in den PDF positiven s-LN_v auf.

5.3.6 Bilden die PDF positiven s-LN_v den Morgenszillator und die LN_d den Abendszillator im Pittendrigh-Daan Modell?

Bisherige Studien deuten darauf hin, dass die PDF positiven s-LN_v die Morgenaktivität kontrollieren und die LN_d die Abendaktivität Steuern (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Entsprechend dem Pittendrigh-Daan Modell sind die PDF positiven s-LN_v die Grundlage des Morgenszillators und sollten unter Einwirkung von Dauerlichtbedingungen ihre Periode verkürzen, währenddessen sollten die LN_d als Korrelat des Abendszillators ihre Periode unter diesen Bedingungen verlängern. Tatsächlich fanden wir heraus dass lediglich eine einzelne LN_d (die bereits genannte extra LN_d) eine signifikante Periodik in der PER- und TIM-Färbintensität im LL zeigte und daher am wahrscheinlichsten den Abendszillator repräsentiert. Beim Anlegen desselben Maßstabs sollte die 5. s-LN_v ebenfalls ein grundlegender Bestandteil des Abendszillators sein. Trotz dieser Unterschiede bestätigen unsere Ergebnisse im Prinzip die Hypothese von Grima et al. (2004) und Stoleru et al. (2004), dass die s-LN_v und die LN_d die neuronale Grundlage für den mutmaßlichen Morgen- und Abendszillator in *Drosophila melanogaster* sind. Jedoch anders als bei Grima et al. (2004) und Stoleru et al. (2004), zeigen meine Aktivitätsdaten, dass die s-LN_v und die LN_d (die mutmaßlichen Morgen- und Abendszillatoren) zusammen das Aktivitätsmaxima der Abendaktivität bilden. In dem Aktogramm in Abbildung 42 entspringen beide Komponenten von der Abendaktivität, wohingegen die Morgenaktivität sofort nach dem Übergang in LL verschwindet. Dieses Verhalten war für die meisten Fliegen typisch. Trotzdem sah ich bei 55% der Fliegen eine zusätzliche schwache kurz periodische Komponente die parallel zu der ersten verlief. Diese Komponente erschien für gewöhnlich nach ein bis zwei Wochen im LL und konnte immer zur Morgenaktivität zurück extrapoliert werden. In seltenen Fällen (7,5%) entstammte diese kurz periodische Komponente direkt der Morgenaktivität. Um das Verhalten der Morgenaktivität besser beurteilen zu können, führte ich ein zusätzliches Experiment durch, bei

dem ich 34 Fliegen einem schwachen Licht in der Nacht aussetzte. Die Lichtintensität während der Nacht war auf $0,25\mu\text{W}/\text{cm}^2$ eingestellt (was durchschnittlichem Mondlicht entspricht), wohingegen die Lichtphase und das folgende LL wie zuvor bei $500\mu\text{W}/\text{cm}^2$ blieb. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte ich nicht nur die Morgenaktivität besser sehen, sondern stellte auch fest, dass bei der Mehrheit der Fliegen die Morgenaktivität bereits mit einer kurzen Periode im Freilauf war, bevor die Fliegen überhaupt Dauerlicht hoher Intensität ausgesetzt waren (Tabelle 6; Abb. 49). Es gab nie eine langperiodische Komponente, die von der Morgenaktivität ausging, was zeigt, dass der Morgenoszillator tatsächlich derjenige ist, der unter Dauerlichtbedingungen seine Periode verkürzt, wie es auch im Pittendrigh-Daan Modell vorhergesagt wird. Der mutmaßliche Morgenoszillator (die PDF positiven s-LN_v) von *Drosophila* scheint aber auch einige Anteile der Abendaktivität zu kontrollieren, denn eine zweite noch stärkere kurzperiodische Komponente löste sich immer von der Abendaktivität, sobald die Morgenaktivität den Freilauf begann (Abb. 49).

Tabelle 6: Verhalten der Morgenaktivität von *cry^b* Mutanten bei LD, Licht/Mondlicht (LM) und LL Bedingungen

Lichtbedingung	n	keine Morgenaktivität	synchronisierte Morgenaktivität	freilaufende Morgenaktivität mit kurzer Periode
LD	40	2 (5%)	38 (95%)	0
LM	34	1 (3%)	14 (41%)	19 (56%)
		keine, aus der Morgenaktivität stammende kurzperiodische Komponente	kurzperiodische Komponente die zur Morgenaktivität zurück extrapoliert werden kann	kurzperiodische Komponente die direkt der Morgenaktivität entspringt
LL (nach LD)	40	15 (37,5%)	22 (55%)	3 (7,5%)
LL (nach LM)	34	5 (15%)	11 (31%)	18 (52%)

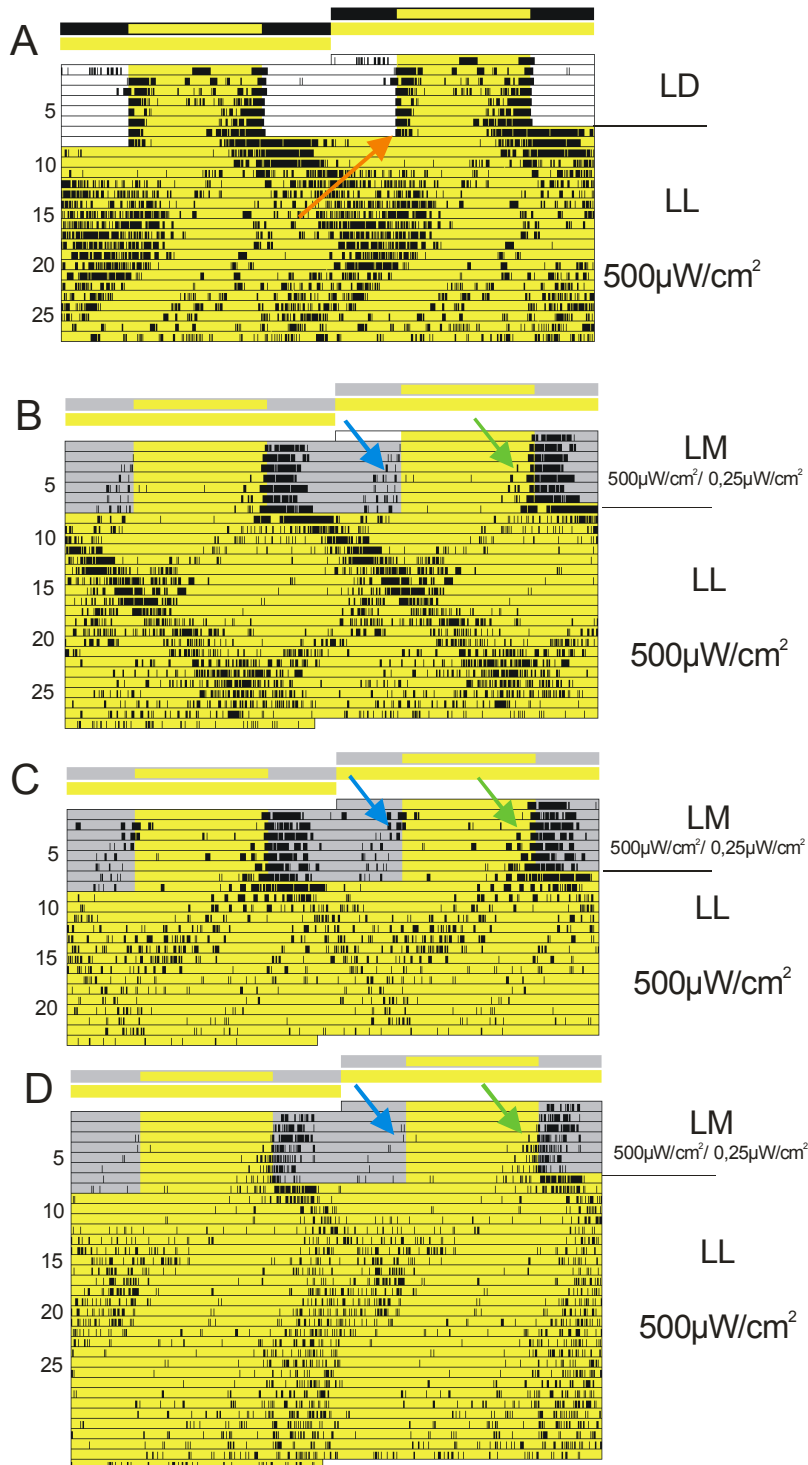


Abbildung 49: Aktogramme von *cry^b* Fliegen, die eine kurze Aktivitätskomponente zeigen, die aus der Morgenaktivität kommt. Die Fliege in A wurde für 7 Tage im normalen LD gehalten, danach in LL überführt. Die anderen Fliegen bekamen während der Nacht schwaches Licht, sie hatten also so etwas wie eine Licht/Mondlicht Beleuchtung. A, eine zweite kurzperiodische Komponente erscheint an Tag 8 im LL; diese kann zur Morgenaktivität aus dem LD zurück extrapoliert werden. Vom Tag 10 an in LL war die Fliege mit einer kurzen Periode im Freilauf. B-D, Die Morgenaktivität beginnt bereits unter der LM Bedingung freizulaufen. Zur selben Zeit löst sich eine kurze Aktivitätskomponente von der Abendaktivität. Im LL bleiben die kurzperiodischen Komponenten, die sich aus der Morgen- und der Abendaktivität abkoppelten weiter im Freilauf. Dies deutet darauf hin, dass die kurzperiodischen Komponenten von Neuronen kontrolliert werden, die sowohl die Morgenaktivität als auch die Abendaktivität generieren.

Es könnte also sein, dass die Abendaktivität von beiden Oszillatoren (den mutmaßlichen Morgen- und Abend- Zellen) gesteuert wird und daher durch Dauerlicht ihre Periode gleichzeitig verkürzt und verlängert wird. Wenn dies richtig wäre würden die PDF positiven s-LN_v sowohl die Morgenaktivität als auch die Abendaktivität kontrollieren und die extra LN_d zusammen mit der fünften s-LN_v ausschließlich die Abendaktivität. Dies würde eine interessante Abweichung vom originalen Pittendrigh-Daan Model einführen, da wir hier nun keinen puren Morgenszillator, sondern eher einen kombinierten "Morgen-Abend" Oszillator hätten, der seine Periode durch Beleuchtung verkürzt und Aspekte von sowohl der Morgenaktivität als auch der Abendaktivität kontrolliert. Diese Situation könnte eine Besonderheit von *Drosophila* darstellen und den sehr starken Abendpeak dieser Tierart erklären. Trotz dieser Abweichung bleibt das Prinzip des Pittendrigh-Daan Model bestehen und gültig. Ein Oszillator (der kombinierte Morgen-Abend Oszillator) wird durch Licht verkürzt und der andere (der Abendszillator) wird durch Licht verlängern. Als Konsequenz daraus würde sich das Aktivitätsband bei längerer Beleuchtung verbreitern und so die Aktivität an lange Sommertage adaptieren.

5.4 Diskussion 3

5.4.1 Rolle der PDF positiven s-LN_v und LN_d im dualen Oszillatoren System

Meine Studie unterstützt die Ansicht, dass die Aktivitätsrhythmik bei *Drosophila melanogaster* von zumindest zwei Gruppen neuronaler Oszillatoren kontrolliert wird. Allerdings fordern meine Ergebnisse eine Modifikation des bisherigen 2-Oszillatoren-Modells von Pittendrigh und Daan (1976). Wie von Pittendrigh und Daan vorgeschlagen, zeigen die zwei Oszillatoren in meinen Experimenten unterschiedliche Reaktionen auf Licht: Der eine Oszillator wird durch Dauerlicht beschleunigt, während der andere verlangsamt wird. Im Unterschied zu vorhergehenden Beobachtungen (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004) sprechen meine Ergebnisse jedoch dafür, dass der eine der Oszillatoren (die PDF positiven s-LN_v) nicht nur die Morgenaktivität kontrolliert, sondern auch die Abendaktivität. Daher sollte man vielleicht nicht von einem "Morgen"-Oszillator sprechen, sondern eher von einem Morgen-Abend-Oszillator oder von einem Haupt-Oszillator (im Englischen „Main“-Oszillator). Für letzteres gibt es folgende Gründe: Die PDF positiven s-LN_v sind grundlegend wichtig für das Aufrechterhalten des Aktivitätsrhythmus bei einem längeren Aufenthalt in Dauerdunkel (Renn et al., 1999; Blanchardon et al., 2001; Helfrich-Förster et al., 1998; Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004; Nitabach et al., 2002). Auch in meiner Arbeit scheinen die PDF positiven s-LN_v den Rhythmus der Fliegen zu dominieren. Nachdem sich die beiden freilaufenden Komponenten am 11. Tag in Dauerlicht gekreuzt hatten, blieben sie bei ca. 50 % der Fliegen zusammen und liefen mit kurzer Periode frei. Dies zeigt, dass die PDF positiven s-LN_v als Rhythmusgeber über die anderen Zellen dominieren können.

Meine Hypothese, dass die PDF positiven LN_v nicht nur die Morgenaktivität, sondern zum Teil auch die Abendaktivität kontrollieren, kann auch andere Beobachtungen erklären. Die Abendaktivität ist immer die herausragende Aktivität, die auch unter Dauerdunkelbedingungen (DD) bestehen bleibt, während die Morgenaktivität unter diesen Bedingungen weitaus schwächer ausgeprägt ist oder sogar verschwindet (Wheeler et al., 1993; Helfrich-Förster,

2000). Daher bildet hauptsächlich die Komponente der Abendaktivität den Freilauf Rhythmus und es scheint nicht plausibel, warum die Neurone, die für den Rhythmus unter diesen Bedingungen verantwortlich sind, nicht auch eine Auswirkung auf die Abendkomponente haben sollten. Tatsächlich fanden Veleri et al. (2003), dass die s-LN_v nach einer langen Zeit unter Konstantbedingungen (DD) die robusteste Periodik haben. In einer weiteren Veröffentlichung von Stoleru et al. (2005) wird die Bedeutung der s-LN_v als Schrittmacher der Aktivität unter Dauerbedingungen ebenfalls betont. Ergänzend muss aber Folgendes gesagt werden: Trotz ihrer Dominanz hängen die PDF positiven s-LN_v von funktionierenden LN_d und DN ab, um eine normale Abendaktivität unter LD-Bedingungen zu erzeugen (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Fliegen, die das Uhr Gen *per* nur in den PDF positiven LN_v tragen, haben eine ausgeprägte Morgenaktivität, aber es fehlt ihnen die Abendaktivität (Grima et al., 2004). Es ist nicht klar, ob dies auf ein fusionieren der Abendaktivität mit der Morgenaktivität zurückzuführen ist, oder ob die Abendaktivität unterdrückt wird. In jedem Fall zeigen diese Ergebnisse, dass der Ausgang von den PDF Neuronen PER-Protein in den LN_d und DN benötigt, um wildtypische Aktivitätsmuster auszuprägen.

5.4.2 Die Rolle der fünften s-LN_v und der DN

Ich habe herausgefunden, dass unter LL- Bedingungen die PDF negative 5. s-LN_v mit den LN_d in Phase schwingt und daher zu der Abendkomponente der Aktivität beiträgt. Bemerkenswerterweise zeigt die PDF negative 5. s-LN_v eine sehr hohe Amplitude in der Menge der Uhrproteine. Wenngleich dies nicht der unumstößliche Beweis der Beteiligung dieser Zelle an der Aktivitätsrhythmik ist, so zeigt es doch, dass sie eine wichtige circadiane Schrittmacherzelle ist. Es ist sehr wenig über diese Zelle bekannt, da sie in früheren Untersuchungen, bei denen nur Einfachfärbungen der Uhrproteine vorgenommen wurden (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004), nicht von den anderen lateralen Neuronen unterschieden werden konnte. Man weiß allerdings, dass die PDF negative 5. s-LN_v die einzige Zelle neben den PDF positiven s-LN_v ist, die vom ersten Larvenstadium an zu arbeiten scheint (Kaneko et al., 1997). Daher könnte sie

die gleiche starke Auswirkung auf die Aktivitätsrhythmik haben, wie es für die PDF positiven s-LN_v gezeigt werden konnte (Renn et al., 1999; Blanchardon et al., 2001; Helfrich-Förster, 2005). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ein detailliertes Bild von der Rolle der PDF-negativen 5. s-LN_v zu bekommen. Auch müssen weitere Studien gemacht werden, um die vollständige Funktion der DN aufzuklären. Meine Ergebnisse zeigen, dass die DN₁ und die DN₃ unterschiedliche Untergruppen beinhalten. Tatsächlich entwickeln sich die DN₁ zu unterschiedlichen Zeiten und scheinen verschiedene Verzweigungsmuster zu haben (Kaneko et al., 1997; Kaneko and Hall, 2000; Helfrich-Förster et al., 2007; Shafer et al., 2006). Es ist sehr wahrscheinlich, dass einige der DN₁ den Morgenszillator unterstützen, während andere dies beim Abendszillator tun. Es gibt Daten, die diese Hypothese unterstützen: wenn die lateralen Neurone (s-LN_v, l-LN_v und LN_d) durch Mutation oder durch genetische Ablation fehlen, aber die dorsalen Neurone (DN₁, DN₂ und DN₃) vorhanden und intakt sind, sind unter LD Bedingungen die Morgen- und Abendaktivität immer noch vorhanden, wenn auch mit einer reduzierten Amplitude und einer veränderten Phase (Hardin et al., 1992; Helfrich-Förster, 1998; Veleri et al., 2003). Die DN₂ könnten eine spezielle Rolle für das bimodale Aktivitätsmuster spielen, da sie bei wildtypischen Fliegen mit den s-LN_v und den LN_d unter DD Bedingungen 12 Stunden außer Phase sind (Veleri et al., 2003).

5.4.3 Für die Verkürzung und Verlängerung der Periode verantwortliche Photorezeptoren

Das Blaulichtphotopigment Cryptochrom wurde als der hauptsächliche Photorezeptor der circadianen Uhr der Taufliege angesehen (Emery et al., 2000). Ich konnte hier nun zeigen, dass die Komplexaugen für die Periodenverkürzung und Periodenverlängerung der molekularen Oszillation in den unterschiedlichen Untergruppen der Schrittmachneurone im LL verantwortlich sind. Ihre besondere Rolle könnte die Adaption der Inneren Uhr an jahreszeitlich bedingte Veränderungen sein. Dieses steht in Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass die Komplexaugen für eine angemessene Taktung der Morgen- und Abendaktivität an langen

Sommertagen und kurzen Wintertagen ist (siehe Teil 1: Verhalten). Im Gegensatz dazu scheint Cryptochrom die Periode aller Schrittmachernurone zu verlängern. Dies kann von den Perioden der Wildtypfliegen abgeleitet werden, die unter künstlichem Dauermondlicht (MM) interne Desynchronisation zeigten. Bei diesen Fliegen waren die Perioden beider Komponenten deutlich länger als die der *cry^b* Fliegen mit interner Desynchronisation.

5.4.4 Das zwei Oszillatoren System

Die interne Desynchronisation der Aktivität in eine kurzperiodische und eine langperiodische Komponente wie sie hier beschrieben wurde erinnert an frühere Ergebnisse bei *Drosophila* Mutanten mit stark reduzierten optischen Loben (Helfrich, 1986) oder der ektopischen Expression von PDF (Helfrich-Förster et al., 2000). Beide Fliegenstämme haben im dorsalen Gehirn ektopische, PDF-enhaltende Neuronenfasern, die zu einer erhöhten oder einer unrythmischen Abgabe von PDF in dieses Gehirngebiet führen und dadurch die normale Kommunikation der Schrittmacherzellen miteinander zu stören scheint. Es ist bisher unbekannt, ob diese Störung der Kommunikation zu einer internen Desynchronisation zwischen den s-LN_v und der 5. s-LN_v zusammen mit der extra LN_d führt wie ich sie in dieser Untersuchung gefunden habe, oder ob andere Schrittmachernurone untereinander asynchron werden.

Schrittmachersysteme mit zwei Oszillatoren wurden auch für Säuger beschrieben, aber in keinem dieser Fälle konnten diese bis auf die Ebene von einzelnen Neuronen zurückgeführt werden (Shinohara et al., 1995; Jagota et al., 2000; de la Iglesia et al., 2004). Wie das circadiane Schrittmacherzentrum der Fliegen enthält das circadiane Schrittmacherzentrum der Säuger, der suprachiasmatische Nukleus (SCN), eine heterogene Neuronenpopulation (Lee et al., 2003). In der Arbeit von de la Iglesia et al. (2004) wurde gezeigt, dass interne Desynchronisation des Aktivitätsrhythmus in lange und kurze Perioden unter speziellen Lichtbedingungen erreicht werden kann. Wie auch bei *Drosophila* spiegeln diese voneinander getrennten Aktivitäten Oszillatoren in definierten anatomischen Bereichen des SCN wider. Im Weiteren gibt es Hinweise, dass der SCN sich aus zwei oszillierenden Morgen- und

Abendkomponenten zusammensetzt (Jagota et al., 2000). Diese Ergebnisse unterstreichen die Allgemeingültigkeit des Systems zweier Oszillatoren.

Die Arbeiten von Grima et al. (2004) und Stoleru et al. (2004) lokalisieren den Morgen- und Abendoszillator jeweils in den PDF positiven LN_v und den LN_d . Trotz der beinahe 12 Stunden Phasendifferenz zwischen morgendlicher und abendlicher Aktivität im LD konnten offensichtlich keine molekularen Phasendifferenzen in diesen Schrittmachernurone festgestellt werden, die diesen Umstand erklären (Grima et al., 2004). Untersuchungen bei Säugern liefern Anzeichen dafür, dass das Zusammenspiel von molekularer Phasenlage und Laufaktivität vielschichtig ist. Zum Beispiel zeigen tagaktive und nachtaktive Nagetiere die gleiche Phasenlage in der PER Oszillation (Smale et al., 2003). Darüber hinaus zeigen verschiedene Rattenstämme unimodale oder bimodale Aktivitätsmuster, doch zeigen alle den gleichen unimodalen Rhythmus in der Melatoninsynthese (Klante et al., 1999). Manche Nilgrasratten ändern ihr Aktivitätsmuster von unimodal-tagaktiv zu bimodal-nachtaktiv, wenn man ihnen ein Laufrad im Käfig anbietet (Blanchong et al., 1999). Trotz dieser drastischen Auswirkung auf das Aktivitätsmuster, hatte das angebotene Laufrad nur eine geringe Auswirkung auf die circadianen Schrittmacher, und die räumlichen und zeitlichen Muster der c-Fos Expression blieben nahezu unverändert (Smale et al., 2003). Insgesamt zeigten diese Daten, dass die Beziehung der molekularen Phasenlage zur Phasenlage des Verhaltens keine direkte ist. Eher sind eine Vielzahl von Phasenbeziehungen zwischen dem molekularen Rhythmus und dem Verhalten wahrscheinlich. Möglicherweise sind Hirnregionen außerhalb der Schrittmacherzentren für diese verschiedenen Phasenlagen verantwortlich. Zumindest konnte dies für Säuger gezeigt werden (Nixon and Smale, 2004; Schwartz et al., 2004; Saper et al., 2005; Schwartz and Smale, 2005). Es scheint nun, dass dieses auch für das circadiane System der Fliege zutrifft. Die Daten der vorliegenden Arbeit wie auch frühere Daten (Yoshii et al., 2004) zeigen, dass während des intern synchronisierten Zustands der Tiefpunkt des PER Proteingehalts aller Schrittmachernurone mit der Hauptaktivität (der Abendaktivität) korreliert ist. Kein weiteres Tief im PER Proteingehalt korreliert mit der Morgenaktivität. Es kann allerdings ein zweiter kleiner Anstieg der PDF Immunreaktion in den Endigungen der $s-LN_v$ gesehen werden (Park et al.,

2000). Dies lässt vermuten, dass der unimodale Rhythmus in der Periodik der Uhrproteine zu einem bimodalen Ausgang (=Neuropeptidsekretion) in diesen Neuronen führt. Wenngleich die bimodale PDF Abgabe nicht explizit im Artikel erwähnt war, so konnte man sie in der dort gezeigten Abbildung 4 gut nachvollziehen (mündliche Information durch Helfrich-Förster). Es sollten jedoch zur Bekräftigung der Daten noch weitere Experimente gemacht werden. Während der Desynchronisation des Verhaltens unter LL Bedingungen beobachtete ich die gleichzeitige interne Desynchronisation in der molekularen Oszillation zwischen verschiedenen Untergruppen der Schrittmachneurone. Eine mögliche Interpretation der Daten ist, dass Dauerlicht zu einer internen Desynchronisation zwischen den Schrittmachneuronen führt, welche dann das Verhalten steuern. Da meine Untersuchung von rein korrelativer Natur ist, muss ich mit meiner Interpretation vorsichtig sein. Es ist auch möglich, dass die beobachteten Neuronen lediglich einem aufgespalteten Rhythmus folgen, welcher von andern Schrittmachneuronen erzeugt wird. Möglicherweise könnte der aufgespaltete Rhythmus von einer Untergruppe der dorsalen Neurone getrieben werden. Ich bevorzuge allerdings aus zwei Gründen die Ansicht, dass der aufgespaltete Rhythmus durch die Desynchronisation der PDF positiven LN_v und der 5. s- LN_v gemeinsam mit der extra LN_d verursacht wird: Erstens häufen sich Belege dafür, dass die lateralen Neurone (LN_v und LN_d) die Hauptschrittmacher sind, während die dorsalen Neurone (DN_1 , DN_2 und DN_3) nicht ausreichen, damit ein Laufaktivitätsrhythmus unter Dauerdunkel bestehen bleibt (siehe für Überblick Hall, 2005; Helfrich-Förster, 2005). Zweitens konnte bei Nagern eine vergleichbare Desynchronisation des Verhaltens mit dem Trennen der Uhrgen Expression zwischen der ventrolateralen und dorsomedialen Unterteilung des SCN korreliert werden (de la Iglesia et al., 2004). Die bewiesene Rolle dieses Gehirnbereichs als circadiane Uhr führte zu der unwidersprochenen Schlussfolgerung, dass die aufgespalteten molekularen Oszillationen die aufgespalteten Verhaltensrhythmen hervorrufen. Ich schlage daher vor, dass sich dasselbe Phänomen bei *Drosophila melanogaster* im neuronalen Hauptoszillator (den s- LN_v) und dem Abendoszillator (der 5. s- LN_v und der extra LN_d) ereignet.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte 3 Ziele. (1) Es sollte der Beitrag der vielen Photorezeptoren von *Drosophila* zur Synchronisation der Aktivitätsrhythmik in Lang- und Kurztagen ermittelt werden; (2) es sollten die Verbindungen zwischen Photorezeptoren und circadianen Schrittmacherneuronen auf anatomischer und funktioneller Basis aufgeklärt werden; und (3) es sollte der Aufbau des Oszillatorsystems in Morgen- und Abendoszillatoren untersucht werden und die Reaktionen dieser beiden Komponenten auf Licht getestet werden. Im ersten Teil konnte ich zeigen, dass die Fliege alle Photorezeptoren (Komplexaugen, H-B Äuglein, Ocellen, Cryptochrom und ein noch unbekanntes Photopigment in den Dorsalen Neuronen (DN_3)) benutzt, um ihre Aktivität in optimaler Weise an die Kurz- und Langtags Bedingungen anzupassen. Die Komplexaugen waren hierbei besonders wichtig, da sie bewirkten, dass Morgen- und Abendaktivitäten in Langtagen weiter auseinander lagen, als in Kurztagen. Außerdem vermittelten sie die Maskierungseffekte des Lichts. Im zweiten Teil konnte ich funktionelle Verbindungen zwischen dem larvalen Bolwigischen Nerv und den s-LN_v sowie zwischen dem adulten H-B Äuglein und den s-LN_v und l-LN_v nachweisen. Im Adulttier scheint der Neurotransmitter Histamin, der von den Komplexaugen und dem H-B Äuglein verwendet wird, hemmend auf die neuronale Aktivität der s-LN_v und l-LN_v zu wirken. Dieses Ergebnis muss jedoch noch durch weitere Versuche bestätigt werden. Direkte synaptische Verbindungen zwischen den Rezeptorzellen 7 und 8 und den l-LN_v konnte ich nicht nachweisen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es Verbindungen über noch unbekannte Interneurone gibt. Im dritten Teil gelang es mir, durch Dauerlicht interne Desynchronisation zwischen Morgen- und Abendoszillatoren zu erreichen. Wie von Pittendrigh und Daan vorausgesagt, lief der Morgenoszillator mit kurzer Periode frei, während der Abendoszillator eine lange Periode zeigte. Allerdings schien der Morgenoszillator auch Aspekte der Abendaktivität zu kontrollieren, weshalb das ursprüngliche 2-Oszillator-Modell leicht modifiziert werden musste. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten fand ich, dass sich nicht alle LN_d als Abendoszillator verhielten, sondern nur eine der 6 Zellen als solcher agierte. Einen ausgesprochenen Abendoszillator

scheint dagegen die 5. s-LN_v darzustellen. Dieser Zelle sollte in zukünftigen Arbeiten mehr Aufmerksamkeit zukommen.

7 Anhang

7.1 *Drosophila*-Medium T (Tübingen)

- 1l Wasser
- 100g Weizengrieß
- 100g Zuckerrübensirup
- 15g Sat Isabgol (als Agarersatz; Sapro et al., 1982)
- 8g Hefeflocken

Als Fungizide werden hinzugefügt:

- 5ml 4-Hydroxy-Benzoesäure-Methylester (Nipagin)
- 1,5ml Propionsäure

7.2 *Drosophila*-Medium R (Regensburg)

- 1l Wasser
- 8g Agar
- 22g Rübensirup
- 80g Malzextrakt
- 18g Bierhefe
- 10g Soja
- 80g Maismehl/ Grieß
- 3g Nipagin

7.2. Färbeprotokolle

Färbeprotokoll für:	anti PDH (Dierksen Antikörper)
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd in PBT (PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 1 Stunde
3. Waschen	5 x 10 min in PP (Phosphatpuffer pH 7,4)
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: PDH-Antikörper (in rabbit) 1:2000 in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4), 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid auf 4°C. 24 – 48 Stunden. 2 Stunden vor dem Spülen auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	Sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und fluorchromgekoppelten Goat anti Rabbit Antikörper (GAR; 1:40).
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti PcP (nb33 - monoklonaler Antikörper Maus)
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 1 Stunde
3. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 5 x 10 min
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: monoklonaler PP-Antikörper (in Maus) 1:100 mit 0,5% TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid 12 – 48 Stunden auf 4°C. „Stunden vor dem Spülen auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.“
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und fluorchromgekoppelten Goat anti Mouse Antikörper (GAM; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti PDH (Antikörper Meerschweinchen)
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 1h
3. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 5 x 10 min
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: PDH-Antikörper (in Meerschweinchen) 1:100 mit 0,5% TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid für 12 – 48 Stunden auf 4°C. 2 Stunden vor dem Spülen auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und fluorchromgekoppelten Goat anti Guineapig Antikörper (GAG; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti WGA
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd (in PBT) (0,5% TrX) für 1h
3. Waschen	PP (Phosphatpuffer) 5 x 10 min
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: anti WGA (in rabbit) 1:1000 mit 0,5% TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid 12 – 48 Stunden auf 4°C. „ Stunden vor dem Spülen auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (0,5% TrX) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und fluorchromgekoppelten Goat Anti Rabbit Antikörper (GAR; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti Synapsin (nc82 - monoklonaler Antikörper Maus)
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 1 Stunde
3. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 5 x 10 min
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	in Synapsin-Antikörper (in Maus) 1:10 mit 0,5% TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid über Nacht auf 4°C
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und Goat anti Mouse Antikörper (GAM; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5% TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1% TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti Chaoptin (24b10 - monoklonaler Antikörper aus Maus)
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	i n 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 1 Stunde
3. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 5 x 10 min
4. Präinkubation	mindestens für 3 Stunden bis über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	in Chaoptin-Antikörper (in Maus) 1:100 mit 0,5%TritonX und 5% normal Goat Serum über Nacht auf 4°C
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und Goat anti Mouse Antikörpe (GAM; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti PERIOD (aus Hasen)
1. Fixierung:	Die ganze Fliege in 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 2 Stunden
2. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 3 x 15 min
3. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
4. Präinkubation	über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: (im Hasen) 1:1000 mit 0,5% TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid für 48 Stunden auf 4°C.
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und Goat anti Rabbit Antikörper (GAM; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	anti TIMLESS (aus Ratte)
1. Fixierung:	Die ganze Fliege in 4% Paraformaldehyd (in PBT= PP + 0,5% TrX pH 7,4) für 2 Stunden
2. Waschen	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 3 x 15 min
3. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
4. Präinkubation	über Nacht in PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% Normal Goat Serum (NGS). Pro Blockschälchen werden 500µl gebraucht. Gilt auch für alle folgenden Lösungen, mit Ausnahme des Spülens.
5. Inkubation 1	Primärer Antikörper: (in Ratte) 1:1000 mit 0,5%TritonX, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,02% Natriumazid für 48 Stunden auf 4°C.
6. Spülen	5 x 10 min PBT (0,5% TrX)
7. Inkubation 2	sekundärer Antikörper: PBT (PP + 0,5% TrX; pH 7,4) mit 5% NGS, 0,02% Natriumazid und Goat anti Rat Antikörper (GAM; 1:40)
8. Spülen	5 x 10 min in PBT (0,5%TrX) 1 x 10 min in PBT (0,1%TrX)
9. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield

Färbeprotokoll für:	GFP Färbungen
1. Gehirne herauspräparieren	in PP (Phosphatpuffer, pH 7,4)
2. Fixierung:	in 4% Paraformaldehyd (PP pH 7,4) für 1 Stunde
3. Wasche	PP (Phosphatpuffer pH 7,4) 5 x 10 min
4. Einbetten	Einbetten auf Spezialobjektträger für konfokale Mikroskopie. Einbettmittel Vectashield
	Für Doppelmarkierungen kann die GFP Färbung mit allen anderen Fluoreszenzfärbungen kombiniert werden. Es sollte nur darauf geachtet werden dass vor der Fixierung mit PFA kein TritonX100 in der Lösung ist. Auch die Fixierung darf kein PFA enthalten. Vor der vollständigen Fixierung wäscht TritonX100 das GFP aus den Zellen!
Abgewandt bei:	UAS-GFP S65T; UAS-nSynaptobrevin-GFP

7.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Blumenuhr nach Carl von Linné
- Abb.2: Modell der molekularen Uhr von *Drosophila*
- Abb.3: Expressionsprofile der Uhrproteine PERIOD und TIMELESS
- Abb.4A: Schematisches Aktogramm eines nachtaktiven Tieres
- Abb.4B: Idealisierte Phasen-Response-Kurve
- Abb.5: Kopf einer wildtypischen *Drosophila melanogaster*
- Abb.6: Schematisches Gehirn von *Drosophila melanogaster*
- Abb.7: Repräsentative Aktivität einer wildtypischen Fliege des Canton-S Stammes im Kurztag mit anschließendem Dauerdunkel (DD)
- Abb.8: Repräsentative Aktivität einer wildtypischen Fliege des Canton-S Stammes im Langtag mit anschließendem Dauerdunkel (DD)
- Abb.9: Repräsentative Aktogramme der Blaulichtrezeptormutante *cry^b* im Kurztag und Langtag
- Abb.10: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante *cll^{eya}* im Kurztag und Langtag
- Abb.11: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante *so¹* im Kurztag und Langtag
- Abb.12: Repräsentative Aktogramme der Photorezeptormutante *hdc^{jk910}* im Kurztag und Langtag
- Abb.13: Grafische Darstellung der Mitnahme der getesteten Fliegenstämme in Prozent
- Abb.14: Repräsentative Aktogramme der Kreuzung *Rh5/ttx; cry^b* im Kurztag und Langtag
- Abb.16: Mittlere Periodenlängen von *cll^{eya}; cry^b* Mutanten
- Abb.17A: Fliege mit einem die akzessorische Medulla normal innervierendem H-B Äuglein
- Abb.17B: Fliege mit einem irregulär projizierendem H-B Äuglein
- Abb.17C: Fliege ohne nachweisbares H-B Äuglein
- Abb.18A: Repräsentatives Aktogramm einer *so¹; cry^b* Mutante
- Abb.18B: Repräsentatives Aktogramm einer *cll^{eya}; cry^b* Mutante

- Abb.19: Repräsentative Aktogramme von *hdc^{jk910}; cry^b* Fliegen im Kurztag und Langtag
- Abb.20: Grafische Darstellung der Mitnahme der getesteten Fliegenstämme in Prozent
- Abb.21: Durchschnittliche Aktivitätsprofile aller untersuchten Fliegenlinien
- Abb.22: Phasenverschiebung der so Mutante um 6 Stunden
- Abb.23: Beeinflussung der Genexpression der R7 und R8
- Abb.24: Synapse mit: Cytoskelett (grau), Synapsin (rot), Synaptobrevin (grün), Vesikel
- Abb.25: Darstellung der durch Calmodulin (CaM) und das Targetpeptid M13 gekoppelten fluoreszierenden Proteine CFP und YFP
- Abb.26: Veränderung der relativen Fluoreszenz von ECFP und EYFP
- Abb.27: Ausschnitt aus einem Larvengehirn das unter der Kontrolle des *gmr*-Gal4 Treibers WGA in den Photorezeptoren exprimiert
- Abb.28: Ausschnitt aus einem Larvengehirn, das WGA unter der Kontrolle des *pdf*-Gal4 Treibers exprimiert
- Abb.29: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb.28
- Abb.30: Ausschnitt aus dem Gehirn einer jungen adulten Fliege die unter der Kontrolle des *pdf*-Gal4 Treibers WGA exprimiert
- Abb.31: Ausschnitt aus dem Gehirn einer 5 Wochen alten adulten Fliege die unter der Kontrolle des *gmr*-Gal4 Treibers WGA exprimiert
- Abb.32A/B: Expressionsmuster der Kreuzung aus *Rh5*-Gal4; *syn⁹⁷* und *syn⁹⁷* UAS-*syn*
- Abb.33: Expression von Synaptorevin-GFP unter der Kontrolle der Treiberlinie *gmr*-Gal4
- Abb.34A/B: Veränderung der ECFP und EYFP Fluoreszenz nach der Zugabe von 100µMol Kaliumchlorid in den I-LN_v
- Abb.35: Messung des FRET Effekts an den s-LN_v
- Abb.37A/B: Reaktion der Varikositäten der I-LN_v auf die Zugabe von 100µMol Histamin und 100µMol Acetylcholin
- Abb.38: Bewegungsartefakt
- Abb.39: Grafische Darstellung der relativen ECFP und EYFP Fluoreszenz der kleinen und großen lateralen Schrittmacherneurone

- Abb.40: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen larvalem optischen Neuropil und den larvalen circadianen Schrittmacher-Neuronen (A), sowie zwischen akzessorischer Medulla und den adulten circadianen Schrittmacher-Neuronen (B)
- Abb.41: Molekulare Rückkopplungsschleifen bei Tag und Nacht
- Abb.42: Interne Desynchronisation in der *cryptochrom^{baby}* Mutante
- Abb.43: Aktogramme von Wildtypfliegen in Dauerlicht (A) und konstantem Schwachlicht (B,C,D)
- Abb.43E: *cll^{eya}; cry^b* Mutante in Dauerlicht (LL)
- Abb.44A-E: Die dorsalen Neurone von *cry^b* Mutanten
- Abb.45A-O: PER,TIM und PDF Expression in den lateralen Neuronen von wildtypischen Fliegen
- Abb.46: Laterale Neurone von intern desynchronisierten *cry^b* Mutanten im ersten Tag in Dauerlicht gefärbt
- Abb.47: Laterale Neurone von intern desynchronisierten *cry^b* Mutanten am fünften Tag in Dauerlicht gefärbt
- Abb.48: Quantifizierung der Färbeintensität für PER und TIM in augenlosen *cll^{eya}; cry^b* Fliegen am fünften Tag im LL
- Abb.49: Aktogramme von *cry^b* Fliegen, die eine kurze Aktivitätskomponente zeigen, die aus der Morgenaktivität kommt

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Verwendete Fliegenstämme und ihre photorezeptive Ausstattung
Tab.2:	Auswertung der histologischen Begutachtung individueller <i>cll^{eya};cry^b</i> und ihrer Aktivitätsperioden
Tab.3:	Prozentsatz der synchronisierten Fliegen zu den unterschiedlichen Tageslängen
Tab.4:	Rhythmik und Aktivitätsmuster von Wildtyp Fliegen und <i>cry^b</i> Mutanten im LL
Tab.5:	Position der 5. s-LN _v und Verschiebungen der Lage der restlichen Lateralen Neurone (l-LN _v , LN _d und s-LN _v)
Tab.6:	Verhalten der Morgenaktivität von <i>cry^b</i> Mutanten bei LD, Licht/Mondlicht (LM) und LL Bedingungen

7.5 Literaturverzeichnis (alphabetisch)

Allada R. (2003) Circadian clocks: a tale of two feedback loops.
Cell. 112(3):284-6

Aschoff J (1966) Circadian activity pattern with two peaks. Ecology 47:657-662.

Aschoff J (1969) Phasenlage der Tagesperiodik in Abhängigkeit von Jahreszeit und Breitengrad. Oecologia 3:125-165.

Aschoff J (1979) Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. Z Tierpsychol 49:225-249.

Bachleitner W, Kempinger L, Wulbeck C, Rieger D, Helfrich-Forster C. (2007) Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. PNAS 104(9):3538-43.

Beiswanger CM, Sokolove PG and Prior PG (1981) Extraocular photoentrainment of the circadian locomotor rhythm of the garden slug *Limax*. J Exp Zool 216:13-23.

Benfenati F, Valtorta F, Greengard P (1991) Computer modeling of synapsin I binding to synaptic vesicles and F-actin: implications for regulation of neurotransmitter release. PNAS 88:575–579.

Berson DM, Dunn FA and Takao M (2000) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. Science 295:1070-1073.

Blanchardon E, Grima EB, Klarsfeld A, Chelot E, Hardin PE, Preat T, Rouyer F (2001) Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of activity and eclosion rhythms by targeted genetic ablation and PERIOD overexpression. Eur J Neurosci 13:871-888.

Blanchong JA, McElhinny, Mahoney MM, Smale L (1999) Nocturnal and diurnal rhythms in the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus*. J Biol Rhythms 14:364-377.

Bridges and Morgan, (1923), The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster* Publs Carnegie Instn 327: 1—251

Burg MG, Sarthy PV, Koliantz G and Pak WL (1993) Genetic and molecular identification of a *Drosophila* histidine decarboxylase gene required in photoreceptor transmitter synthesis. EMBO J 12:911-919.

Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P (2004) Roles of the two CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. Science 304:1503-1506.

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. Science. 284(5415):760-5

Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA (1999) Light-Dependent Sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. Science 285:553-556.

Cheyette BNR, Green PJ, Martin K, Garren H, Hartenstein V and Zipursky SL (1994) The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. Neuron 12:977-996.

Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. (2006) *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. Curr Biol. 16(5):441-9

Cowman AF, Zuker CS, Rubin GM.(1886) An opsin gene expressed in only one photoreceptor cell type of the *Drosophila* eye. Cell. 14;44(5):705-10.

Daan S, Albrecht U, van der Horst GTJ, Illnerová H, Roenneberg T, Wehr TA and Schwartz WJ (2001) Assembling a Clock for All Seasons: Are There M and E Oscillators in the Genes? *J. Biol. Rhythms* 16:105-116.

de la Iglesia HO, Meyer J, Schwartz WJ (2004) Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 14:796-800.

Diegelmann S, Fiala A, Leibold C, Spall T, Buchner E. (2002) Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis*. 34(1-2):95-8.

Dunlap J, Loros J, DeCoursey PJ (2003) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sunderland, MA: Sinauer.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC and Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95:669-679.

Emery P, Stanewsky R, Hall JC and Rosbash M (2000a) A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature* 404:456-457.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC and Rosbash M (2000b) *Drosophila* CRY is a deep-brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26:493-504.

Engelmann W and Honegger HW (1966) Tagesperiodische Schlüpfrythmik einer augenlosen *Drosophila melanogaster* Mutante. *Naturwiss* 53:588.

Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC. (1992) Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila*

adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. J Neurosci. (9):3321-49.

Fiala A, Spall T, Diegelmann S, Eisermann B, Sachse S, Devaud JM, Buchner E, Galizia CG.(2002) Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. Curr Biol. 12(21):1877-84

Feiler R, Harris WA, Kirschfeld K, Wehrhahn C, Zuker CS. (1988) Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin gene leads to altered visual function. Nature. 333(6175):737-41.

Fischbach K-F (1983) Neural cell types surviving congenital sensory deprivation in the optic lobes of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol 95:1-18.

Fischbach K-F and Technau G (1984) Cell degeneration in the developing optic lobes of the sine oculis and small-optic-lobes mutants of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol 104:219-239.

Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W and Menaker M (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). J Comp Physiol A 169:39-50.

Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schanz M, Munoz M, David-Gray Z and Foster RG (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. Science 284:502-504.

Frisch B, Hardin PE, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC. (1994) A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. Neuron. (3):555-70

Glaser WR (1978) Varianzanalyse. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Godenschwege TA, Reisch D, Diegelmann S, Eberle K, Funk N, Heisenberg M, Hoppe V, Hoppe J, Klagges BR, Martin JR, Nikitina EA, Putz G, Reifegerste R, Reisch N, Rister J, Schaupp M, Scholz H, Schwarzel M, Werner U, Zars TD, Buchner S, Buchner E. (2004) Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur J Neurosci.* 20(3):611-22.

Grima B, Chélot E, Xia R, Rouyer F (2004) Morning and evening peaks of activity are controlled by different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431:869-873.

Hall JC (2005) Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. *Meth Enzymol* 393:161-185.

Hamasaka Y, Rieger D, Parmentier ML, Grau , Helfrich-Förster C and Nässel DR. (2007) Glutamate signaling modulates activity rhythms in *Drosophila* via metaotropic receptors on clock neurons. *J Comp Physiol in Druck*

Hardin PE, Hall JC, Rosbash M (1992) Behavioral and molecular analyses suggest that circadian output is disrupted by *disconnected* mutants in *D. melanogaster*. *EMBO J* 11:1-6.

Hardin PE (2004) Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhyth* 19:348-360.

Hamblen-Coyle MJ, Wheeler DA, Rutila JE, Rosbash M and Hall JC (1992) Behavior of period-altered circadian rhythm mutants of *Drosophila* in light:dark cycles (Diptera: Drosophilidae). *J Insect Behav* 5:417-446.

Hattar S, Liao H-W, Takao M, Berson DM and Yau K-W (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.

Helfrich C (1986) Role of the optic lobes in the regulation of the locomotor activity of *Drosophila melanogaster*: Behavioral analysis of neural mutants. J Neurogenet 3:321-343.

Helfrich-Förster C (1995) The *period* clock gene is expressed in CNS neurons, which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 92: 612-616.

Helfrich-Förster C (1998) Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. J Comp Physiol [A] 182:435-453.

Helfrich-Förster C (2000) Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - sex specific differences suggest a different quality of activity. J Biol Rhythms 15:135-154.

Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall JC, Stanewsky R (2001) The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. Neuron 30:249-261.

Helfrich-Förster C (2001) The activity rhythm of *Drosophila melanogaster* is controlled by a dual oscillator system. J Insect Physiol 47:877-887.

Helfrich-Förster C (2002) The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. Zoology 105:297-312.

Helfrich-Förster C, Edwards T, Yasuyama K, Wisotzki B, Schneuwly S, Stanewsky R, Meinertzhagen IA and Hofbauer A (2002) The extraretinal eyelet of *Drosophila*: Development, ultrastructure, and putative circadian function. J Neurosci 22:9255-9266.

Helfrich-Förster C (2003) The neuroarchitecture of the circadian clock in the *Drosophila* brain. *Microsc Res Tech*: 62(2):94-102.

Helfrich-Förster C (2004) The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J Comp Physiol A* 190:601-613.

Helfrich-Förster C (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav* 4:65-76.

Helfrich-Förster C, Shafer OT, Wulbeck C, Grieshaber E, Rieger D, Taghert P. (2007) Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 500(1):47-70.

Hofbauer A and Buchner E (1989) Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften* 76:335-336.

Jagota A, de la Iglesia HO, Schwartz WJ (2000) Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci* 3:372-376.

Kaneko M, Helfrich-Förster C, Hall JC (1997) Spatial and temporal expression of the *period* and *timeless* genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J Neurosci* 17:6745-6760.

Kaneko M and Hall JC (2000) Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J Comp Neurol* 422:66-94.

Kaneko M, Park JH, Cheng Y, Hardin PE, Hall JC (2000) Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioural rhythms. *J Neurobiol* 43:207-233.

Keller A.(2007) *Drosophila melanogaster's* history as a human commensal. Curr Biol. 2007 17(3):R77-81.

Klagges BR, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S, Buchner E. (1996) Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. J Neurosci. 16(10):3154-65.

Klante G, Secci K, Masson-Pévet M, Pévet P, Vivien-Roels B, Steinlechner S, Wollnik F (1999) Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. Am J Physiol 276:R1078-R1086.

Konopka RJ, Pittendrigh C and Orr D (1989) Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. J Neurogenet 6:1-10.

Lee HS, Billings HJ, Lehman MN (2003) The Suprachiasmatic Nucleus: A Clock of Multiple Components J Biol Rhythms 18: 435-449.

Li L, Chin L-S, Shupliakov O, Brodin L, Sihra TS, Hvalby O, Jensen V, Zheng D, McNamara JO, Greengard P, Andersen P (1995) Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. PNAS 92:9235–9239.

Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P (1991) Regulation by synapsin I and Ca²¹/calmodulin dependent protein kinase II of neurotransmitter release in squid giant synapse. J Physiol (Lond) 436:257–282.

Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. Neuron 24:219-230.

Marrus SB, Zheng H, Rosbash M (1996) Effect of constant light and circadian entrainment of *perS* flies: evidence for light-mediated delay of the negative feedback loop in *Drosophila*. EMBO J 15:6877-6886.

Mazzoni EO, Desplan C, Celik A. (2004) 'One receptor' rules in sensory neurons. Dev Neurosci. 26(5-6):388-95.

Melnick MB, Noll E, Perrimon N, (1993) The *Drosophila* stubarista phenotype is associated with a dosage effect of the putative ribosome-associated protein D-p40 on spineless. Genetics. 135(2):553-64.

Melzig J, Buchner S, Wiebel F, Wolf R, Burg M, Pak WL and Buchner E (1996) Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behaviour. J Comp Physiol 179:763-773.

Miskiewicz K, Pyza E, Schurmann FW. (2004) Ultrastructural characteristics of circadian pacemaker neurones, immunoreactive to an antibody against a pigment-dispersing hormone in the fly's brain. Neurosci Lett. 363(1):73-7

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature. 388(6645):882-7

Moore-Ede MC, Sulzman FM and Fuller CS (1982) The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system. Cambridge (Mass), London: Harvard University Press.

Morante J, Desplan C.(2004) Building a projection map for photoreceptor neurons in the *Drosophila* optic lobes.Semin Cell Dev Biol. 15(1):137-43.

Mrosovsky N (1996) Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. Biol Rev 71:343-372.

Mrosovsky N (1999) Masking: History, definitions, and measurement. *Chronobiol Internat* 16:415-429.

Mrosovsky N (2003a) Contribution of classic photoreceptors to entrainment. *J Comp Physiol [A]* 189:69-73.

Mrosovsky N (2003b) Aschoff's rule in retinally degenerate mice. *J Comp Physiol [A]* 189:75-78.

Mrosovsky N, Foster RG and Salmon PA (1999) Thresholds for masking responses to light in three strains of retinally degenerate mice. *J Comp Physiol [A]*:423-428.

Nässel D (1999) Histamine in the brain of Insects: A review. *Microsc Res Techn* 44:121-136.

Nash HA, Scott RL, Lear BC and Allada R (2002) An unusual cation channel mediates photic control of locomotion in *Drosophila*. *Curr Biol* 12: 2152-2158.

Nitabach MN, Blau J, Holmes TC (2002) Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* 109:485-495.

Nixon JP, Smale L. (2005) Orexin fibers form appositions with Fos expressing neuropeptide-Y cells in the grass rat intergeniculate leaflet. *Brain Res.* 1053(1-2):33-7

Park JH, Helfrich-Förster C, Lee G, Liu L, Rosbash M, Hall JC (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3608-3613.

Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M (2003) *Drosophila* freerunning rhythms require intercellular communication. PLoS Biol 1: E13.

Pittendrigh C and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. J Comp Physiol 106:223-252.

Pollack I and Hofbauer A (1991) Histamine-like immunoreactivity in the visual system and brain of *Drosophila melanogaster*. Cell Tiss Res 266:391-398.

Pollock JA and Benzer S (1988) Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. Nature. 333(6175):779-82.

Redlin U and Mrosovsky N (1999) Masking by light in hamsters with SCN lesions. J Comp Physiol [A] 184:439-448.

Redlin U, Cooper HM and Mrosovsky N (2003) Increased masking response to light after ablation of the visual cortex in mice. Brain Res 965:1-8.

Renn SCP, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH (1999) A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. Cell 99: 791-802.

Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2003) Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms 18: 377-391.

Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Forster C. (2006) Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 26(9):2531-43.

Rieger D, Frauenholz C, Popp J, Bichler D, Dittmann R, Helfrich-Förster C. (2007) The fruit fly *Drosophila melanogaster* favours dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. J. Biol. Rhythms. In Druck

Roenneberg T and Foster RG (1997) Twilight times: light and the circadian system. Photochem Photobiol 66:549-561.

Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Melanka RC, Südhof TC (1993) Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. Cell 75:661– 670

Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M. Costa R and Kyriacou CP (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. Curr Biol 11:909-917.

Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC and O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. Science 298:221-2213.

Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. Trends Neurosci 28:152-157.

Schwartz WJ (2004) Sunrise and sunset in fly brains. Nature 431:751-752.

Schwartz MD, Smale L (2005) Individual differences in rhythms of behavioral sleep and its neural substrates in Nile grass rats. J Biol Rhythms 20:526-537.

Schwartz MD, Nunez AA, Smale L (2004) Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. Neurosci 127:13.23

Selby CP, Thompson C, Schmitz TM, Van Gelder RN and Sancar A (2000) Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14697-14702.

Shafer OT, Rosbash M, Truman JW (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins *period* and *timeless* in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 22: 5946-5954.

Shafer OT, Levine JD, Truman JW, Hall JC (2004) Flies by Night: Effects of Changing Day Length on *Drosophila*'s Circadian Clock. *Curr Biol* 14:424–432.

Shafer OT, Helfrich-Forster C, Renn SC, Taghert PH. (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol.* 498(2):180-93.

Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Honma K (1995) Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7396-400.

Siebert U and Wollnik F (1993) Effect of photoperiod on the development of wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiol Behav* 53:1145-1150

Smale L, Lee T, Nunez AA (2003) Mammalian diurnality: Some facts and gaps. *J Biol Rhythms* 18:356-366.

Sokolove PG and Bushell WN (1978) The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72:131-160.

Stanewsky R, Frisch B, Brandes C, Hamblen-Coyle, MJ, Rosbash M, Hall JC (1997) Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene *period* and a *lacZ* reporter:

mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. *J Neurosci* 17:676-696.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M and Hall JC (1998) The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681-692.

Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M (2004) Coupled oscillators control morning and evening locomotor behavior of *Drosophila*. *Nature* 431:862-868.

Stoleru D, Peng Y, Nawathean P, Rosbash M (2005) A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature* 438:238-242.

Südhof TC, Czernik AJ, Kao H-T, Takei K, Johnston PA, Horiuchi A, Kanazir SD, Wagner MA, Perin MS, DeCamilli P, Greengard P (1989) Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* 245:1474 –1480.

Sved J (1986) *Drosophila* Information Service 63:169.

Tabuchi K, Sawamoto K, Suzuki E, Ozaki K, Sone M, Hama C, Tanifuji-Morimoto T, Yuasa Y, Yoshihara Y, Nose A, Okano H. (2000) GAL4/UAS-WGA system as a powerful tool for tracing *Drosophila* transsynaptic neural pathways. *J Neurosci Res.* 59(1):94-9.

Thompson CL, Blaner WS, Van Gelder RN, Lai K, Quadro L, Colantuoni V, Gottesman ME and Sancar A (2001) Preservation of light signaling to the suprachiasmatic nucleus in vitamin A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11708-11713.

Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, Kazantsev A, Hsu DS, Petit C, Selby CP, Dawut L, Smithies O, Takahashi JS and Sancar A (1998) Role of mouse

cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282:1490-1494.

Truman JW (1972) Physiology of insect rhythms. II. The silkworm brain as the location of the biological clock controlling eclosion. *J Comp Physiol* 81:99-114.

Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC, Stanewsky R (2003) A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr Biol* 13:1758-1767.

Veleri S, Rieger D, Helfrich-Förster C, and Stanewsky R (2007) Hofbauer-Buchner eyelet affects circadian photosensitivity and coordinates TIM and PER expression in *Drosophila* clock neurons. *J Biol Rhythms* 18:377-391

Waltenspiel B (2005) Identifizierung und Charakterisierung photorezeptorspezifischer Antigene in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit Universität Regensburg

Wegener C, Hamasaka Y, Nassel DR. (2004) Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ via nicotinic receptors in cultured PDF-containing clock neurons of *Drosophila*. *J Neurophysiol.* 91(2):912-23.

Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan I, Desplan C.(2006) Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature.* 440(7081):174-80.

Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS and Hall JC (1993) Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J Biol Rhythms* 8:67-94.

Yang Z, Sehgal A (2001) Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29:453-467.

Yasuyama K and Meinertzhagen IA (1999) Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 412:193-202.

Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, Kagamiyama H, Jishage K, Ueda O, Suzuki H, Tabuchi K, Sawamoto K, Okano H, Noda T, Mori K. (1999). A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. Neuron 22:33–41.

Yoshii T, Funada Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K (2004) *Drosophila cry^b* mutation reveals two circadian clocks that drive locomotor rhythm and have different responsiveness to light. J Insect Physiol 50:479-488.

Zerr DM, Hall JC, Rosbash M, Siwicki KK (1990) Circadian fluctuations of *period* protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. J Neurosci 10:2749-2762.

Zipursky SL, Venkatesh TR, Teplow DB, Benzer S. (1984) Neuronal development in the *Drosophila* retina: monoclonal antibodies as molecular probes. Cell. 36(1):15-26.

7.6 Glossar

ZT	:	Zeitgeber Zeit
CT	:	circadiane Zeit
LD	:	Licht-Dunkel Wechsel
DD	:	Dauerdunkel
LL	:	Dauerlicht
LM	:	Licht-Mondlicht Wechsel
R1 – R6:		Rezeptorzelle 1 bis 6 der Komplexaugen
R7, R8:		Rezeptorzelle 7 und 8 der Komplexaugen
Rh	:	Rhodopsin
l-LN _v	:	große ventrale laterale Neuronen
s-LN _v	:	PDF- positive kleine ventrale laterale Neuronen
5. s-LN _v :		PDF- negative kleines ventrales laterales Neuron
LN _d	:	dorsale laterale Neuronen
extra LN _d :		siehe LN _d
DN _{1a}	:	anteriore dorsale Neurone1
DN _{1p}	:	posteriore dorsale Neurone1
DN ₂	:	dorsale Neurone2
DN ₃	:	dorsale Neurone3
PDH	:	„pigment dispersing hormon“ Hormon der Krabbe
PDF	:	„pigment dispersing factor“ Homolog von PDH in der Fliege. Die Funktion von PDF ist eine andere als die von PDH
WGA	:	Weizenkeimagglutinin
GFP	:	grün fluoreszierendes Protein
ECFP	:	Enhanced (verbessertes) cyan (blau) fluoreszierendes Protein
EYFP	:	Enhanced (verbessertes) yellow (gelb) fluoreszierendes Protein
PcP	:	„precursor peptide“ Vorläuferprotein von dem PDF abgespalten wird.
NGS	:	„normal goat serum“ Serum aus Ziegenblut
TrX	:	Triton X (Detergens)

An dieser Stelle meiner Arbeit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die es mir ermöglicht haben in die Situation zu kommen eine Danksagung schreiben zu können.

Als Erste ist hier natürlich meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Charlotte Förster zu nennen. Unter ihrer Obhut hatte ich genügend Freiraum für kreatives Arbeiten und ebensolche Experimente. Dies hat mir die Arbeit stets wesentlich mehr zum Vergnügen als zur Last gemacht. Danke für das in mich gelegte Vertrauen. Danke für die wissenschaftliche Begleitung. Danke für die Freundschaft.

Aber meinen Weg haben noch weitere Wissenschaftler begleitet, so möchte ich Dr. Andre Fiala aus dem Biozentrum der Uni Würzburg danken, der mir die Gelegenheit gab, „meine“ Fliegen an seiner Anlage zu testen. Ich danke Prof. Dick Nässel und Dr. Yasutaka Hamasaka für die erfolgreiche Zusammenarbeit an unserer Veröffentlichung, ebenso wie Prof. Dr. Ralf Stanewsky und Dr. Shobi Veleri aus demselben Grund. Ich danke Dr. Orie T. Shafer und Kenji Tomioka für die Zusammenarbeit auf wissenschaftlicher Ebene.

Natürlich möchte ich nicht die „Regensburger“ vergessen: Prof. Dr. Stephan Schneuwly, PD Dr. Alois Hofbauer, Dr. Corinna Wühlbeck, die alle immer ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen „Sorgen“ hatten.

Besonderer Dank geht an die, ohne die meist dann gar nichts geht: an unsere technische Assistenz Frau Angelika Kühn, die so glaube ich, manchmal einfach zaubern kann.

Aber danke auch an Frau Eva Köppl, Frau Renate Reng und Frau Ursula Roth. Ich möchte mich bei meinen Kollegen Eva Grieshaber, Wolfgang Bachleitner und besonders Dr. Taishi Yoshii für die gute Zeit im Labor bedanken.

Viel Dank geht auch an die Studenten, die mir mit ihrer Arbeit bei meiner Arbeit geholfen haben. Danke also Christina Fraunholz, Lena Kempinger, Jochen Popp, Dominik Bichler, Rainer Dittmann und den vielen anderen.

Dank gebührt meinen Eltern, meiner Familie und zu guter Letzt meinem Mann Christian, der schon ganz drosophob ist ob der ganzen Erzählungen von Fliegen. Danke, dass du es mit mir aushältst.

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbstständig angefertigt und dabei keine anderen Hilfsmittel als die hier angegebenen benutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet. Die hier vorliegende Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Regensburg den 25.06.2007

Dirk Rieger