

**Temperatursynchronisation der circadianen Uhr  
von *Drosophila melanogaster*:  
Eine genetische und molekulare Untersuchung  
beteiligter Mechanismen und Rezeptoren.**



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

**vorgelegt von  
*Franz Thomas Glaser*  
aus  
*Straubing*  
2006**

Promotionsgesuch eingereicht am: 29.11.2006  
Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Stanewsky  
Universität Regensburg,  
Queen Mary University of London

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Ralf Stanewsky
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Charlotte Förster
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Gernot Längst

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

Albert Einstein

**„Wer hat an der Uhr gedreht...“**

Orchester Eric Frenzen & Solisten,  
Paulchen Panther

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Glaser F.T., and Stanewsky R. (2005) Temperature Synchronization of the *Drosophila* Circadian Clock. *Curr. Biol.* 15(15): 1352-1363.

# Inhaltsverzeichnis

## 1. EINLEITUNG

1.1	Hinführung.....	8
1.2	Geschichtlicher Abriss der Chronobiologie.....	9
1.3	Grundorganisation circadianer Systeme.....	12
1.4	<i>Drosophila melanogaster</i> als circadianer Modellorganismus.....	13
1.5	Das circadiane System von <i>Drosophila</i> .....	14
1.6	Die molekulare Basis der circadianen Uhr von <i>Drosophila</i> .....	15
1.7	Synchronisation der Uhr mit Licht, Dauerlicht (LL).....	19
1.8	Synchronisation mit Temperaturzyklen.....	22
1.9	Temperaturkompensation.....	24
1.10	Die Neuronen der circadianen Uhr im Fliegenhirn.....	25
	- Funktionen der Neuronengruppen.....	26
1.11	Die peripheren Oszillatoren, Die Rolle von CRY in der Peripherie...	27
1.12	Der Output des circadianen Systems.....	30
1.13	Ionenkanäle als potentielle circadiane Thermosensoren.....	31
	- TRP-Kanäle.....	31
	- DEG/ENaC-Kanäle.....	33
1.14	Thermosensoren der Fliege.....	34
1.15	Das <i>norpA</i> -Gen in <i>Drosophila</i> .....	36
1.16	Ziel der Doktorarbeit.....	38

## 2. MATERIAL UND METHODEN

2.1	Material.....	39
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.2	Oligonukleotide.....	39
2.1.3	“Hefe-Weizen-Agar” <i>Drosophila</i> -Aufzuchtmedium.....	40
2.1.4	Fliegenstämme.....	41
2.2	Genetische Methoden.....	43
2.2.1	EMS-Mutagenese.....	43
2.2.2	Rekombinationskartierung, Linkage Mapping.....	43
2.2.3	Sequenzpolymorphismen.....	44
2.2.4	Komplementationstest mit Defizienzen.....	44
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
2.3.1	Extraktion von gDNA, “single fly”.....	45
2.3.2	Extraktion von RNA.....	45
2.3.3	Spektralphotometrische Messung.....	45
2.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	45
2.3.5	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	46
2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.3.7	Sequenzierung mit fluoreszenten Stopp-Nukleotiden.....	46

2.3.8	Reverse Transkription (RT-PCR).....	46
2.3.9	Quantitative RT-PCR.....	47
2.3.10	m-RNA-Spleißanalyse, multiplex-PCR.....	48
2.3.11	<i>in-vivo</i> Biolumineszenzmessung der Genaktivität.....	49
	- Test adulter Fliegen.....	53
	- Semikulturen verschiedener Fliegengewebe.....	53
2.4	Immunohistochemie.....	54
2.4.1	Antikörper.....	54
2.4.2	Westernblot.....	54
2.4.3	Antikörperfärbung an wholemount Insektenhirnen.....	55
2.4.4	Konfokale Lasermikroskopie, Quantifizierung.....	55
2.5	Verhaltenstest.....	56
2.5.1	Analyse der Lokomotorrhythmik.....	56
	- Aktogramm.....	57
	- Daily Average.....	57
	- Periodogramm, MESA.....	57
	- Autokorrelation.....	58
	- Analyse der Phasenlage einzelner Aktivitätspeaks.....	58
2.6	Fehlerberechnung, Statistik.....	58
2.7	Datenbanksuche nach Verwandtschaften.....	59

### 3. ERGEBNISSE

3.1	<b>Die circadiane Temperatursynchronisation: Analyse der involvierten Mechanismen und Rezeptoren.....</b>	60
3.1.1	Temperaturinduzierte <i>per-luc</i> -Oszillationen in LL.....	60
3.1.2	Beitrag bekannter Thermorezeptoren.....	62
3.1.3	Die circadiane Thermorezeption ist gewebeunabhängig.....	64
3.1.4	Temperaturinduzierte Biolumineszenzsignale im <i>Clk<sup>Jrk</sup></i> - und <i>tim<sup>01</sup></i> -Hintergrund.....	69
3.1.5	Die 8.0- <i>luc</i> Expression ist nicht auf das Hirn beschränkt....	72
3.1.6	Differenz zwischen 8.0- <i>luc</i> -Adulten und separierten Hirnen.....	75
3.1.7	8.0- <i>luc</i> -Expression im <i>cry<sup>b</sup></i> -Hintergrund.....	76
3.1.8	Temperatursynchronisation von <i>per<sup>01</sup></i> ; <i>per-7.2</i> -Fliegen.....	78
3.1.9	Spleißen des untranslatierten 8. Introns der <i>period</i> m-RNA	79
3.1.10	Transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen tragen zur Temperatursynchronisation bei.....	81
3.1.11	Die Temperaturspanne der Synchronisation.....	84
3.1.12	Ionenkanäle als mögliche circadiane Thermorezeptoren...	86
	-Trp-Kanäle.....	86
	-DEG-ENaC-Kanäle.....	87

<b>3.2 Charakterisierung der Temperatur-Entrainment-Mutanten</b>	
<b><i>nocte</i> und <i>norpA</i></b> .....	89
3.2.1 Synchronisationsdefekt der Biolumineszenzrhythmen in Temperaturzyklen.....	89
3.2.2 Biolumineszenzrhythmen von <i>nocte</i> - und <i>norpA</i> -Kulturen...	94
3.2.3 PER-/TIM-Oszillationen in den Köpfen von <i>norpA</i> - und <i>nocte</i> -Fliegen.....	97
3.2.4 PER-Oszillationen in den Uhrneuronen der <i>nocte</i> -Fliegen..	100
3.2.5 Synchronisation der Lokomotorrhythmik von <i>nocte</i> - und <i>norpA</i> -Mutanten.....	103
3.2.6 Synchronisation an phasenversetzte Temperaturzyklen.....	107
<b>3.3 Eine Temperatur-Entrainment-Mutante in dem Multimarker-</b>	
<b>stamm <i>t v m wy sd os</i></b> .....	111
<b>3.4 Die Kartierung der <i>nocte</i>-Mutation</b> .....	113
-Datenbankanalyse des Gens CG17255.....	124
<b>4. DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	
4.1 Synchronisation der molekularen Rhythmen mit Temperaturzyklen in Dauerlicht (LL).....	130
4.2 Interaktion zwischen Licht- und Temperaturinputweg.....	131
4.3 Temperaturspanne der Synchronisation.....	132
4.4 Beteiligung bekannter Thermotaxis-Mutanten an der circadianen Thermorezeption.....	133
4.5 Beitrag von Ionenkanälen bei der Temperatureaufnahme der circadianen Uhr.....	134
4.6 Gewebeautonomie der circadianen Thermorezeption.....	136
4.7 Fehlende Temperatursynchronisation der isolierten Hirne.....	137
4.8 Beitrag der Peripherie zur Synchronisation des Hirns in Temperaturzyklen.....	138
4.9 Spleißen der <i>period</i> m-RNA ist irrelevant für das tägliche Entrainment durch Temperaturzyklen.....	140
4.10 Temperatursynchronisation involviert transkriptionelle und post- transkriptionelle Mechanismen.....	141
4.11 Die Funktion von <i>nocte</i> und <i>norpA</i> bei der Thermosynchronisation.	141
4.12 Isolierung und Kartierung der <i>nocte</i> -Mutation.....	144
4.13 Schematische Darstellung der Ergebnisse.....	146
<b>5. ANHANG</b> .....	147
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	154
<b>7. GLOSSAR</b> .....	156
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	159
<b>9. DANKSAGUNGEN</b> .....	183
<b>10. ERKLÄRUNG</b> .....	184

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Hinführung

Die Rahmenbedingungen auf der Erde sind stark von der Bewegung der Himmelskörper geprägt, so dass verschiedene physikalische Faktoren in Abhängigkeit der jeweiligen Planetenkonstellation dominieren. Daraus resultiert ein zyklischer Wechsel in Licht-Dunkel, Wärme-Kälte, Luftfeuchte und Gravitation. Diese zeitlich getrennten Phasen unterschiedlicher Qualität bieten dabei selektive Vorteile, wodurch sich deren Nutzung im Laufe der Evolution manifestierte. Neben örtlich-räumlichen Nischen, wie Luft, Wasser, Land, sowie der kontinentalen Lokalisierung existieren auch so genannte „zeitliche“ Nischen. Darin konnten Organismen entstehen, die ihre Lebensweise auf diese wechselnden Bedingungen abgestimmt haben: Pflanzen, die ihre Energie durch Photosynthese beziehen richten in der Lichtphase ihre Blätter der Sonne entgegen, Jäger nachtaktiver Beutetiere gehen bei Dunkelheit auf die Jagd. Bei den Cyanobakterien ergibt sich ein Konflikt zwischen oxigener Photosynthese und der Stickstofffixierung anhand sauerstoffsensibler Nitrogenasen, der die getrennte Regulation beider Prozesse erfordert (Reddy et al., 1993). Deshalb stellt es einen entscheidenden selektiven Vorteil dar, die zeitliche Periode „vorherzusehen“ und nicht erst auf äußere Reize zu reagieren.

Viele Organismen haben daher im Laufe der Evolution als Strukturen und Mechanismen zur Bestimmung der Zeit die „inneren Uhren“ entwickelt, deren Phasenlage sich an externe Faktoren (den „Zeitgebern“) synchronisiert (Bell-Pedersen et al., 2005; Lakin-Thomas and Brody, 2004; Dunlap et al., 2003). Organismen mit genetisch zerstörten Uhren sind lebensfähig. Dies belegt, dass solche zeitmessenden Strukturen nicht lebensnotwendig sind. Dennoch haben Konkurrenzversuche mit Cyanobakterien gezeigt, dass eine circadiane Uhr einen entscheidenden Selektionsvorteil bieten kann (Ouyang et al., 1998).

Unwissend über die Existenz innerer Uhren versuchte auch der Mensch durch verschiedene Hilfsmittel, wie den Kalendern (sumerischer Kalender: ca. 3000 v. Chr.; Stonehenge: ca. 2000 v. Chr.) und den Uhren (Wasseruhren, Sonnenuhren), zeitlich wiederkehrende Phänomene vorherzusehen, um das Leben besser nach diesen Ereignissen planen und ausrichten zu können. Solche Erfindungen beweisen die Einführung der „Zeit“ als einen abstrakten Begriff (Zeitverständnis).

Im Zuge der fortschreitenden Zeitoptimierung schuf sich der Mensch jedoch ein künstliches Umfeld, das eine Lebensführung ermöglicht, die von diesen natürlichen Phänomenen völlig abgekoppelt ist. Ein derartiges Verhalten steht allerdings häufig im Konflikt mit der inneren Uhr (Jetlag, Schichtarbeit), weshalb man heute versucht, die



Mechanismen und Zusammenhänge der circadianen Systeme zu verstehen. Auf diese Weise soll ermöglicht werden, erneut ein Gleichgewicht zwischen geschaffener Umwelt und den ursprünglichen Bedürfnissen des Menschen herzustellen.

## 1.2 Geschichtlicher Abriss der Chronobiologie

Der Begriff „Chronobiologie“ findet seine Wurzeln im Griechischen und beschreibt das Studium von Zeit und Leben (griechisch: *chronos*=Zeit, *bios*=Leben, *logos*=Studium). Bereits im 4. Jhd vor Christus erwähnte Androstenes in den Reiseberichten Alexander des Großen zeitlich wiederkehrende Blattbewegungen bei *Tamarindus indicus* als Reaktion auf äußere Einflüsse (Bretzl, 1903). Bis zu den ersten Ansätzen des Verstehens dieser Vorgänge mussten aber erst einige Jahrhunderte verstreichen. Der französische Astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan belegte im Rahmen eines Experiments, dass die tagesrhythmische Blattbewegung von *Mimosa pudica* selbst in Dunkelheit fortbesteht (de Mairan, 1729). Grundlage für diese Untersuchung war eine zufällige Beobachtung dieses Phänomens, als er aus Platzgründen eine Pflanze in den dunklen Kasten seines Schreibtisches sperrte. In weiteren Untersuchungen führte er die auftretenden Rhythmen auf einen pflanzeninternen Kontrollmechanismus zurück, wobei er damit dem Forschungsfeld der Chronobiologie den Weg ebnete. Rund 20 Jahre später präsentierte Carl von Linnè seine „Blumenuhr“, die den Zeitpunkt der Blütenöffnung für zahlreiche Blumenspezies bestimmt und die optimale Ausnutzung von zeitlichen Nischen offenbart (Linne, 1751). Bienen besuchen beim Sammeln von Nektar aus ökonomischen Gründen die geöffneten Blüten nach einem bestimmten Zeitplan, was im Gegenzug die Bestäubung von Blumen gleicher Spezies sicherstellt (Renner, 1960).

Basierend auf der Vorstellung, dass die Beobachtungen de Mairan's die Reaktion auf rhythmische Schwankungen der Tagestemperatur wären, analysierte Duhamel 1758 erneut die Blattbewegung von *Mimosa*. Infolgedessen wählte er eine stillgelegte Salzmine mit konstanter Dunkelheit und konstanter Temperatur aus, um diese Experimente zu wiederholen. Er konnte aber dennoch die fortdauernden rhythmischen Blattbewegungen der Pflanze feststellen (Duhamel, 1758). Die selbe Erkenntnis gewann auch Zinn, der ebenfalls de Mairan's Experimente in Absenz von Licht und Temperaturschwankungen erneut aufrollte (Zinn, 1759).

Im Jahre 1814 veröffentlichte der Franzose Julien-Joseph Virey eine medizinische Dissertation, die sich erstmalig ganz den biologischen Rhythmen widmet. Darin postuliert er unter anderem die Hypothese, dass lebende Uhren der Entstehung und Kontrolle

biologischer Rhythmen zugrunde liegen und durch periodische Wechsel der Umwelt synchronisiert werden. Zudem finden sich dort Spekulationen über den Zusammenhang zwischen Medikation und Verabreichungszeit, sowie Daten bezüglich rhythmischer Phänomene beim Menschen und des Verlaufes der Sterberate innerhalb eines Jahres (Virey, 1814). Der Schweizer Mykologe de Candolle belegte mit weiteren Untersuchungen an *Mimosa*, dass die im Dunkeln fortlaufenden Oszillationen über eine Periode von 22-23 Stunden verfügen, was nicht ganz einem 24-Stunden Tag entspricht (de Candolle, 1832).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zwar im Laufe der Jahre überwiegend akzeptiert, dass Pflanzen bestimmte Mechanismen zur Zeitmessung besitzen, doch erst 1932 konnte Bünning an *Phaseolus*-Pflanzen mit unterschiedlicher Periodenlänge mit Hilfe von Mendelscher Genetik nachweisen, dass diese innere Uhr der Pflanzen auf genetischen Grundlagen beruht (Bünning, 1932).

Pittendrigh zeigte 1954 an *Drosophila pseudobscura*, dass das „Schlüpfen“ der Fliegen rhythmisch reguliert wird und diesem kein erlerntes Verhalten zugrunde liegt. Darüber hinaus stellte er auch verschiedene Grundsätze auf, die für alle biologischen Uhren Geltung besitzen: 1. Entrainment: Die Fähigkeit der täglichen Synchronisation der Phasenlage mit exogenen Umweltfaktoren, den sog. Zeitgebern und 2. Temperaturkompensation: die Unabhängigkeit der Periode dieser Rhythmen von der Temperatur (Pittendrigh, 1954).

Als weiteres Charakteristikum kann angeführt werden, dass die endogene Schwingung tagesperiodischer Systeme in konstanten Bedingungen stets von 24.0 Stunden abweicht (Bünning, 1958), weshalb Franz Halberg 1959 den Begriff „circadian“ einführte (lateinisch: *circa*=ungefähr; *dies*=Tag; ~ 24 Stunden; Halberg, 1959).

Während alle bisherigen Ergebnisse auf Beobachtungen gestützt waren, erfolgte 1971 der Durchbruch. Ausgehend von verschiedenen Mutationen, die beim Schlüpfen von *Drosophila melanogaster* unterschiedlich lange Periodenlängen, oder den Verlust der Rhythmik verursachen führte deren Kartierung zu ein und demselben Gen, das deshalb *period* genannt wurde ( $per^S$ ,  $per^L$ ,  $per^{01}$ ; Konopka and Benzer, 1971).

In den folgenden Jahren brachte die Entwicklung neuer biologischer Techniken, sowie das wachsende Verständnis für molekulare Strukturen die komplexe Organisation der circadianen Systeme zu Tage. Mittlerweile ist bekannt, dass sich bei vielen Organismen in nahezu allen Sparten des Evolutionsbaumes Systeme zur Zeitmessung entwickelten (Dunlap, 1999; Bell-Pedersen et al., 2005), die unterschiedliche Rhythmen aufweisen können: circadian (~ 1 Tag), annual (~ 1 Jahr), lunar (~ 1 Monat) und tidal (~ 12 h,

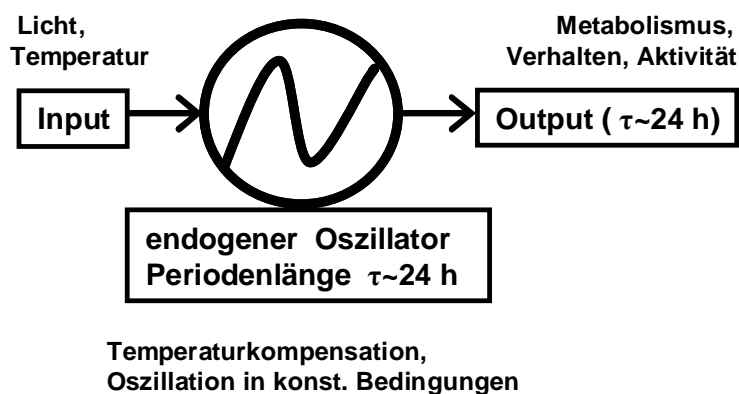
Ebbe/Flut). Abhängig vom Lebensort und dessen Gegebenheiten werden somit Aktivität, Nahrungssuche, Fortpflanzung und Stoffwechsel reguliert.

Gleichermaßen können auch beim Menschen verschiedene Rhythmen beobachtet werden: Neben dem Schlaf-Wach-Rhythmus unterliegen z.B. Körpertemperatur, Blutdruck, verschiedene Enzym-/Hormonspiegel, Konzentrationsfähigkeit, Schmerzempfinden und viele andere Prozesse einer rhythmischen Regulation (Hildebrandt et al., 1998; Moore-Ede, 1982). Die Einführung der künstlichen Beleuchtung eröffnete uns die Möglichkeit, den natürlichen Tagesrhythmus zu überwinden, was aber oft von Problemen begleitet ist. Der Einfluss der inneren Uhr auf das alltägliche Leben, sowie auf die physische und die psychische Gesundheit wird oft unterschätzt. So erkranken Menschen, die ihrer circadianen Zeit entgegenarbeiten (z.B. Schichtarbeiter) häufiger an Magengeschwüren oder Herzleiden (Knutsson, 2003; Drake et al., 2004) und weisen zudem ein deutlich erhöhtes Krebsrisiko auf (Schernhammer et al., 2001). Einfache Strategien, wie die Vermeidung heller Lichtstärken bzw. die Verabreichung von Melatonin können dem Körper helfen, sich besser an diese geänderten Aktivitätsphasen anzupassen (Eastman et al., 1994; Crowley et al., 2003).

Analog dazu bietet die Chronopharmakologie Ansätze, um konform mit dieser zeitlichen Regulation die Wirkung von Medikamenten zu optimieren oder deren Dosierung zu vermindern (Lemmer et al., 1996; Reinberg et al., 1997; Elliott, 2001). Bei der Behandlung von psychischen Krankheiten, wie zum Beispiel der Winterdepression, kann durch Einsatz der Lichttherapie in nahezu allen Fällen völlig auf eine Medikation verzichtet werden (Partonen and Magnusson, 2001). Ferner können auch die Nebenwirkungen, die bei der Behandlung von Krebsleiden auftreten reduziert werden. Dies wird ermöglicht, indem die chemotherapeutische Behandlung mittlerweile spezifisch zu solchen Zeitpunkten erfolgt, an denen die Krebszellen verwundbar sind und die gesunden Zellen am besten geschont werden können (Hrushesky et al., 2004; Kobayashi et al., 2002). Dies demonstriert, welchen Stellenwert das Verständnis der Grundlagen und Mechanismen der inneren Uhren besitzt.

### 1.3 Grundorganisation circadianer Systeme

Ein grundlegendes Modell gliedert circadiane Systeme in die drei Abschnitte: Input, Oszillator und Output (Abb. 1). Exogene Zeitgeber, wie Temperatur (Pittendrigh *et al.*, 1958), Luftfeuchtigkeit (Halket, 1931), Fütterung (Stephan *et al.*, 1979), Erschütterung (Förster and Engelmann, 1988) und soziale Kontakte (Levine *et al.*, 2002b) können innere Uhren „stellen“. Diese zeitlichen Informationen werden in einem endogenen Oszillator, der als „Uhrwerk“ fungiert, verarbeitet. Dessen temperaturkompensierte Schwingungen dauern auch in Abwesenheit von synchronisierenden Zeitgebern fort, und steuern über nachgeschaltete Gene (ccgs, *clock controlled genes*) verschiedene Abläufe, wie z.B. die Stoffwechselaktivität, sowie das Verhalten.



**Abb. 1. Schematisierte Darstellung eines circadianen Systems.** Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten: Input (Aufnahme exogener Rhythmen mit Periode  $T$ ), Oszillator (fortlaufende Oszillation mit endogener Periode  $\tau$  in Abwesenheit exogener Synchronisationsfaktoren), Output (vom Oszillator geregelte Prozesse, wie z.B. Metabolismus, Verhalten).

Für allen circadianen Systemen gelten die drei folgenden Merkmale:

- 1) sie werden durch Umweltreize synchronisiert (=Entrainment); Licht und Temperatur repräsentieren die beiden wichtigsten Zeitgeber für die meisten Organismen.
- 2) unter konstanten äußeren Bedingungen laufen sie mit ihrer charakteristischen, individuellen Schwingungsperiode (der sog. Freilaufperiode  $\tau$ ) von ungefähr 24 Stunden weiter.
- 3) sie sind temperaturkompensiert, d.h. ihre Periodenlänge bleibt über einen weiten Temperaturbereich hinweg konstant (Pittendrigh and Bruce, 1957). Für viele biologischen, insbesondere enzymatischen Prozesse bringt eine Erhöhung der Temperatur um  $10^\circ\text{C}$  eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2-3 mit sich (Van't Hoff-Regel;  $Q_{10}$ -Wert = 2-3). In circadianen Systemen berechnet sich der  $Q_{10}$ -Wert wie folgt: ( $\tau_1$ =Periode bei  $T_1$ ;  $\tau_2$ =Periode bei  $T_2$ , wobei  $T_1 < T_2$  und  $dT=10^\circ\text{C}$ ):  $Q_{10} = (\tau_2 / \tau_1)^{10/(\tau_2 - \tau_1)}$

## 1.4 *Drosophila melanogaster* als circadianer Modellorganismus

Im Laufe der Evolution entwickelten sich aus einfach aufgebauten Einzellern vielzellige Organismen unterschiedlicher Komplexität. Daraus resultierte eine Neuorganisation der Stoffwechselwege und Signalkaskaden, die auch eine Umstrukturierung des Genoms nach sich zog. Deutlich wird dies daran, dass sich einerseits Gene mit ähnlichen Funktionen zu einem einzigen neuen Gen formierten, während sich andererseits funktional verschiedene Bereiche eines Gens in mehrere separate Gene aufteilten (Genduplikation: Looby et al., 2005). Bei der Erforschung von Grundlagen ist es daher notwendig, Systeme mit niedriger Komplexität heranzuziehen. Auf diese Weise wird der Zugang zu verschiedenen Mechanismen in komplexen Organismen, wie z.B. den Säugern erleichtert.

Einen solchen Modellorganismus repräsentiert die Taufliege *Drosophila melanogaster*. Darüber hinaus lässt diese zudem noch ausreichend Analogie zum Säuger-System zu, da zahlreiche Gene sowohl im Menschen, als auch in der Fliege Homologe besitzen. Die Liste der Modellsysteme, die neben *Drosophila* zur Erforschung circadianer Fragestellungen zur Verfügung steht, ist mittlerweile sehr umfangreich (Bell-Pedersen et al., 2005; Vallone et al., 2005; Dunlap et al., 2003): Ratte, Maus, Zebrafisch, *Arabidopsis*, *Neurospora*, Cyanobakterien *Synechococcus*, *Gonyaulax*, *Aplysia* und viele andere. Doch aufgrund folgender Vorteile erfreut sich *Drosophila melanogaster* noch immer großer Beliebtheit in der circadianen Grundlagenforschung:

Die Generationszeit der Fliege ist kurz (~11 Tage) und deren Kultivierung unter Laborbedingungen gestaltet sich relativ unkompliziert und kostengünstig. Zum anderen konnten seit der Entdeckung dieses Modells für die klassische Genetik durch Thomas Hunt Morgan 1915 („The Mechanisms of Mendelian Heredity“) eine Reihe genetischer sowie molekularer Werkzeuge etabliert werden, wodurch dieser Organismus sehr einfach genetisch manipuliert werden kann. Dies führte dazu, dass mittels „forward genetics“ bereits viele neue Komponenten anhand *Drosophila* identifiziert werden konnten, die sich vollkommen von den bisher bekannten Strukturen unterscheiden, wie z.B. die Trp-Kanäle (Cosens and Manning, 1969), oder das *period*-Gen (Konopka and Benzer, 1971).

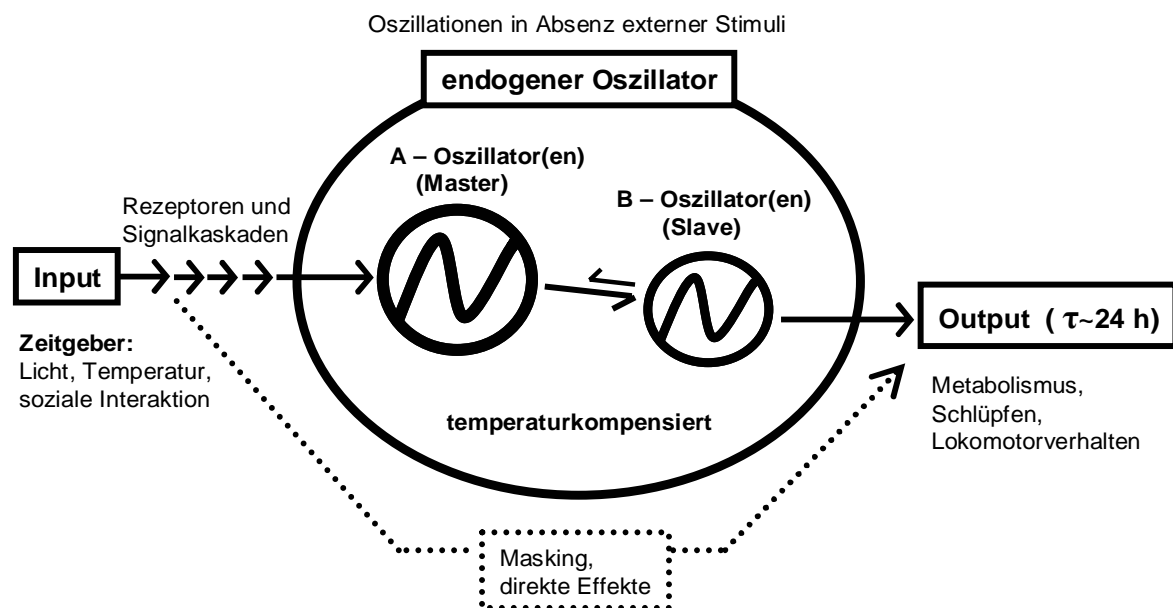
Diese Tatsache gewinnt umso mehr an Bedeutung, da mittlerweile sowohl das Genom von *Drosophila*, als auch das des Menschen vollständig sequenziert vorliegt (Adams et al., 2000; Venter et al., 2001). Die computergestützte Analyse des ca. 165 Mbp großen Fliegen-genoms konnte ca. 13 500 Gene identifizieren, die sich auf 2 Gonosomen (X, Y) und 3 Autosomen (II., III., IV.) verteilen. Ein Verzeichnis jener Gene befindet sich in einer öffentlich zugänglichen Datenbank (<http://flybase.bio.indiana.edu>), die darüber hinaus

detaillierte Informationen über deren Sequenz, Struktur, Funktion sowie über weiterführende Literatur und verfügbare Mutationen bereitstellt.

Neben diesen Vorteilen genetischer Art bietet *Drosophila* zudem zahlreiche Möglichkeiten, mit minimalem Aufwand die circadiane Rhythmik zu analysieren, da sich die Oszillationen der inneren Uhr in rhythmischem Schlüpf- und Lokomotorverhalten niederschlagen. Aus diesen Gründen stellt die Fruchtfliege einen optimalen Organismus für die Erforschung der circadianen Thermorezeption sowie deren molekularen Grundlagen dar.

## 1.5 Das circadiane System von *Drosophila*

Basierend auf Verhaltensexperimenten, deren Wurzeln bis in die 50er-Jahre zurückreichen, kann das circadiane System von *Drosophila* mit Hilfe des folgenden Modells beschrieben werden (Abb. 2; Pittendrigh et al., 1958; Pittendrigh et al., 1959; Pittendrigh, 1981; Helfrich-Förster et al., 2001; Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004; Stoleru et al., 2005; Rieger et al., 2006):



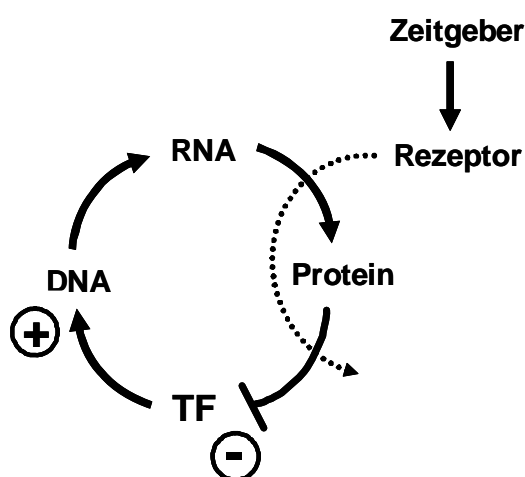
**Abb. 2. Die grundlegende Organisation des circadianen Systems von *Drosophila*.**

**Input:** Aufnahme verschiedener Zeitgeber (Licht, Temperatur, soziale Interaktion), sowie die Signalübermittlung an den endogenen Oszillator. **Endogener Oszillator:** temperaturkompensierte Oszillationen, die auch in Absenz externer Stimuli weiterlaufen. Es sind sowohl Master- als auch Slave-Komponenten daran beteiligt. **Output:** durch sog. ccgs (*clock controlled genes*) werden Metabolismus und Verhalten des Tieres gesteuert (z.B. rhythmische Schlüpfen aus der Puppe, rhythmische Laufaktivität). **Masking:** Externe Faktoren können direkt den Output beeinflussen und somit die Signale der inneren Uhr „maskieren“. Beispiel: Aufschrecken der Fliegen durch einen Anstieg der Temperatur, plötzliches Licht oder infolge sozialer Kontakte.

Der Licht-Dunkel-Wechsel stellt für *Drosophila* nicht den einzigen Zeitgeber dar. Es vermögen auch andere exogene Faktoren, wie Temperatur (Pittendrigh et al., 1958) und soziale Kontakte (Levine et al., 2002b) die innere Uhr zu synchronisieren. Dabei scheint das Fliegenhirn zumindest für das Lokomotorverhalten der Sitz des Masterszillators zu sein (Konopka, 1989), genauer gesagt die Uhrneuronen (Zerr et al., 1990, Ewer et al., 1992, Frisch et al., 1999). Diese sind in einem hierarchisch-kommunikativen Netzwerk organisiert und steuern dadurch verschiedene Komponenten des rhythmischen Verhaltens (Grima et al., 2004, Stoleru et al., 2004; Stoleru et al., 2005; Peng et al., 2003).

## 1.6 Die molekulare Basis der circadianen Uhr von *Drosophila*

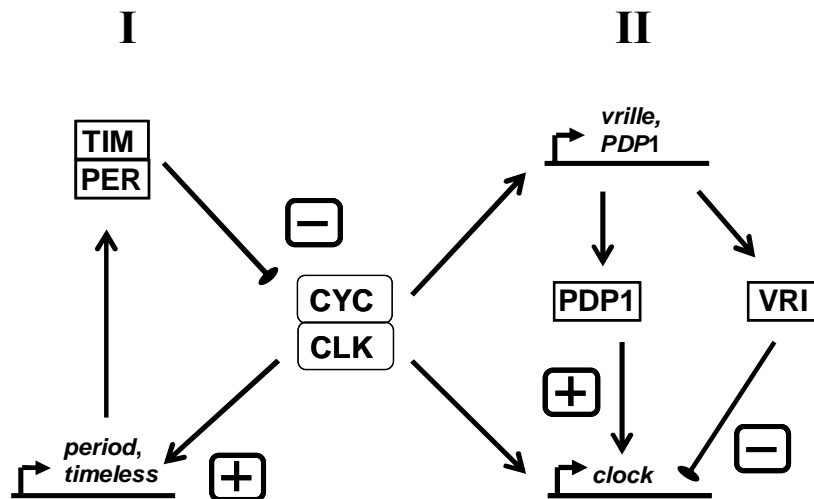
Die Identifikation des *period*-Gens durch Konopka und Benzer (1971) markiert einen Meilenstein der Aufklärung des molekularen Mechanismus circadianer Systeme. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass dem rhythmisch regulierten Verhalten eine genetische Basis zugrunde liegt. Im Laufe der Jahre brachte die Forschung weitere Komponenten ans Licht: *timeless* (*tim*: Sehgal et al., 1994), *Clock* (*Clk*: Allada et al., 1998), *cycle* (*cyc*: Rutila et al., 1998), *double-time* (*dbt*: Price et al., 1998), *vri* (*vri*: Blau and Young, 1999), *shaggy* (*sgg*: Martinek et al., 2001), Par domain protein 1 (*Pdp* 1: Cyran et al., 2003), CKIIa/b (Akten et al., 2003; Blau et al., 2003; Lin et al., 2002) und PP2A (Sathyanarayanan et al., 2004). Auffallend ist, dass sich nahezu alle, in der Natur identifizierten circadianen Systeme auf ein ähnliches Prinzip stützen: eine negative Rückkopplungsschleife auf molekularer Ebene (Abb. 3).



**Abb. 3. Schema einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife (nach Goodwin):** Ein Transkriptionsfaktor (TF) induziert durch Bindung an die DNA die Genexpression (+). Die RNA wird transkribiert und zum Protein translatiert, das anschließend seine eigene Expression hemmt (-). Die Synchronisation erfolgt über einen Zeitgeber. Dessen Signal wird durch Rezeptoren aufgenommen und beeinflusst die Konzentrationen beteiligter RNAs oder Proteine durch eine nachgeschaltete Signalkaskade.

An der Ausbildung der beschriebenen Schleife sind sowohl zentrale Komponenten beteiligt, die für die Oszillation verantwortlich sind, als auch solche, die den Rhythmus modifizieren. In *Drosophila* findet man zwei vernetzte Rückkopplungsschleifen, die durch

die Gene *Clk* und *cyc* verbunden werden. Während in der Hauptschleife die Transkription der essentiellen Komponenten PER und TIM gesteuert wird, reguliert die Nebenschleife die Transkriptionsfaktoren *vrille* und *Pdp1* (Abb. 4).



**Abb. 4. Schema der miteinander vernetzten Rückkopplungsschleifen.** Zentrale Komponenten sind CLK sowie CYC: sie liegen aktiv als Heterodimer vor und induzieren (+) in der Hauptschleife *period* und *timeless* (I), bzw. *vrille*, *Pdp1* und *clock* in der Nebenschleife (II). Andere Komponenten wirken hingegen inhibitorisch (-).

Die Gene *Clk* und *Cyc* kodieren für Transkriptionsfaktoren sowohl mit einer bHLH-Domäne (basic Helix-Loop-Helix), die unter anderem zur Dimerisierung beider Proteine dient, als auch mit einer PAS-Domäne (Per-Arnt-Sim), die den CLK-CYC-Heterokomplex und dessen DNA-Bindung stabilisiert (Erbel et al., 2003). Beide Proteine bilden in aktiver Form einen Heterodimer, der an die E-Box-Sequenzen (hexamerische DNA Struktur: 5'-CACGTG-3') bestimmter Gene bindet (Kyriacou and Rosato, 2000). Ähnlich *period* und *timeless* sind auch sie zentrale Komponenten der circadianen Uhr, da Mutationen in einem dieser Gene zum Verlust der Schlupf- und Lokomotorrhythmik führen (zusammengefasst bei Stanewsky, 2002a).

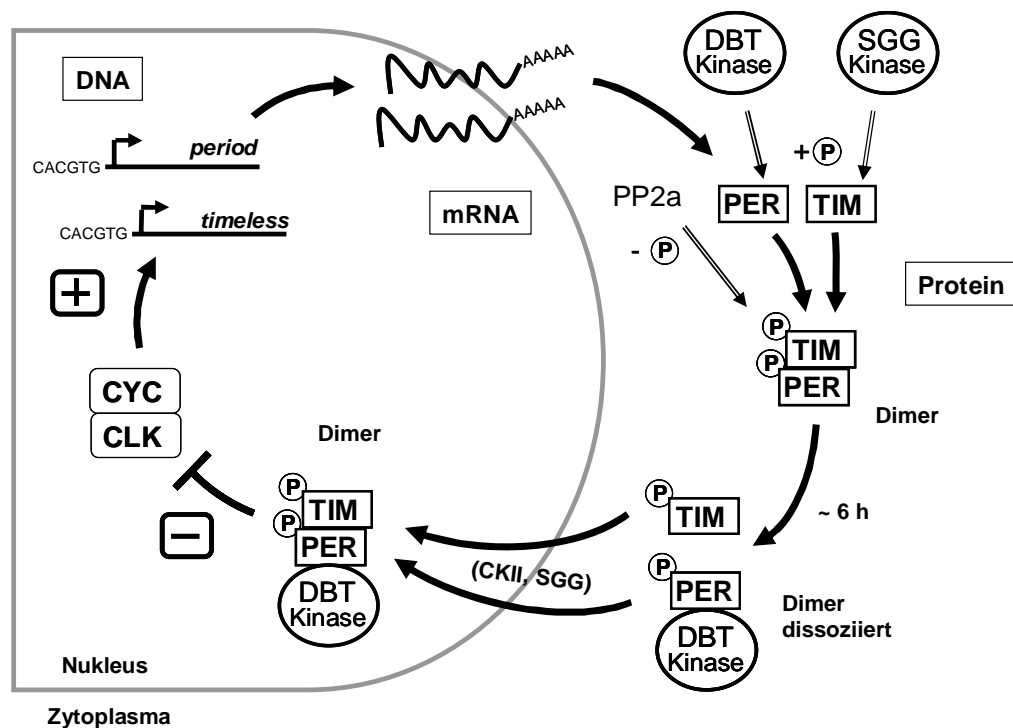
Die E-Box von *period* liegt ca. 500 bp *upstream* in einer 69 bp großen circadianen Regulatorsequenz (CRS). Dieser Sequenzbereich ist für rhythmische *period* m-RNA Oszillationen *in-vivo*, räumliche Expression und rhythmisches Lokomotorverhalten ausreichend und notwendig (Hao et al., 1997; Hao et al., 1999; Darlington et al., 2000; Lyons et al., 2000). Mutationen in den E-Box-Sequenzen von *period* und *timeless* führen nicht zum Zusammenbruch rhythmischer Transkription, sondern lediglich zu gedämpften Transkriptionslevels (Hao et al., 1997; McDonald et al., 2001). Folglich tragen Sequenzbereiche außerhalb der *period* E-Box essentiell zur Regulation räumlicher *period* Expression und rhythmischer Lokomotorrhythmik bei (Lyons et al., 2000).

In der Hauptschleife induziert der CLK-CYC-Dimer die Transkription von *period* und *timeless* (Abb. 5; Darlington et al., 1998; Lee et al., 1999). Daraufhin wandern m-RNAs



vom Zellkern ins Zytoplasma, wo sie in Proteine translatiert werden. Das PER-Protein wird durch die Kinase DBT phosphoryliert, wodurch es instabil wird (Kloss et al., 1998, Price et al., 1998).

Phosphoryliertes PER-Protein wird durch das F-Box-Protein SLIMB erkannt, ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Abb. 7; Grima et al., 2002). Die Kinase SGG phosphoryliert TIM (Martinek et al., 2001), welches das PER-Protein bindet und dessen Proteolyse verhindert. Die Proteinphosphatase 2a dephosphoryliert das PER Protein, wodurch dessen Abbau verzögert und die Dimerbildung begünstigt wird (Sathyanarayanan et al., 2004). PER und TIM akkumulieren im Zytoplasma, bis sich nach ca. 6 Stunden der Heterodimer auflöst und beide Proteine getrennt in den Nukleus wandern (Meyer et al., 2006; Shafer et al., 2002; Curtin et al., 1995). Die Kinase DBT tritt ebenfalls in den Zellkern ein (Kloss et al., 2001). Im Nukleus dimerisieren PER und TIM erneut (Meyer et al., 2006), hemmen den aktiven CLK-CYC-Dimer und stoppen somit ihre eigene Transkription (Lee et al., 1998; Lee et al., 1999; Bae et al., 2000).



**Abb. 5. Die molekulare Rückkopplungsschleife von PER und TIM**

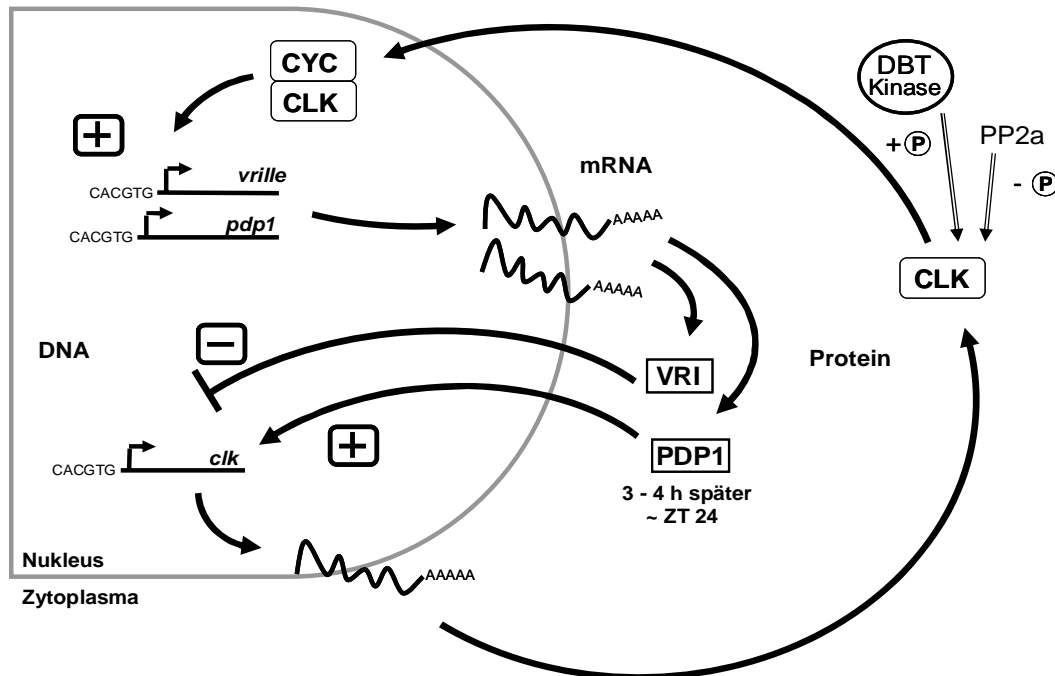
Ein Heterodimer der beiden Transkriptionsfaktoren CLK und CYC bindet an die E-Box-Sequenzen von *period* und *timeless*, um deren Transkription zu initiieren. Die m-RNA wandert ins Zytoplasma und wird dort in die Proteine PER und TIM translatiert, die einen Dimer bilden. Beide Proteine wandern getrennt in den Zellkern, um dort als Dimer die Transkriptionsfaktoren CLK und CYC zu inhibieren, wodurch ihre eigene Transkription gestoppt wird. An der Regulation dieser Rückkopplungsschleife sind auch die Kinasen DBT, SGG und CKII, sowie die Phosphatase PP2a beteiligt (siehe Text).

Der Eintritt von PER und TIM in den Zellkern wird durch die Kinasen *CKII* und *shaggy* unterstützt (Akten et al., 2003; Lin et al., 2005; Lin et al., 2002, Martinek et al., 2001), während DBT jenen Vorgang zu verzögern scheint (Bao et al., 2001). Diese drei Kinasen werden konstitutiv exprimiert, wohingegen bei den beiden regulatorischen Untereinheiten der PP2a, TWS (*twins*) und WDB (*widerborst*) die Expression in einem 24 h Rhythmus stattfindet (Sathyanarayanan et al., 2004). Dies offenbart deren wichtige Rolle bei der post-translatorischen Regulation der PER-Oszillation (durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung).

Die Expression von *cyc* erfolgt konstitutiv. Dagegen regulieren zwei weitere Transkriptionsfaktoren in der Nebenschleife die rhythmische CLK-Transkription (Abb. 6): Während PDP1 (bZIP; PAR=Proline and acidic rich) die CLK Expression induziert, wird diese durch VRILLE (bZIP= basic Leucine zipper) reprimiert. Anfangs aktiviert CLK-CYC die Expression von *vrille* und *Pdp1* (Cyran et al., 2003). Verursacht durch die zeitlich verzögerte Transkription akkumulieren die Proteine jedoch zu unterschiedlichen Zeiten im Zytoplasma. VRILLE erreicht sein Maximum in der frühen Nacht (ZT 13-17) und unterdrückt die weitere Transkription von CLK (Glossop et al., 2003), bis diese ca. 3-4 h später durch PDP1 erneut angeregt wird (Cyran et al., 2003). Dadurch erreicht die *Clk* mRNA zwischen ZT 22 und ZT 4 ihr Maximum im Zytoplasma. Während des Tages sind dort die Level an VRI und PDP1 niedrig, an CLK hingegen hoch, was wiederum zur Bildung des Heterodimers zusammen mit CYC führt. Daraufhin wandert dieser in den Zellkern, um von Neuem die Expression von *vri* und *Pdp1* zu aktivieren. Somit schließt sich dieser Zyklus.

Die Expression von *Clk* verläuft also antiphasisch zur *period* und *timeless* m-RNA (Lee et al., 1998; So and Rosbash, 1997; Sehgal et al., 1995; Hardin et al., 1990). Somit stellt sich die Frage, warum gerade während des Tages trotz des hohen Levels an CLK, und folglich an CLK-CYC, nur wenig *period* und *timeless* m-RNA vorhanden ist. PER und TIM inhibieren den CLK-CYC-Dimer lediglich gegen Ende der Nacht und in den frühen Morgenstunden (Darlington et al., 1998; Lee et al., 1998; Lee et al., 1999). Jedoch konnte gezeigt werden, dass das CLK-Protein einer post-translatorischen Regulation unterliegt (Kim et al., 2002) und darüber hinaus einen rhythmischen Wechsel in der Phosphorylierung aufweist (Yu et al., 2006; Kim et al., 2006). Realisiert wird dies unter anderem durch die beiden Antagonisten DBT und PP2a, da deren Wechselwirkung in Form von Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die Stabilität des CLK-Proteins reguliert (Kim et al., 2006; Yu et al., 2006).

Auf diese Weise akkumuliert das hyperphosphorylierte CLK-Protein zu jenem Zeitpunkt, in dem CLK-CYC durch PER inhibiert bzw. PER hyperphosphoryliert wird (Yu et al., 2006; Kim et al., 2002; Lee et al., 1998; Bae et al., 2000).



**Abb. 6. Die Regulation der rhythmischen *Clk*-Transkription in der Nebenschleife.**

Die *Clk* Transkription wird durch PDP1 induziert. Das CLK-Protein wandert in den Zellkern, wo es mit dem konstitutiv exprimierten CYC einen Dimer bildet. Durch Bindung an E-Box-Sequenzen wird die Transkription von *vrille* und *Pdp1* gestartet. Im Anschluss an die Translation wandert das VRI-Protein zurück in den Nukleus und inhibiert die *Clk* Transkription, bis ca. 3-4 h später das PDP1-Protein im Zytoplasma akkumuliert und diesen Zyklus erneut startet. Die Stabilität des CLK-Proteins wird durch DBT und PP2a reguliert (siehe Text).

## 1.7 Synchronisation der Uhr mit Licht, Dauerlicht (LL)

*Drosophila* besitzt mehrere auf Retinal basierende Rhodopsin-Photorezeptoren: die extern lokalisierten Komplexaugen (Helfrich et al., 2002), die Ocellen, sowie das Hofbauer-Buchner-Äuglein (*eyelet*; Hofbauer and Buchner, 1989; Helfrich-Förster et al., 2001; Kaneko, 1998; Yasuyama and Meinertzhagen, 1999). Die Synchronisation der circadianen Uhr kann jedoch nicht durch die genetische Ablation externer Photorezeptoren blockiert werden (*sine oculis*: Helfrich-Förster, 2002; Helfrich and Engelmann, 1983; *oc*<sup>1</sup>; *eya*<sup>1</sup>: Frisch et al, 1994). Fliegen, denen der Signalweg der visuellen Phototransduktion fehlt, *norpA* (PLC, PhospholipaseC) und *ninaE* (Sehpigment Rhodopsin Rh1, in den Rhabdomeren 1 bis 6), bringen ebenfalls robustelichtsynchronisierte Rhythmen hervor

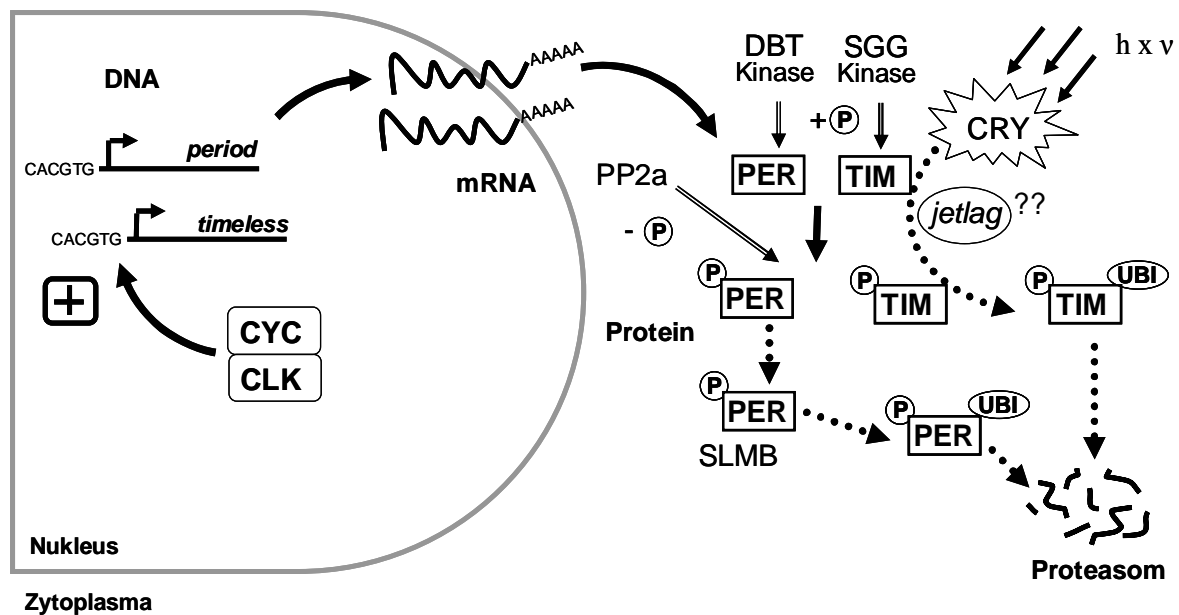
(Dushay et al., 1989; Zerr et al., 1990; Wheeler et al., 1993; Suri et al., 1998; Yang et al., 1998). Dies beweist, dass in „blinden“ Fliegen noch mindestens ein nicht-retinaler Photorezeptor mit einer PLC-unabhängigen Signalkaskade die Lichtinformation an die molekulare circadiane Uhr weitergibt. In einem EMS-Screen wurde der flavinbasierende circadiane Photorezeptor CRYPTOCHROM isoliert (Stanewsky et al., 1998), der sowohl im Körper, als auch im Kopf direkt in den Uhrzellen exprimiert wird (Ishikawa et al., 1999; Okano et al., 1999; Selby and Sancar 1999; Egan et al., 1999; Emery et al., 2000; Klarsfeld et al., 2004). Cryptochrome wurden ursprünglich als UV-A Blaulichtrezeptoren in Pflanzen (*Arabidopsis*) identifiziert (Ahmad and Cashmore, 1996). Das Transkript ist rhythmisch reguliert, die CRY-Proteinmenge wird stark durch Licht beeinflusst (Emery et al., 1998). Fliegen ohne Komplexaugen und HB-Eyelet zeigen Aktionsspektren, die eindeutig auf CRY als circadianes Photopigment schließen lassen (Helfrich-Förster et al., 2001), da sich deren Sensitivitätsspeak von ca. 420 nm mit dem von CRYPTOCHROM deckt (Selby and Sancar, 1999).

Der molekulare Mechanismus, womit Licht die Uhr von *Drosophila* synchronisiert, ist nur zum Teil bekannt und beruht auf dem Abbau des TIM-Proteins (Abb. 7; Ceriani et al., 1999). TIM *per se* ist jedoch nicht lichtempfindlich (Kaneko et al., 1997) und dessen Abbau erfordert weder die Komplexaugen (extra-retinaler Weg), noch eine funktionierende Uhr, was aufgrund von Experimente mit *sine oculis* und *per<sup>01</sup>* bekannt ist (Yang et al., 1998; Suri et al., 1998). Die Aktionsspektren für rhythmische Lokomotoraktivität und TIM-Degradierung sind identisch (Suri et al., 1998). CRY selbst besitzt zwar keine Photolyase-Funktion, jedoch lassen Sequenzhomologien vermuten, dass jenes, genau wie die DNA-Reparaturenzyme die Cofaktoren FAD und MTHF binden kann, um Energie aus Lichtquanten zu nutzen (Selby and Sancar, 1999).

Eine lichtabhängige Interaktion mit CRY führt zur Ubiquitinierung des TIM-Proteins (Abb. 7; *in-vitro*: Ceriani et al., 1999; *in-vivo*: Busza et al., 2004) und folglich zu dessen Abbau durch das Proteasom (Naidoo et al., 1999; Lin et al., 2001; Grima et al., 2002). Bei dem Ubiquitinierungsvorgang scheint das F-Box-Protein JETLAG eine wichtige Rolle zu spielen (Koh et al., 2006; Peschel et al., 2006). Da dies jedoch bisher nur für eine Isoform des TIMELESS-Proteins gezeigt wurde, bleibt die genaue Funktion von *jetlag* weiterhin unklar (Peschel et al., 2006).

Im Zytoplasma formieren TIM und PER zusammen einen Heterodimer. Als Folge der TIM-Degradation wird dieser Dimer zerstört und das monomere PER von der Kinase DBT hyperphosphoryliert (Price et al., 1998). SLIMB, ein weiteres F-Box-Protein, erkennt das

phosphorylierte PER-Protein und dirigiert dessen Ubiquitinierung mit anschließender Degradierung durch das Proteasom (Grima et al., 2002).



**Abb. 7: Synchronisation der molekularen Rhythmen durch Licht.** Der CLK:CYC Dimer induziert die Transkription von *period* und *timeless*. Deren m-RNA wird in Protein translatiert und durch *double-time* (DBT) bzw. *shaggy* (SGG) phosphoryliert. Beide Proteine formieren sich zu einem PER-TIM-Heterodimer. Vermittelt durch Cryptochrom induziert Licht die Ubiquitinierung von TIM. Das ubiquitinierte Protein wird durch das Proteasom verdaut, folglich kann kein Dimer mehr gebildet werden, wodurch PER von der Kinase DBT hyperphosphoryliert und ebenfalls über den Proteasom-Weg abgebaut wird.

Eine Mutation in *cryptochrom* (*cry<sup>b</sup>*) verursacht konstante Level an TIMELESS-Protein in den Photorezeptoren der Augen (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). In einigen Neuronen von *cry<sup>b</sup>*-Fliegen wird TIM jedoch weiterhin im Licht abgebaut (Stanewsky et al., 1998). Zudem kann im *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund lichtsynchronisiertes Lokomotorverhalten beobachten werden (Emery et al., 2000; Stanewsky et al., 1998). Dies zeigt, dass neben der CRY-abhängigen Synchronisation noch weitere Signalwege für den TIM-Abbau existieren. Diese kommen z.B. von den Komplexaugen, von dem HB-Äuglein, oder von noch unbekannten Photorezeptoren in den dorsalen Neuronen des Fliegenhirns (Rieger et al., 2003; Veleri et al., 2003; Helfrich-Förster et al., 2001).

In konstanter Dunkelheit (DD) und konstanter Temperatur (in Absenz exogener synchronisierender Faktoren) läuft die innere Uhr von *Drosophila* mit der endogenen Schwingungsperiode des Systems weiter (siehe Punkt 1.5). Konstantes Licht hoher Intensität (LL) in Verbindung mit konstanter Temperatur führt hingegen zu arhythmischen Lokomotorverhalten (Konopka et al., 1989; Hamblen-Coyle et al., 1992; Power et al.,

1995). Ursache dafür ist der Stillstand der molekularen Oszillationen (Price et al., 1995; Zerr et al., 1990; Marrus et al., 1996), der hauptsächlich auf der CRY-vermittelten Degradation des TIMELESS-Proteins basiert (Emery et al., 2000).

## 1.8 Synchronisation mit Temperaturzyklen

In der Natur ist das Auftreten von Licht mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Temperatur verwoben. Analog dazu repräsentieren rhythmische Schwankungen der Tagestemperatur einen weiteren synchronisierenden Faktor biologischer Uhren (Pittendrigh and Bruce, 1959). Während das circadiane System von *Neurospora* stärker auf Temperaturzyklen reagiert (Experimente mit konkurrierenden Licht- und Temperaturzyklen: Liu et al., 1998), besitzt Temperatur bei *Drosophila* einen, dem Licht nur untergeordneten Stellenwert (Wheeler et al., 1993). Gerade deshalb wurde die circadiane Temperatursynchronisation lange Zeit von der Forschung vernachlässigt.

Die Arbeiten von Zimmerman und Pittendrigh (1967) demonstrieren bereits, dass Temperaturschwankungen die circadiane Uhr von *Drosophila* zu stellen vermögen. Besonders interessant erscheint dies unter dem Gesichtspunkt, dass circadiane Systeme so konzipiert sind, dass der endogene Oszillator direkte Effekte der Temperatur auf die Periodenlänge kompensieren kann. Im Gegensatz zum Temperatur-Entrainment, bei dem durch zyklische Temperaturwechsel täglich die Phase der molekularen Oszillationen gestellt wird, verhindert die Temperaturkompensation durch justieren der Periodenlänge, dass die Oszillationen in hohen Temperaturen schneller bzw. in kalten Temperaturen langsamer ablaufen.

Eine Untersuchung des Zeitgebers Temperatur sollte auch nur im physiologisch-relevanten Bereich erfolgen, um nicht die Ergebnisse aufgrund einer Hitzeschock-Antwort oder durch temperaturgesteigerte Enzymaktivitäten zu verfälschen. Temperaturpulse im Bereich von 37° C, die eine Hitzeschock-Antwort auslösen, verursachen ein Phasendelay der inneren Uhr, aber nur wenn sie während der frühen Nacht verabreicht werden (Edery et al., 1994a; Sidote et al., 1998). Am frühen Tag hingegen können jene Pulse die Phase nicht nach vorne verschieben, was dagegen spricht, dass dieser Mechanismus die Temperatursynchronisation der circadianen Uhr widerspiegelt. Zudem führen nur Temperaturpulse außerhalb des physiologischen Bereich der Fliege (>30°C) zu einer Degradation von PER und TIM (Sidote et al., 1998).

*Drosophila*-Fliegen lassen sich in einer Temperaturspanne von 12°C bis 32°C kultivieren (Ashburner, 1989). Präferenz-Tests haben jedoch aufgedeckt, dass sich der bevorzugte

Bereich der Taufliege bei ca. 24°C befindet (Sayeed and Benzer, 1996; Lee et al., 2005, Hong et al., 2006). Höhere Temperaturen (> 29°C) verursachen Sterilität der Männchen (Ashburner, 1989), 32°C und mehr sogar den Tod. Die durchschnittliche Lebensdauer adulter Fliegen bei 37°C beträgt 2 Stunden (Lamb and McDonald, 1973) und vermindert sich bei 40°C auf 30 min. (Morrison and Milkman, 1978). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit Temperaturen unter 30°C gearbeitet. Da ein zyklischer Temperaturunterschied von nur 3°C ausreicht, um eine stabile Synchronisierung der Laufaktivität zu erreichen (Wheeler et al., 1993), wurde zudem eine Differenz von mindestens 4°C gewählt.

Frühere Publikationen belegen, dass sich sowohl die Schlupfrhythmik (Zimmerman et al., 1967), die Lokomotorrhythmik (Wheeler et al., 1993; Tomioka et al., 2001), als auch die molekularen Oszillationen von PER und TIM (Stanewsky et al., 1998) mit wechselnden Temperaturen im Dauerdunkel (DD) synchronisieren lassen. Dagegen haben neuere Studien aufgedeckt, dass der Einfluss des Zeitgebers Temperatur im Dauerlicht (LL) verstärkt wird: Während die Lokomotorrhythmik in DD nur mittels eines 24 Stunden Tages (12:12 h warm:kalt) synchronisiert werden kann, ist dies in LL über eine größere Spanne unterschiedlicher Tagesperiodenlängen möglich (Yoshii et al., 2002). Somit scheint Licht und Temperatur über verschiedene Signalwege zur inneren Uhr geleitet zu werden, da Dauerlicht in Kombination mit konstanten Temperaturen zu Arrhythmizität führt (Konopka, 1989; Marrus et al., 1996). Die molekularen Mechanismen, die der Synchronisierung der circadianen Uhr mittels Temperaturzyklen zugrunde liegen, sind aber noch völlig unbekannt.

Einen möglichen Ansatzpunkt bietet das circadiane System von *Neurospora*, dessen Temperatursynchronisation durch die Regulation der FRQ-Expression sowie des relativen Verhältnisses von *Frq*-lang/*Frq*-kurz infolge alternativen Spleißens des 6. Introns erfolgt (Diernfellner et al., 2005; Colot et al., 2005). In *Drosophila* findet auch ein ähnliches, temperaturabhängiges Spleißevent am 8. Intron des *period* Gens statt (Majercak et al., 1999). Diese reguliert die Akkumulation der *period* m-RNA und trägt so zur Synchronisation der Uhr an saisonalen Schwankungen in Tageslänge und Durchschnittstemperatur bei (Majercak et al., 1999; Majercak et al., 2004; Collins et al., 2004). Entgegen *Neurospora* hat dies aber keine unterschiedlichen Isoformen von PER zur Folge. Die Temperaturabhängigkeit dieses Ereignisses lässt jedoch einen möglichen Beitrag zum Temperatur-Entrainment vermuten.

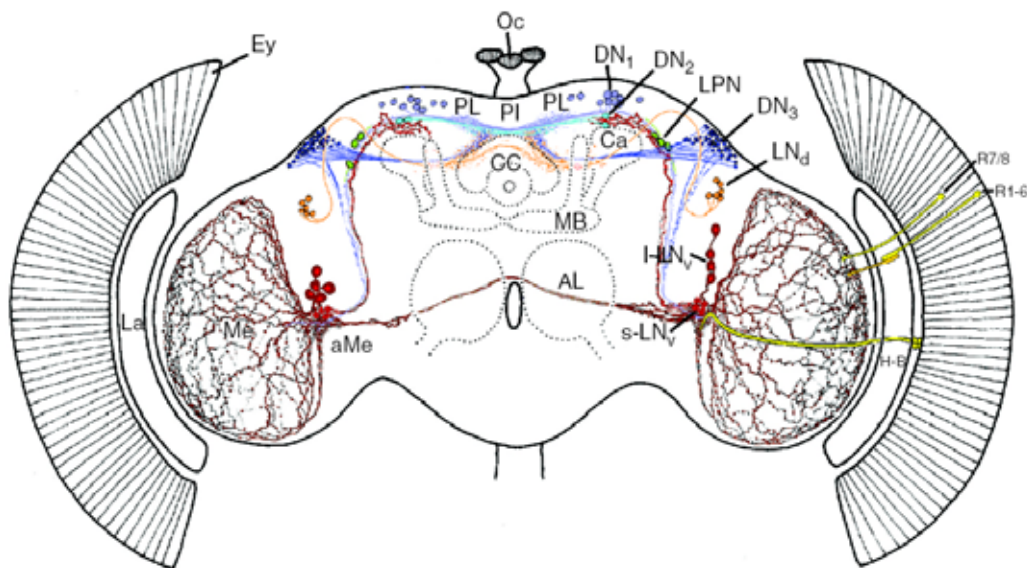
## 1.9 Temperaturkompensation

Eine Temperaturerhöhung um 10°C resultiert für gewöhnlich in einer Beschleunigung biochemischer Prozesse um den Faktor 2 bis 3 ( $Q_{10} = 2 - 3$ ). Somit bedarf es einer aktiven Kompensation dieser Effekte um einer starken Invarianz der circadianen Uhr entgegenzuwirken. Die Temperaturkompensation ist jedoch von der Synchronisation der circadianen Uhr anhand des Zeitgebers Temperatur abzugrenzen. Im Gegensatz zum Temperatur-Entrainment, bei dem durch zyklische Temperaturwechsel täglich die Phase der molekularen Oszillationen gestellt wird, verhindert die Temperaturkompensation durch Justieren der Periodenlänge, dass die Oszillationen in hohen Temperaturen schneller bzw. in kalten Temperaturen langsamer ablaufen (Pittendrigh, 1954). Eine Kompensation der endogenen Periode des circadianen Systems lässt sich in *Drosophila* mittels dem Lokomotorverhalten in konstanter Dunkelheit bei unterschiedlichen Temperaturen analysieren (cf. Hamblen et al., 1998). Innerhalb des PER-Proteins befindet sich eine repetitive Region, bestehend aus alternierenden Paaren der Aminosäuren Threonin und Glycin (Thr-Gly-Repeats), welche für die evolutionäre Anpassung der Periodenlänge an verschiedene Klimaverhältnisse verantwortlich ist (Sawyer et al., 1997). Abhängig von der Länge jenes Thr-Gly-Repeats beschränkt sich in Wildtypfliegen die Kompensation der endogenen circadianen Periode auf unterschiedliche Temperaturbereiche (Sawyer et al., 1987). Mutationen im Umfeld der PAS-Domäne des PERIOD-Proteins verursachen zudem eine defekte Kompensation der Freilaufperiode in verschiedenen Temperaturen (Schotland et al., 2000). Dies zeigt, dass in *Drosophila* das *period*-Gen essentiell in die Kompensation von Temperatureffekten involviert ist. Studien in *Neurospora* konnten aufdecken, dass in diesem Organismus die Stabilität des FRQ-Proteins hierfür eine wichtige Rolle spielt (Ruoff et al., 2005). Dieses Gen stellt die analoge Komponente zu *period* in *Drosophila* dar. Verschiedene *frq*-Mutanten verändern die Periode und zeigen eine veränderte Temperaturkompensation (Aronson et al., 1994), was wiederum mit der Stabilität dieses Protein korreliert (Ruoff et al., 2005).



## 1.10 Die Neuronen der circadianen Uhr im Fliegenhirn

Viele verschiedene Gewebe von *Drosophila* weisen eine rhythmische Expression der Gene *period* und *timeless* auf (Hall, 1995; Plautz et al., 1997). Es sind aber einzig die PER- und TIM-Oszillationen im Fliegenhirn, genauer gesagt in den Uhr-Neuronen, notwendig, um in Licht-Dunkel-Zyklen rhythmisches Lokomotorverhalten hervorzubringen, (Abb. 8; Zerr et al., 1990; Ewer et al., 1992; Frisch et al., 1999; Helfrich-Förster, 1995; Konopka, 1989; Hall, 2000; Handler and Konopka, 1979). Diese ca. 150 Neuronen werden anhand ihrer anatomischen Anordnung in zwei Gruppen eingeteilt: die lateralen (LN) und die dorsalen (DN) Neuronen (Kaneko, 1998; Helfrich-Förster, 2005).



**Abb. 8. Organisation der Uhrneuronen im Fliegenhirn (aus Helfrich-Förster, 2005).**

Aufgrund ihrer anatomischen Lage werden die PER-/TIM-exprimierenden Neuronen im Fliegenhirn in zwei Gruppen eingeteilt: die lateralen Neuronen (LN<sub>d</sub>, I-LN<sub>v</sub>, s-LN<sub>v</sub>; in rot/orange), sowie die dorsalen Neuronen (DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub>, DN<sub>3</sub>; in blau). Zudem befinden sich im posterioren Gehirnbereich die lateralen, posterioren Neuronen (LPN; in grün).

Legende: *Pars intercerebralis* (PI), *pars lateralis* (PL), *Central complex* (CC); Hofbauer-Buchner-Äuglein (H-B); akzessorische Medulla (aMe), Antennenlobus (AL); Komplexauge (Ey); Lamina (La); Pilzkörper (MB); Ocellen (Oc).

Die LNs umfassen vier Gruppen: im anterioren Gehirn die kleinen lateralen Neuronen (s-LN<sub>v</sub>, 5 Zellen), die großen lateralen Neurone (I-LN<sub>v</sub>, 4-6 Zellen), die dorsalen lateralen Neuronen (LN<sub>d</sub>, 5-8 Zellen) und die lateralen posterioren Neuronen (LPN, 2-3 Zellen; Shafer et al., 2006; Kaneko et al., 2000). Die Gruppe der dorsalen Neuronen setzt sich aus 3 verschiedenen Zellarten zusammen: die DN<sub>1</sub> (~15 Zellen), zwei DN<sub>2</sub>, die am oberen Ende der Calyces (Pilzkörper) des Gehirns liegen und ca. 40 DN<sub>3</sub> Neuronen, die sattelförmig am dorsalen Ende des Protozerebrums lokalisiert sind. Die einzelnen Neuronengruppen sind durch Projektionen in einem neuronalen Netzwerk organisiert, die

detaillierte Integration der LPNs ist aber noch unklar (Abb. 8; Helfrich-Förster, 1995; Helfrich-Förster, 2003; Helfrich-Förster, 2005).

Die s- und l-LN<sub>v</sub> exprimieren das Neuropeptid PDF (*Pigment dispersing factor*; Renn et al., 1999). Dabei bildet eine s-LN<sub>v</sub> Zelle die Ausnahme, die sich entwicklungsbedingt bei den l-LN<sub>v</sub>'s befindet (die 5.: Shafer et al., 2006; Rieger et al., 2006; Kaneko et al., 1998). Dieser Neurotransmitter wird für die Kommunikation und Synchronisation der einzelnen Neuronengruppen verantwortlich gemacht und trägt zur Rhythmizität in konstanten Bedingungen bei (Grima et al., 2004; Renn et al., 1999). Ein weiteres, circadianes Neuropeptid scheint IPNamide zu sein, das spezifisch in einer Untergruppe der DN<sub>1</sub> exprimiert wird (Shafer et al., 2006).

### **Funktionen der Neuronengruppen:**

Die Steuerung rhythmischen Verhaltens in Licht-Dunkel-Zyklen erfolgt durch die Neuronen im lateralen Gehirn, nahe den optischen Loben. Aus dieser Gruppe stellen die s-LN<sub>v</sub>'s den besten Kandidaten für den Hauptoszillator zur Steuerung rhythmischen Verhaltens dar: Experimente mit genetischer Ablation einzelner Neuronengruppen bzw. neuronenspezifischer Expression von Rettungs-Konstrukten ergaben, dass für rhythmisches Lokomotorverhalten in konstanten Bedingungen die LN<sub>v</sub>'s zwar nicht ausreichend (Peng et al., 2003), aber notwendig sind (Dushay et al., 1989; Zerr et al., 1990; Renn et al., 1999; Frisch et al., 1994; Ewer et al., 1992). In *disco*-Mutanten ist ihre Präsenz zudem mit rhythmischem Verhalten in DD gekoppelt (Helfrich-Förster, 1997). Die spezielle Rolle der s-LN<sub>v</sub>'s als Masteroszillator resultiert daraus, dass sogar noch nach 9 Tagen in konstanten Bedingungen (DD) Oszillationen der Proteine PER und TIM nachgewiesen werden können (Lin et al., 2004) und diese Neuronen andere zu dominieren scheinen (Stoleru et al., 2005).

Alle Neuronen sind in einem hierarchischen kommunikativen Netzwerk organisiert (Stoleru et al., 2005; Stoleru et al., 2004). Dabei Die s-LN<sub>v</sub>'s tragen maßgeblich zur Steuerung des Morgen- und Abendverhaltens bei (Rieger et al., 2006; Stoleru et al., 2005), wobei für die Regulation des Abendverhaltens zusätzlich die LN<sub>d</sub>'s benötigt werden (Grima et al., 2004). Die Funktion der dorsalen Neuronen ist noch weitgehend unbekannt, jedoch scheinen die DN<sub>2</sub> zur Regulation der rhythmischen Abendaktivität beizutragen (Stoleru et al., 2004; Stoleru et al., 2005). Eine noch unerforschte Gruppe von PER-/TIM-exprimierenden Neuronen repräsentieren die LPNs (Kaneko et al., 1998; Helfrich et al., 2005). Es existieren aber Hinweise auf eine spezialisierte Rolle in der

Temperatursynchronisation (Yoshii et al., 2005), obwohl auch in Licht-Dunkel-Zyklen robuste PER- und TIM-Oszillationen beobachtet werden können (Shafer et al., 2006).

Die DN<sub>3</sub> scheinen zudem eine Funktion an der Lichtsynchronisation der inneren Uhr zu besitzen, da nach Ablation aller bekannten circadianen Lichtinputwege (Komplexaugen, HB-Äuglein, CRY) die molekularen Rhythmen über noch unbekannte Photorezeptoren mittels Licht synchronisiert werden können (Veleri et al., 2003).

### **1.11 Die peripheren Oszillatoren, Rolle von CRY in der Peripherie**

Neben den Uhr-Neuronen im Fliegenhirn, die bei *Drosophila* das Zentrum der rhythmischen Steuerung bilden (Kaneko et al., 1998; Helfrich et al., 1998, Helfrich et al. 2001), befinden sich in verschiedenen Körpergeweben sogenannte periphere Oszillatoren (Giebultowicz, 2001). In LD-Zyklen konnten in Kulturen von separierten Augen, Antennen, Proboscii, Flügel, Beinen, Antennen (Plautz et al., 1997b), in Zellen der Thoraxganglien bzw. der Prothorakaldrüsen (Emery et al., 1997; Myers et al., 2003), in den Malphigischen Gefäßen (Hege et al., 1997; Giebultowicz et al., 2001; Giebultowicz und Hege, 1997), sowie in den Gonaden (Plautz et al., 1997; Liu et al., 1988, Giebultowicz, 2000a; Beaver et al., 2002) Oszillationen der Uhrkomponenten PER und TIM festgestellt werden. Die molekularen Oszillationen dieser separierten Gewebeteile lassen sich mittels Licht synchronisieren und ebenso an phasenversetzte Zyklen resynchronisieren (Plautz et al., 1997b; Ivanchenko et al., 2001; Krishnan et al., 2001), was darauf hindeutet, dass jene Gewebe selbst sowohl einen eigenen Lichtsensor, als auch eine komplette circadiane Uhr aufweisen. Von einigen peripheren Oszillatoren (den antennalen Uhrzellen und den renalen Malphigischen Gefäßen) ist bekannt, dass sie, unabhängig von Gehirn und retinalen Photorezeptoren durch den Lichteinfall durch die Cuticula direkt synchronisiert werden können und diese Rhythmen in konstanten Bedingungen über eine Woche anhalten (Emery et al., 1997; Giebultowicz und Hege, 1997; Plautz et al., 1997b). Für die meisten Gewebe mag der circadiane Photorezeptor CRY für diese Synchronisation an Licht-Dunkel-Zyklen verantwortlich sein. Die Malphigischen Gefäße weisen jedoch trotz Ablation der Rhodopsin- und CRY-abhängigen Inputwege (durch *norpA*<sup>P41</sup>; *cry*<sup>b</sup>) einen Abbau des TIM-Proteins in Licht auf, welcher die Existenz eines noch unbekannten photorezeptiven Mechanismus vermuten lässt (Ivanchenko et al., 2001).

Im Vergleich zur Fliege sind die peripheren Oszillatoren im Säuger hingegen stark vom Masteroszillator im Hirn abhängig: Synchronisiert durch externe Lichtsignale via Retina

behält der SCN den Rhythmus über 3 Wochen - *in-vivo* und *in-vitro* (Yamazaki et al., 2000). Da aber in Säugern kein zellautonomer circadianer Photorezeptor existiert, können die Oszillatoren des SCN und der Peripherie an sich die Lichtinformation nicht aufnehmen (Herzog et al., 2003). Vermittelt durch Rhodopsine und Melanopsin gelangt die Lichtinformation über die Retina zum SCN (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2003) und anschließend mittels neuronaler und humoraler Signale in die Peripherie (Guo et al., 2005; Yamazaki et al., 2000). In Kultur zeigen die peripheren Oszillatoren andauernde Oszillationen, deren Phasen langsam desynchronisieren, was auf das Fehlen eines synchronisierenden Signals zurückzuführen ist (Yoo et al., 2004).

Interessanterweise können niedrig-amplitude Temperaturzyklen (vgl. Schwankungen der Körpertemperatur), die in Konkurrenz zu Licht-Dunkel-Zyklen stehen, *in-vivo* die peripheren Oszillatoren antiphasisch zu dem LD-Zyklus synchronisieren, während der SCN sich nur an den Licht-Zyklen orientiert (Brown et al., 2002). Manche Gewebe können auch aufgrund physiologischer Notwendigkeiten (z.B. Nahrung) ihren Rhythmus vom SCN entkoppeln, wie z.B. Leber, Niere, Herz und Pankreas (Damiola et al., 2000).

Bis auf die Antennen konnte aber in *Drosophila* keinem weiteren peripheren Oszillator eine zeitgebende Initiativrolle zugewiesen werden (Tanoue et al., 2004). Konstante Bedingungen verursachen trotz des autonomen Charakters der peripheren Uhren eine Dämpfung von RNA- und Protein-Oszillationen im Körper (Stanewsky et al., 1997; Plautz et al., 1997; Giebultowicz et al., 2000; Hardin et al., 1994), während im Hirn die Rhythmen fortbestehen (Lin et al., 2004; Veleri et al., 2003). Die Tatsache, dass in geköpften Fliegen ein circadianer Rhythmus der Dopaminrezeptor-Antwort existiert, der auch in konstanten Bedingungen anhält, weist aber darauf hin, dass die Oszillatoren im peripheren Nervensystem zumindest in Bezug auf die Regulation der Dopaminrezeptorantwort autonom sind (Andretic and Hersh, 2000). Bis jetzt konnte die genaue Funktion dieser peripheren Oszillatoren noch nicht geklärt werden. Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass sie zur rhythmischen Regulation bestimmter, gewebespezifischer Vorgänge beitragen oder unabkömmlich sind, wie z.B. die Oszillatoren der Prothorakaldrüse zur Steuerung der Schlupfrhythmik (Myers et al., 2003) und die Uhren der Antennenneuronen für die rhythmische Olfaktorik (Tanoue et al., 2004). Da sich die PER-Expression in den Flügeln und Beinen größtenteils auf die chemorezeptiven Basalzellen der sensorischen Borsten beschränkt (Plautz et al., 1997b), lässt dies aber auf einen Einfluss der peripheren Oszillatoren auf die gewebespezifische Aufnahme bzw. Weiterleitung exogener Reize schließen (Plautz et al., 1997b; Giebultowicz et al., 2000b). Eine Sonderstellung in der

Peripherie besitzen dabei die Ovarien, welche eine konstante zytoplasmatische PER-/TIM-Expression aufweisen (Beaver et al., 2003; Liu et al., 1988; Saez and Young, 1988; Hardin et al., 1994; Plautz et al., 1997b). Dies könnte aus dem Mangel an CRY resultieren, da die ektopische Expression von CRYPTOCHROM zum lichtinduzierten Abbau des TIM-Proteins führt.

Zusätzlich scheint CRY in den peripheren Geweben auch eine Rolle als Komponente des Oszillators zu spielen: Eine Mutation im *cryptochrom* Gen (*cry<sup>b</sup>*) zerstört molekulare und olfaktorische Rhythmen, sowohl während synchronisierenden LD-Zyklen, als auch unter konstanten Bedingungen (Collins et al., 2006; Krishnan et al., 2001, Levine et al., 2002a). Zudem wurde in den Oszillatoren der Komplexaugen aufgezeigt, dass CRY und PER zusammenwirken müssen, um die CLK/CYC-induzierte Expression zu reprimieren (Collins et al., 2006).

Im Gegensatz zu *Drosophila* bekleidet im Säuger CRY in allen Geweben eine zentrale Komponente der circadianen Uhr. Doppelmutanten im *mCry1* und *mCry2* Gen löschen das rhythmische Verhalten von Mäusen vollständig aus (van der Horst et al., 1999). Die beiden CRY-Gene scheinen die Funktion von TIM in *Drosophila* übernommen zu haben, und reprimieren zusammen mit mPER1 und mPER2 die Transkriptionsfaktoren mCLK/BMAL1 (zusammengefasst bei Stanewsky et al., 2003). Es besteht auch Grund zur Annahme, dass mCRY, ähnlich wie in *Drosophila*, zur Lichtsynchronisation der Säuger-Uhr beiträgt. Die mCRY1 und mCRY2 defizienten Tiere sind zwar in konstanten Bedingungen arrhythmisch, zeigen aber ein lichtinduziertes Verhaltensmuster, das nach der genetischen Ablation der Stäbchen verschwindet (Selby et al., 2000; van der Horst et al., 1999). Mäuse ohne funktionierende Stäbchen können jedoch mittels LD-Zyklen synchronisiert werden, woraus sich eine Involvierung von mCRY bei der circadianen Lichtaufnahme ergibt (Freedman et al., 1999; Selby et al., 2000). Es bestehen zwar Funktionsüberschneidungen in der CRY-Funktion zwischen *Drosophila* und dem Säuger-System, jedoch überwiegt in *Drosophila* die Photorezeptorfunktion, während in der Säuger-Uhr die Rolle als Repressor im Vordergrund steht.

## 1.12 Der Output des circadianen Systems

Jedoch regulieren die zentralen Komponenten der Uhr auf molekularer Ebene nicht nur ihre eigene rhythmische Expression, sondern geben diese zeitliche Information auch an nachgeschaltete Gene weiter. Bis jetzt konnten eine Reihe dieser uhrregulierten Gene (*clock controlled genes*, CCGs) identifiziert werden: *dfmr1* (Inoue et al., 2002; Dockendorff et al., 2002), *takeout* (So et al., 2000; Sarov-Blat et al., 2000), *Nfl* (Williams et al., 2001), *dCREB2* (Belvin et al., 1999), *Dreg-5* (*Drosophila rhythmically expressed gene 5*; vanGelder und Krasnow, 1996), *PKA* (Majercak et al., 1997), *lark* (Newby and Jackson, 1993; Newby and Jackson, 1996), *Crg-1* (*circadianly regulated gene-1*; Rouyer et al., 1997), *dunce* (Levine et al., 1994; Majercak et al., 1997), *na* (*narrow abdomen*, Lear et al., 2005) und *pdf* (Park et al., 1999).

Man geht davon aus, dass ca. 1-6 % aller Gene im Kopf von *Drosophila* rhythmisch exprimiert werden (vanGelder et al., 1995; Claridge-Chang et al., 2001; McDonald and Rosbash, 2001; Ueda et al., 2002; Ceriani et al., 2002). Der Einsatz genomweiter Analysen mittels Microarrays brachte eine Vielzahl rhythmisch regulierter Gene zu Tage: 134 (Claridge-Chang et al., 2001), 158 (McDonald et al., 2001), 115 (Ueda et al., 2001), 22 (Lin et al., 2003), 120 (Ceriani et al., 2002). Trotz der vielen Treffer umfasst die Schnittmenge aller Studien mit über 100 identifizierten Kandidaten nur 14 Gene. Zudem konnten nicht in jeder Studie alle bereits bekannten Komponenten der Uhr bestätigt werden.

Der rhythmische Output eines circadianen Systems manifestiert sich in wichtigen Prozessen (Verhalten und Metabolismus), die zur Ausschöpfung der zeitlichen Nische notwendig sind, und z.B. das leicht messbare Schlüpf- und Lokomotorverhalten steuert. Man unterscheidet dabei zwischen:

- dem Output während eines synchronisierenden Regimes (Anwesenheit eines Zeitgebers), der die unmittelbare Reaktion eines circadianen Systems auf einen Zeitgeber bzw. dessen Wahrnehmung, Stärke und Einfluss reflektiert.
- dem Output des circadianen Systems unter konstanten Bedingungen (Abwesenheit von Zeitgebern: DD, konst. Temperatur): Da hier das circadiane System ohne äußere synchronisierende Faktoren „freiläuft“, kann die endogene Periode (Eigenschwingung) einer circadianen Uhr beobachtet werden. Dies ermöglicht einerseits, die Synchronisation der circadianen Uhr mittels eines Zeitgebers (Entrainment) zu analysieren, und sie andererseits von direkten (maskierenden) Effekten zu differenzieren.

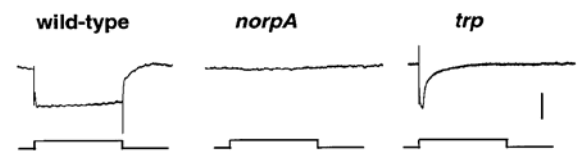
### 1.13 Ionen-Kanäle als potentielle circadiane Thermosensoren

Das Überleben vieler Lebewesen hängt stark von der Fähigkeit ab, externe Signale wahrzunehmen und auf diese zu reagieren. Ein wichtiges Signal ist hierbei Temperatur, da einerseits starke Hitze oder intensive Kälte zum Tod führt, und andererseits dieser physikalische Faktor auch zur Synchronisation circadianer Uhren herangezogen werden kann. Die Realisierung thermorezeptiver Strukturen in der Natur ist sehr mannigfaltig und reicht von einfachen RNA-Temperatur-Rezeptoren bei Bakterien (Johannsen et al., 2002), bis hin zu den komplexen Thermosensoren der Haie (Brown et al., 2003). Die sensitivsten Rezeptoren treten aber bei den Vipern auf, deren Infrarot-Thermosensoren eine Wahrnehmung von Unterschieden im Bereich von nur 0,003°C ermöglichen (Bullock and Diecke, 1956). Die häufigsten Vertreter thermosensitiver Strukturen findet man aber unter den Ionenkanälen. An dieser Stelle regulieren Temperaturänderungen die Durchlässigkeit für bestimmte Ionen. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung repräsentieren die TRP- und DEG/ENaC-Kanäle ideale Kandidaten für circadiane Thermorezeptoren.

#### TRP-Kanäle

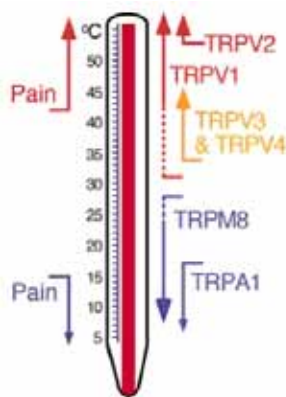
Viele Vertreter thermosensitiver Ionenkanäle entstammen dabei aus der TRP-Familie (=transient receptor potential). Diese besteht aus  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkanälen, die jeweils 6 Transmembranhelices und eine putative Porenregion aufweisen. Sie können ein oder mehrere externe Reize in elektrische Nervenimpulse umwandeln und ermöglichen somit neben der Thermorezeption auch Photorezeption, Audiosensorik, Olfaktorik, Mechanorezeption, Nozizeption, Chemorezeption und Hygrosensation. Der erste Vertreter dieser Familie wurde anhand einer spontanen Photorezeptor-Mutante in *Drosophila* isoliert (Cosens and Manning, 1969). In Vertebraten erfolgt die Photorezeption über das lichtinduzierte Verschließen eines zyklischen nucleotid-gesteuerten Kanals, sowie über das daraus resultierende hyperpolarisierende Membranpotential in den Photorezeptorzellen. Demgegenüber ist in *Drosophila* die PhospholipaseC (PLC) mittels eines G-Proteins an Rhodopsin gekoppelt. Wird dies durch Licht angeregt, löst eine PLC-vermittelte Aktivierung membrangebundener  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Depolarisierung aus, die in einem Rezeptorpotential resultiert. Da aber Lichtreize in der Retina dieser spontanen Photorezeptionsmutante nur ein vorübergehendes ("transient") Rezeptorpotential, anstelle eines Nachwirkenden ("sustained") auslösen, wurde das zugrunde liegende Gen *Trp* "transient receptor potential" genannt (Abb. 9; Voets and Nilius, 2003; Montell, 1999). Dagegen fehlt in *norpA*-Mutanten (*no receptor potential A*) dieses Potential vollständig, da

aufgrund der defekten Signalkomponente PLC das Lichtsignal nicht mehr weitergeleitet werden kann (Abb.9; Pearn et al., 1996). Basierend auf Sequenzhomologien werden die Trp-Kanäle in 7 Unterfamilien aufgegliedert (Vriens et al., 2004): TrpC (kanonische), TrpV (vanilloide), TrpM (Melastatin-artige), TrpN (nompC-artige), TrpA (AnkTM), TrpP (Polycystin-artige), TrpML (Mucolipin-artige).



**Abb. 9. Elektroretinogramme von Wildtyp-Fliegen, sowie *norpA*- und *trp*-Mutanten.** Lichtreize führen in der Retina von Wildtyp-Fliegen zu einem nachwirkenden Rezeptorsignal, in *trp*-Mutanten zu einem vorübergehenden (transient) oder in *norpA*-Mutanten zu gar keinem Potential. (Quelle: Montell, 1999)

In Säugern besitzen TrpV-, TrpM- und TrpA-Kanäle thermosensorische Fähigkeiten: Während die TrpV-Kanäle auf eine Temperaturerhöhung reagieren, werden die TrpM- und TrpA-Kanäle durch ein Absenken der Temperatur aktiviert, wobei jeder Kanal einen bestimmten Schwellenwert besitzt (Abb. 10; Tominanga and Caterina, 2004). Dadurch wird ermöglicht, dass eine große Spanne an Temperaturen wahrgenommen werden kann, die von schmerzhaft kalten ( $<8^{\circ}\text{C}$ ), bis hin zu schmerzhaft warmen Temperaturen ( $>52^{\circ}\text{C}$ ) reicht (Clapham et al., 2003; Voets and Nilius, 2003). In *Drosophila* wurden bisher 13 Vertreter dieser Familie identifiziert (Tab. 1), von denen einige auch als Thermosensoren fungieren (siehe 1.14). Fast alle dieser TRP-Kanäle können durch die reversible Bindung des Kalziumanalogs Lanthanchlorid an extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen inhibiert werden (Ramsey et al., 2006; Jung et al., 2003). Eine Ausnahme bildet der Trp-L Kanal (Venglarik et al., 2004; Hardie and Minke, 1992; Hochstrate, 1989; Suss-Toby et al., 1991).



**Abb. 10. Aktivierungstemperaturen von thermorezeptiven TRP-Kanälen bei Säugern.** Nahezu alle thermorezeptiven TRP-Kanäle der Säuger entstammen der Unterfamilie der TrpV-Kanäle. Diese werden durch eine Erhöhung der Temperatur aktiviert, während das Absenken der Temperatur bei den TrpM und TrpA Kanälen ein Signal auslöst.

(aus Tominanga and Caterina, 2004)



Familie	Gen	cyt. Pos.
TrpC (kanonische)		
	<i>Trp</i>	99C6
	<i>Trp-L</i>	46B2
	<i>Trp-γ</i>	36A9
TrpV (vanilloid)		
	<i>inactive</i>	6D3
	<i>nanchung</i>	70D3
TrpM (Melastatin)		
	CG30078/9	51E11
TrpP (Polycystin)		
	<i>PKD2</i>	33E3
TrpML (Mukolipin)		
	CG8743	76C3
TrpN (nompC-artige)		
	<i>nompC</i>	25D6
	CG31284	84E4
	<i>pyrexia</i>	61B2
TrpA (AnkTM)		
	<i>AnkTM1</i>	66E3
	<i>painless</i>	60E5

Tab. 1. Übersicht der identifizierten Trp-Kanäle in *Drosophila*.

## DEG-ENaC-Kanäle

Die DEG/ENaC-Familie stellt eine weitere Gruppe thermorezeptiver Kanäle zur Verfügung. Maßgeblich ist deren erster isolierter Vertreter (*deg-1*, *mec-4*) sowohl bei der Mechanorezeption, als auch bei der Neurodegeneration des Nematoden *Caenorhabditis elegans* beteiligt. Aus diesem Grund bezeichnet man diese Kanäle als Degenerine (DEG). Unter Einbeziehung der Sequenzhomologien mit dem amiloridsensitiven, epithelen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) ist auch die Bezeichnung DEG-ENaC geläufig (Welsh et al., 2001). Vorherrschend sind diese Vertreter ausschließlich in Lebewesen mit spezialisierten Organen für Reproduktion, Verdauung und Koordination, während andere Ionenkanäle (z.B.  $\text{H}_2\text{O}$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Kanäle) auch in den frühen Stadien der evolutionären Entwicklung auftreten (Kellenberger et al., 2002). Man kann sie sowohl in transportierenden Epithelien, als auch in neuronalen Geweben antreffen. Die Mitglieder der DEG-ENaC-Familie realisieren die Mechanotransduktion, die Propriozeption, die Nozizeption, die Neurotransmission, die Chemosensorik, die Thermosensorik, sowie die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes (Kellenberger et al., 2002; Welsh et al., 2002;

Askwith et al., 2001). Obwohl keine großen Sequenzübereinstimmungen vorliegen, sind jene Kanäle dennoch ähnlich aufgebaut: zwei kurze N- und C-Termini, zwei kurze membranspannende Segmente und eine große extrazelluläre Loop-Domäne (Welsh et al., 2001). Mehrere dieser Untereinheiten (4-9) gruppieren sich zu Homo- oder Hetero-Multimeren zusammen, um dadurch einen spannungsunabhängigen Ionenkanal zu formieren. Die Expression von DEG-ENaC-Kanälen von Menschen, Maus und Schnecke in *Xenopus* Oozyten hat gezeigt, dass der  $\text{Na}^+$ -Durchfluss temperaturabhängig erfolgen kann, was diese Kanäle als potentielle Thermosensoren entlarvt (Askwith et al., 2001). Bisher konnte man in *Drosophila* 19 Vertreter dieser Familie identifizieren (Tab. 2).

Bei allen DEG/ENaC-Kanälen wird durch die reversible Bindung von Amilorid an der extrazellulären Schleife die Pore geschlossen und somit der  $\text{Na}^+$ -Durchfluss unterbunden (Kelly et al., 2003; Ismailov et al., 1996). Dieser Hemmstoff blockiert dadurch sowohl in Vertebraten (Kinnamon, 1988), als auch in *Drosophila* (Jenkins and Tompkins, 1990; Liu et al., 2003b) die Wahrnehmung von Salz und Bitterstoffen.

Gen	cyt. Pos.
Rpk	82C5
Ppk1	35B1
Ppk4 (NaCH)	53C14
Ppk6	56F11
Ppk7	26C3
Ppk10	31E2
Ppk11	30C8
Ppk12	58E1
Ppk13	39A1
Ppk14	26C3
Ppk16	30C8
Ppk19	99B7
Ppk20	99B6
Ppk21	99B6
Ppk23	16B4
Ppk25	42E1
Ppk28	15A9
CG8546	66A1
CG32679	2D6

**Tab. 2. Übersicht der DEG /ENaC-Kanäle in *Drosophila*.**

## 1.14 Thermosensoren der Fliege

Die Thermosensorik der Fliege stellt einen noch nicht hinreichend untersuchten Bereich dar. Eine Verknüpfung klassischer Temperaturpräferenztests mit genetischen Methoden führte zur Identifizierung verschiedener Temperaturrezeptoren (Hong et al., 2006; Lee et al., 2005; Rosenzweig et al., 2005; Sayeed and Benzer, 1996).

Die manuelle oder genetische Ablation der Sensoren im dritten Antennensegment hat zur Folge, dass Fliegen in einem Temperaturgradienten ihre bevorzugte Umgebungstemperatur von ca. 24°C nicht mehr wahrnehmen können (Sayeed and Benzer, 1996). Dies wurde anhand der Mutanten *bizarre*<sup>1</sup> und *spineless-aristapedia* untersucht, die das Thermotaxisverhalten auf unterschiedliche Weise unterbinden: Während bei *spineless-aristapedia* (*ss*<sup>a</sup>) die Thermosensoren im 3. Antennensegment fehlen, da die Antennen

aufgrund einer homöothischen Mutation in Beine transformiert werden, verursacht die *bizarre*<sup>1</sup> Mutation eine strukturelle Modifikation des Gehirns (Sayeed and Benzer, 1996; D. Kretschmar, persönliche Kommunikation). Dadurch wird die Übertragung und Verarbeitung der Temperaturinformation gestört.

Jene antennalen Rezeptoren scheinen aber nur für niedrige Temperaturen im physiologischen Bereich zuständig zu sein, da trotz deren Ablation die Wahrnehmung von Temperaturen >33°C, bzw. von 3°C Differenzen weiterhin intakt ist (Zars, 2001). Interessanterweise zeigen Wildtyp-Fliegen in Auswahltests keine Reaktion auf 3°C bzw. 6°C Differenzen, wenn sich beide Temperaturen unter 24°C befinden (Zars, 2001). Grundlage für dieses Temperaturpräferenzverhalten bietet der Histamin-Signalweg und dessen Rezeptoren, die unter anderem auch in den l-LN<sub>v</sub>s exprimiert werden (Hong et al., 2006). Unter diesem Gesichtspunkt könnte der Histamin-Signalweg auch für die Temperatursynchronisation der circadianen Uhr relevant sein.

Untersuchungen an Larven zeigen, dass die Neuronen des terminalen Sinnesorgans auf kalte Temperaturen <18°C ansprechen, die multidendritischen Neuronen im Abdomen jedoch sowohl auf Hitze, als auch auf Kälte reagieren und zudem eine temperaturabhängige Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration aufweisen (Liu et al., 2003a). Die Ursache dafür könnte der TrpA- Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal sein, der für die larvale Thermotaxis verantwortlich ist (Rosenzweig et al., 2005). Allerdings ist noch unklar, ob dieser Thermosensor an der Thermotaxis adulter Fliegen beteiligt ist, da keine Histaminrezeptoren in den TrpA-exprimierenden Neuronen nachgewiesen werden konnten (Hong et al., 2006).

Elektrophysiologische Untersuchungen der larvalen Abdominalsegmente konnten mindestens 3 Arten von Neuronen identifizieren, die jedoch nur auf Temperaturen außerhalb des physiologisch relevanten Bereichs reagieren (Tracey et al., 2003). Die Divergenz dieser Temperaturspannen (29°C-38°C, 38-41°C und >41°C) lässt auf eine Spezialisierung bestimmter Neuronengruppen schließen, deren molekulare Grundlagen aber noch unbekannt sind (Tracey et al., 2003).

Ogleich in *Drosophila* bisher bereits 13 TRP-Kanäle identifiziert werden konnten (Tab.1), ist nur von *painless*, *TrpA* und *Pyrexia* die Fähigkeit der Temperatureaufnahme bekannt (Tracey et al., 2003; Rosenzweig et al., 2005; Lee et al., 2005). Dennoch ist es aufgrund der multisensorischen Fähigkeiten nicht möglich, eine Beteiligung der restlichen Kanäle bei der Temperatureaufnahme auszuschließen. Die beiden Kanäle *painless* und *Pyrexia* stellen Sensoren für die Wahrnehmung hoher Temperaturen >38°C (*painless*;

Tracey et al., 2003) sowie  $>40^{\circ}\text{C}$  (*Pyrexia* ; Lee et al., 2005) dar. Aufgrund der Tatsache, dass der Aktivierungsbereich dieser Rezeptoren außerhalb des physiologisch relevanten Bereichs liegt, kann der Beitrag zur circadianen Thermorezeption wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Dies lässt eher die Involvierung in die hitzeinduzierte Stressantwort vermuten (Lee et al., 2005). Im Gegensatz dazu steht der *TrpA*-Kanal. Obwohl dieser im Säuger als Kältesensor fungiert (Abb. 10), wird er in *Drosophila* bei ca.  $27^{\circ}\text{C}$  aktiviert und ist ein Sensor für die larvale Thermotaxis (Montell, 2005; Viswanath et al., 2003, Rosenzweig et al., 2005). Mit Ausnahme der Temperatursensoren des 3. Antennensegments und deren Signalweg konnten bisher keine Rezeptoren identifiziert werden, die an der Temperatureaufnahme adulter Fliegen beteiligt sind.

### 1.15 Das *norpA*-Gen in *Drosophila*

Zur Übermittlung von Signalen existiert eine Vielzahl verschiedener, molekularer Kaskaden. Eine davon repräsentiert der Inositolphosphatweg, an dessen zentraler Reaktion eine Phospholipase beteiligt ist. Diese Enzyme katalysieren die Spaltung zwischen Glycerin und dessen Seitengruppen, wobei man je nach Angriffsort dabei zwischen Phospholipase A1, A2, C und D unterscheidet. Immunologische und strukturelle Unterschiede der PhospholipaseC erlauben zudem eine weitere Einteilung in die Subgruppen  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , wobei die PLC- $\beta$  im G-Protein-vermittelten Signalweg agiert und die PLC- $\gamma$  durch Phosphorylierung von Tyrosin-resten aktiviert (Rhee et al., 1989, Pearn et al., 1996; Meldrum et al., 1991).

In *Drosophila* kodiert das Gen *norpA* (*no receptor potential*) für eine PhospholipaseC- $\beta$  (Kim et al., 1995). Diese ist an der Signalübertragung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) involviert, wie z.B. in der Signaltransduktionskaskade larvaler und adulter Photorezeptoren, downstream der Rhodopsine (Bloomquist et al., 1988). Licht verursacht eine Konformationsänderung des Retinals von der 11-cis- zur all-trans-Form, wobei Rhodopsin in den angeregten Zustand Meta-Rhodopsin übergeht. Die Spaltung von GTP zu GDP aktiviert ein heteromeres G-Protein (G-q- $\alpha$ ), das wiederum die PhospholipaseC (PLC- $\beta$ ) induziert. Diese vermittelt durch Spaltung der Glycerin-Phosphatgruppen-Bindung an dem Membranbestandteil Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) die Freisetzung der *second messenger* Moleküle Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerin (DAG).  $\text{IP}_3$  öffnet Calcium-Kationen-Kanäle am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und erhöht somit die intrazelluläre Calcium-Konzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ -Signal). Die Signalübertragung läuft dabei ca.

10-mal schneller ab, als in den Stäbchen der Vertebraten und repräsentiert dadurch die schnellste bekannte Kaskade G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Hardie and Raghu, 2002). Eine Form von *norpA* konnte nur in den Augen nachgewiesen werden (Schneuwly et al., 1991) und wurde in den Rhabdomeren lokalisiert (Smith et al., 1991). Alternativ gespleißte Formen von *norpA* treten aber auch in Geweben auf, die nicht auf die Aufnahme visueller Reize spezialisiert sind, wie z.B. Thorax, Abdomen, Beine und Hirne (Zhu et al., 1993; Ivanchenko et al., 2001). Dies zeigt, dass *norpA* neben der bekannten Rolle in der Phototransduktion auch an der Übermittlung anderer intrazellulärer Signale beteiligt ist (Kim et al 1995, Zhu et al., 1993). Eine weitere Funktion von *norpA* ist die Regulation eines alternativen Spleiß-Events der *period* m-RNA, das dazu dient, die innere Uhr an saisonale Schwankungen in Tageslänge und Durchschnittstemperatur anzupassen (Majercak et al., 2004; Collins et al., 2004). Aufgrund der Temperaturabhängigkeit könnte jener Spleißvorgang, und damit auch die PhospholipaseC an der Synchronisation der molekularen Uhr in Temperaturzyklen beteiligt sein.

## 1.16 Ziel der Doktorarbeit

Im Laufe der Jahre wurden bereits viele Details und Mechanismen des circadianen Systems von *Drosophila* beleuchtet: die molekularen Komponenten der Rückkopplungsschleife, deren Synchronisation durch Licht, und das „Feintuning“ durch Kinasen (Stanewsky, 2002a; Hardin, 2005). Die Signalwege und Mechanismen, mit deren Hilfe die innere Uhr durch den Licht-Dunkel-Wechsel (der stärkste Zeitgeber für *Drosophila*) gestellt wird, sind ausgiebig erforscht (Helfrich-Förster et al., 2001; Stanewsky et al., 1998). Analog zur Natur wirken z.B. in *Arabidopsis* Licht und Temperatur zusammen, um die innere Uhr zu synchronisieren und benützen gemeinsame Komponenten eines Signalweges (Blázquez et al., 2003). Die Ergebnisse der Verhaltensanalysen lassen auch bei *Drosophila* eine mögliche Interaktion beider Signalwege vermuten, da Temperaturzyklen im Dauerlicht einen stärkeren Zeitgeber darstellen, als im Dauerdunkel (Yoshii et al., 2002). Jedoch sind die molekularen Mechanismen, welche diesem Prozess zugrunde liegen, bis dato ungeklärt. Dies zeigt, dass es zum Verständnis circadianer Systeme von maßgeblicher Bedeutung ist, das lange Zeit vernachlässigte Gebiet des Temperatur-Entrainments näher zu erforschen.

In der vorliegenden Dissertation wird aus diesem Grund das Ziel verfolgt, detaillierte Einblicke in die molekulare Basis der circadianen Temperatursynchronisation von *Drosophila* zu gewähren. Dies umfasst die Untersuchung der fundamentalen Mechanismen, sowie der beteiligten Rezeptoren und Signalwege. Einen wichtigen Teil stellt dabei die Kartierung der im Vorfeld erzeugten Temperatur-Entrainment-Mutante *nocte* dar. Dadurch wird ermöglicht, neue Faktoren zu identifizieren, die maßgeblich an der Temperatursynchronisation beteiligt sind.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich und ROTH bezogen.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch Invitrogen und Sigma-Genosys.

Oligonukleotide	SEQUENZ (5' → 3')
<b>PER-DMPi8-Spleißen</b>	
Per_DMPi8 sense	TAGTAGCCACACCCGAGT
Per_DMPi8 rev	TCTACATTATCCTCGGCTTGC
cbp20 sense	GTCTGATTCGTGTGGACTGG
cbp20 rev	CAACAGTTTGCCATAACCCC
<b>Quantitative RT-PCR</b>	
PER-3823 sense	CACCTTCTGCGTGATGCTGC
PER-4023 rev	CTGCTCTTGATCGGAGTGGC
TIM sense	GCCACAACGAGAACAGCAG
TIM rev	AGGCGTCCACATCCATTT
cbp20 sense	GTCTGATTCGTGTGGACTGG
cbp20 rev	CAACAGTTTGCCATAACCCC

**Tab. 3. Oligonukleotide für den Spleißassay und die quantitative RT-PCR der *period* und *timeless* m-RNA.**

Oligonukleotide	SEQUENZ (5' → 3')	cyt. Pos.
<b>SNPs</b>		
CG13758 sense	CTACTGCAATTGGACCTGGG	3A4
CG13758 rev	CATCCAGCTCACACTTTCGG	
Dx sense	CAGTGCATCATCGAGGACGC	6B1
Dx rev	CAGGTCCAAGGTTTGTTCGC	
CG12151 sense	AATGCACTGCGTCTGCTGCC	7B7
CG12151 rev	CGTTCTCCCTCAGAACAAGG	
CG15245 sense	CCTGCGCTTTCGTCATGGCG	9A2
CG15245 rev	AGGTCAGGATGAGCAGACGC	
CG12645 sense	GTGAGCGTACAATCGGAAGG	9B2
CG12645 rev	GATACGGAAACAGGCAAGCG	
CG2222 sense	ACCTTCTCCTGGGTACG	9B14
CG2222 rev	GACCGAACAAGTTGTGTGC	
RabX2 sense	CGGTCATCCGAGAAACGC	9C1
RabX2 rev	GGATTGCTCCAGCTACGG	

**Tab. 4.1. Oligonukleotide zur Bestimmung der Sequenzpolymorphismen.**

Oligonukleotide	SEQUENZ (5' → 3')	cyt. Pos.
<b>SNP Primer</b>		
CG2124 sense	GCTGGTCACAGTGGTTATCG	9D3
CG2124 rev	AGCTGAGTTCTCCAGTTCCC	
Hop sense	TCCTTCATCTCCTACCTGGG	10B5
Hop rev	TCCTGCATCCATTTGCTCG	
CG15194 sense	CTCCCTGTCCATTTACTGCG	10B14
CG15194 rev	GGTCCACATGATGCACTGCC	
FucT6 sense	TGGAGCACACGAGACAGCG	10D6
FucT6 rev	AGCGCATCGTTCTCCAGCC	
CG15729 sense	CACCACTGCCACTCAAACGG	11B1
CG15729 rev	CACATGACGCACTGCAAGCC	
CG11085 sense	CAGAAGTACCTGAGCGTGGC	11B4
CG11085 Rev	GACGCAGTTGATTCTGTGCG	
Garnet sense	CAGGAGATGTCGTAGCCC	12B4
Garnet rev	GAGATCAAACAGGAGCTGCG	
CG5321 sense	TGATTTCGGAGGAGAGTCCGC	12F2
CG5321 rev	ACTTCGAGGATCCCGAGAGC	
CG9030 sense	AGAGAGGTAGATGGTSGCG	13A1
CG9030 rev	TATTGGTGCTGTCAGATGCC	
CG15029 sense	GTGCTGAGCAAGAAGCTCGGG	13B1
CG15029 rev	TTGCGGGATGGTTGAAGCGG	
CG9245 sense	GTCAACTGGTCTAGCATGGC	13E8
CG9245 Rev	CCTTCTGGTTCATGTCCACC	
CG32551 sense	CACGGATCTCGATTACCC	17B1
CG32551 rev	CGTCCATCACATCAGTGGG	
CG12531 sense	CGACCTGGAGTTGCATGTCG	18E3
CG12531 rev	CGACGACGAAGATGACGTGG	
CG1494 sense	GAATCTATGCTCCTCGAGCC	19F3
CG1494 rev	TTGAGCAGCGTAGTCTTGCC	
CG17598 sense	AGTGAACGAGGACCAGG	20C1
CG17598 rev	TGTGTACGGGAGATCTGG	

Tab. 4.2. Oligonukleotide zur Bestimmung der Sequenzpolymorphismen.

### 2.1.3 “Hefe-Weizen-Agar“-*Drosophila*-Medium:

Alle Fliegenstämme wurden bei 25°C bzw. 18°C und 65 % rel. Luftfeuchtigkeit in Gläschen mit Futter und Streuhefe aufgezogen. Das Aufzuchtmedium bestand aus: Leitungswasser (1 l), Agar (8 g), Rübensirup (22 g), Malzextrakt (80 g), Bierhefe (18 g), Sojamehl (10 g), Weizenmehl (80 g), und dem Antimykotikum Nipagin (3 g).



### 2.1.4 Fliegenstämme

STAMM	BESCHREIBUNG	LITERATUR
<b>Wildtypen</b>		
<i>Df(1) y w</i>	Wildtypstamm	Lindsley and Zimm, 1992
<i>CantonS</i>	Wildtypstamm	Konopka et al., 1989
<b>Balancer</b>		
<i>FM7c/arm</i>	X Balancer; <i>w<sup>a</sup> sn v B</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<i>attached-XX</i>	X-Balancer; <i>y w f</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<b>Luziferase Reporter</b>		
<i>y w BG-luc60</i>	BG- <i>luc</i> auf X.	Stanewsky et al., 1997
<i>y w ; BG-luc</i>	BG- <i>luc</i> auf III.	Stanewsky et al., 1998
<i>y w ; XLG-luc:1-3</i>	XLG- <i>luc</i> auf III.	Stanewsky et al., 2002
<i>NOG-luc</i>	<i>period</i> Promotor und nicht-translatierte Sequenz	Stanewsky et al., 2002
<i>plo</i>	<i>period</i> Promotor	Stanewsky et al., 1998
<i>y w ; 8.0-luc:2</i>	in DN <sub>s</sub> und LN <sub>ds</sub>	Veleri et al., 2003; Wuelbeck et al., 2004
<i>pe<sup>01</sup> ; 8.0-luc:2</i>	in DN <sub>s</sub> und LN <sub>ds</sub>	Veleri et al., 2003;
<i>y w ; 8.0-luc:9D</i>	in DN <sub>s</sub> , selten in LN <sub>ds</sub>	Veleri et al., 2003;
<i>per<sup>01</sup> ; 8.0-luc:9D</i>	in DN <sub>s</sub> , selten in LN <sub>ds</sub>	Veleri et al., 2003;
<i>norpA;8.0-luc9D</i>		
<i>norpA;8.0-luc9D;cryb</i>		
<b>Rhythmikmutanten</b>		
<i>y per<sup>01</sup> w</i>	<i>period</i> Nullmutante	Konopka and Benzer, 1971
<i>y w ; tim<sup>01</sup></i>	<i>timeless</i> Nullmutante	Myers et al., 1995; Sehgal et al., 1994
<i>w ; Clk<sup>Jrk</sup></i>	<i>Clk</i> Mutante, dom.-negativ	Allada et al., 1998
<i>y w ; cry<sup>b</sup> ss</i>		Stanewsky et al., 1998
<i>y w nocte, BG-luc60</i>	EMS-Mutante	Glaser and Stanewsky, 2005
<i>y per<sup>01</sup> 7.2:2a</i>	PER nur in LN <sub>s</sub>	Frisch et al., 1994
<i>y per<sup>01</sup> ; 7.2:9</i>	PER in allen Neuronen und peripheren Oszillatoren	Frisch et al., 1994
<b>Defizienzen, Duplikationen</b>		
<i>Df(1)ED6991/FM7j</i>	Defizienz, 8F9;9B4	Drosdel, Ryder et al., 2004
<i>Df(1)ED7005/FM7j</i>	Defizienz, 9B1;9B3	Drosdel, Ryder et al., 2004
<i>Df(1)ED7010/FM7j</i>	Defizienz, 9D3;9D4	Drosdel, Ryder et al., 2004
<i>Df(1)ED429/FM7j</i>	Defizienz, 9D3;9D3	Drosdel, Ryder et al., 2004
<i>Df(1)ED7042/FM7j</i>	Defizienz, 9D3;9F2	Drosdel, Ryder et al., 2004
<i>Df(1)c52, flw</i>	Defizienz, 8E;9C-D	
<i>Df(1)RJ7</i>	Defizienz, 9B2;9E3-4	
<i>Df(1)v-L15</i>	Defizienz, 9B1-2;10A1-2	
<i>Dp(1;2) v<sup>+</sup>75d</i>	Duplikation von 9A2;10C2 auf dem II. Chromosom	

Tab. 5.1. Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.

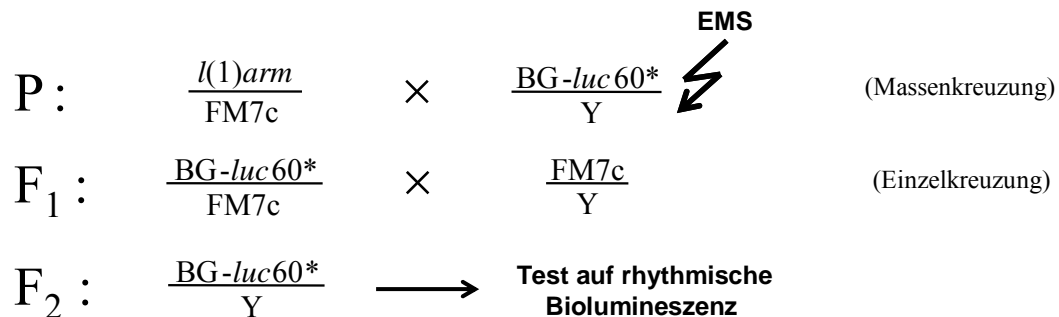
STAMM	BESCHREIBUNG	LITERATUR
<b>Trp-Mutanten</b>		
<i>EP(2)2251 pain<sup>2251</sup></i>	Trp-Kanalmutante	Tracey et al., 2003
<i>EP(2)2451 pain<sup>2451</sup></i>	Trp-Kanalmutante	Tracey et al., 2003
<i>Trp<sup>1</sup></i>	Trp-Kanalmutante	Cosens and Manning, 1969
<i>inactive<sup>1</sup></i>	Trp-Kanalmutante	Kaplan et al., 1977
<i>nanchung<sup>dy5</sup></i>	Trp-Kanalmutante	Kim et al., 2003
<b>sonstige Stämme</b>		
<i>norPA<sup>P24</sup></i>	<i>norPA</i> -Funktionsverlust, <i>w<sup>es</sup></i>	Pearn et al., 1996
<i>norPA<sup>P41</sup></i>	<i>norPA</i> -Funktionsverlust, <i>w<sup>es</sup></i>	Pearn et al., 1996
<i>ss<sup>a</sup></i>		Lindsley and Zimm, 1992
<i>hdc<sup>jk910</sup></i>		Burg et al., 1993
<i>disco<sup>2f</sup></i>		Dushay et al., 1989
<i>bizarre<sup>1</sup>/FM7a</i>	Thermotaxis, Neurodegeneration	Benzer, 1967
<i>y cv v f car</i>	Bloomington Stock Center	Lindsley and Zimm, 1992
<i>t v m wy sd os</i>	Bloomington Stock Center	Lindsley and Zimm, 1992
<i>l(1)G0097<sup>G0097</sup></i>	<i>P{lacW}</i> in CG17255 und zwei weiteren Genen	Peter et al., 2002

Tab. 5.2. Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 EMS Mutagenese

Ethylmethansulfonat (EMS) ist ein mutagenes Agens, das durch den Transfer einer Ethylgruppe auf das C<sub>6</sub>-Sauerstoffatom von Guanin hauptsächlich Transitionen (G→A, bzw. C→T auf dem antisense Strang) verursacht. Das dadurch entstehende Ethyl-O<sub>6</sub>-Guanin kann nur noch zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, weshalb es mit Thymin anstelle von Cytosin bindet. Die Durchführung EMS-Mutagenese erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Lewis and Bacher, 1968): Fliegen-Männchen wurden ca. 5 h ausgehungert und über Nacht mit 1% EMS (in 5% Saccharose-Lsg) gefüttert. Aus Kontroll- und Sicherheitsgründen wurde der Lösung ein blauer Lebensmittelfarbstoff beigeetzt. Die mutagenisierten Männchen wurden gegen einen X-chromosomalen Balancer gekreuzt um stabile Stämme zu erzeugen (Abb. 11).



**Abb. 11. Kreuzungsschema der EMS-Mutagenese.** Mutagenisierte Männchen wurden gegen FM7c-Balancer-Jungfrauen gekreuzt um stabile Stämme zu erzeugen (P). Die Untersuchung auf die Möglichkeit der circadianen Temperaturnahme erfolgte an den *per-luc* Männchen der F<sub>2</sub>-Generation. Da ein X-chromosomaler Balancer verwendet wurde, besitzen die Männchen im stabilen Stamm nur noch das mutagenisierte X-Chromosom (\*).

### 2.2.2 Rekombinationskartierung, Linkage-Mapping

Hierbei macht man sich das meiotische crossing-over bei der Anordnung der homologen Chromosomen während der Zellteilung der Keimzellen zu Nutze (homologe Rekombination), wobei aus zwei unterschiedlichen Chromosomen ein neues „patchwork“ Chromosom erzeugt wird. Mit wachsender Distanz zwischen zwei Punkten eines Chromosoms nimmt auch die Wahrscheinlichkeit zu, dass zwischen diesen ein Rekombinationsereignis erfolgt. Daher dient die genetische Kopplung auch als Maß für die physikalische Distanz, die in centiMorgan (cM) angegeben wird und eine Rekombinationshäufigkeit von einem Prozent angibt. Vor der Entschlüsselung des Genoms wurden diese Austauschhäufigkeiten dazu verwendet, um mit bekannten Mutationen eine

Karte eines Chromosoms zu erstellen (Abb. 63). Unter Verwendung eines Markerchromosoms (mit visuellen oder molekularen Markern) und der Analyse der auftretenden Frequenz bestimmter Markerkombinationen lässt sich somit die Position einer Mutation auf einem weiteren Chromosom bestimmen. Die Abstände berechnen sich wie folgt:

$$\text{Distanz (cM)} = (\text{Anzahl der Rekombinanten} / \text{Gesamtzahl der Nachkommen}) * 100$$

### 2.2.3 Sequenzpolymorphismen

SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) wurden als molekulare Marker verwendet, um Chromosomenabschnitte zu identifizieren (Hoskins et al., 2001; Berger et al., 2001; Martin et al., 2001; Teeter et al., 2000). Definitionsgemäß muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariation (die Allelfrequenz dieser Polymorphismen) größer als ein Prozent sein, andernfalls bezeichnet man diese Sequenzvariation als Mutation (Lewin, 2000). Werden diese Polymorphismen als molekulare Marker zur Kartierung benutzt, setzt dies die Erstellung einer SNP-Karte zwischen beiden verwendeten Chromosomen voraus (Tab. 19).

### 2.2.4 Komplementationstest mit Defizienzen

Defizienzen stellen bei der Positionsbestimmung rezessiver Mutationen ein hilfreiches genetisches Werkzeug dar. Dabei handelt es sich um wildtypische Chromosomen, die eine Deletion bestimmter Sequenzbereiche aufweisen. Für einen Komplementationstest kreuzt man das Defizienzchromosom über ein Chromosom, das die zu untersuchende Mutation enthält. Liegt diese außerhalb des fehlenden Bereichs, wird sie durch die wildtypische Kopie des Gens gerettet (=komplementiert). Befindet sie sich innerhalb der Deletion, so kann sie nicht gerettet werden, da nur die mutante Form des Gens präsent ist. Folglich kann dessen spezifischer Phänotyp beobachtet werden. Es existieren mehrere Arten von Defizienzen: 1) Klassische Defizienzen, die z.B. durch Röntgenstrahlung erzeugt worden sind und 2) molekular definierte, die durch die Flip-in / Flip-out Methode zwischen zwei *P*-Insertionen entstehen (Ryder et al., 2004; Parks et al., 2004). Kleine Defizienzen können zudem durch unpräzises Ausschneiden einer *P*-Insertion erzeugt werden (Robertson et al., 1988). Während bei den klassischen Defizienzen die Bruchpunkte in der Regel oft nicht genau bestimmt wurden, sind bei den molekularen Defizienzen die fehlenden Sequenzbereiche bis auf die Base genau bekannt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Extraktion von gDNA, „single fly“

Die Extraktion genomischer DNA aus einzelnen Fliegen („single fly“) erfolgte gemäß Gloor *et al.* (1993). Für eine 50µl PCR-Reaktion wurden jeweils 2 µl der gDNA als Template eingesetzt.

### 2.3.2 Extraktion von RNA

Die Präparation der gesamt-RNA erfolgte aus jeweils 20 Fliegenköpfen. Diese wurden mittels 250µl Trizol (vorgekühlt 4°C) für ca. 30 Sekunden homogenisiert, zentrifugiert, und die Nukleinsäuren mit 50µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Nach isopropanolischer Fällung erfolgte der Waschschriff mit 75% EtOH. Die getrockneten Pellets wurden in jeweils 15µl DEPC-Wasser resuspendiert. Verunreinigungen durch DNA wurden mit einem DNase-Verdau entfernt.

### 2.3.3 Spektralphotometrische Messung

Aufgrund der Absorptionen von Nukleinsäuren (aromatische Basen) bei 260 nm, sowie von Proteinen und Phenol bei 280 nm bzw. 320 nm (aromatische Aminosäurereste) lässt sich die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung durch Messung der optischen Dichte ermitteln. Anhand der konstanten  $OD_{260} = 1$ , die einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger Nukleinsäuren pro ml entspricht, kann man die DNA-Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  für reine DNA-Lösungen liegt bei ca. 1,8 und für RNA-Lösungen bei ca. 2,0. Kleinere Werte weisen auf Protein- oder Phenol-Verunreinigungen hin.

### 2.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Abhängig von den experimentellen Bedürfnissen wurden Agarosegele (PeqLab) mit einer Konzentration von 0,8-2,0 % in 1xTAE-Puffer (Sambrook et al., 2001) verwendet, wobei der interkalierende DNA-Farbstoff Ethidiumbromid (10 µl pro 170 ml) dem Gel direkt zugesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden mit  $1/5$  Volumen 6x DNA-Ladepuffer (Sambrook et al., 2001) auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese wurde bei etwa  $1 \text{ V/cm}$  über Nacht oder bei  $5 \text{ V/cm}$  für 2-3 Stunden durchgeführt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (254 nm), die Fragmentgrößen wurden in Vergleich zum Längenstandard bekannter Bandengrößen (1 Kb-Marker) abgeschätzt.

### 2.3.5 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, um UV-induzierte Strangbrüche zu vermeiden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick*<sup>®</sup>-Gelextraktionskit (Qiagen). Das Funktionsprinzip beruht dabei auf einer Glasmatrix, welche die DNA bei saurem pH-Wert absorbiert und in alkalischem Puffer wieder freisetzt.

### 2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifizierung bestimmter DNS-Stücke (Mullis and Faloona, 1987) erfolgte mit Taq<sup>+</sup>-Puffer (Sambrook et al., 2001), in *E. coli* exprimierten DNA-Polymerase (*Thermus Aquaticus*) und PCR-Maschinen der Fa. Biometra. Alle Oligonukleotide wurden durch die Firmen Invitrogen und Sigma synthetisiert.

### 2.3.7 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Stoppnukleotiden

Für die Sequenzierung wurden PCR-Produkte (200-900 bp) elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und deren Konzentrationen auf einem Gel im Vergleich zu einer Bande mit bekannter DNA-Menge abgeschätzt. Die Sequenzreaktion dieser Fragmente (100 ng DNA pro 500 bp) erfolgte mit fluoreszenz-markierten Stoppnukleotiden (*ABI BigDye*<sup>®</sup> Terminator 1.1, Applied Biosystems). Nach Fällung mit Natriumacetat / Ethanol wurden die DNA-Stücke in HiDi-Formamid resuspendiert und durch die Fa. GENEART AG (Biopark Regensburg) detektiert. Zur Analyse der Rohdaten wurde das Programm BioEdit herangezogen (Hall, 1999).

### 2.3.8 Reverse Transkription (RT-PCR)

Das Umschreiben der m-RNA in cDNA erfolgte mittels dem Invitrogen *Thermoscript*-Kit und Oligo(dT)<sub>20</sub> Primern. Dabei wurden pro Reaktion 2 µg der gesamten RNA eingesetzt.

Standardansatz:

RNA (2µg) + 1µl Oligo(dT)<sub>20</sub> + 2µl dNTP ad 12 µl mit DEPC-Wasser

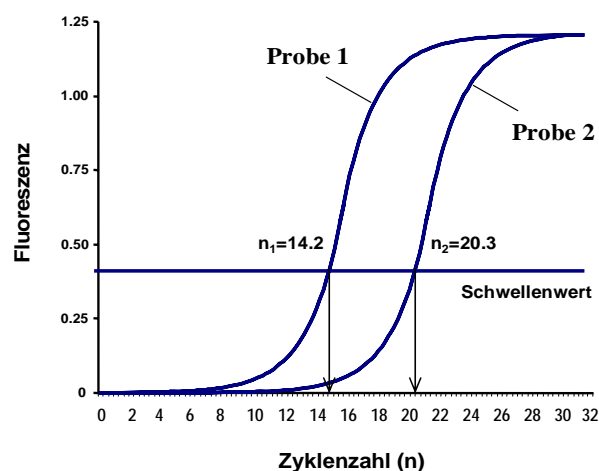
→ 5' bei 65°C, 4°C

4µl 5x buffer 2 µl DEPC-Wasser + 1µl RNaseOut + 1µl ThermoScriptRT

→ 40 ' bei 60°C → 5' bei 85°C + 1µl RNaseH → 20' bei 37°C

### 2.3.9 Quantitative RT-PCR

Die Analyse rhythmischer Oszillationen der *period* m-RNA erfolgte anhand der quantitativen RT-PCR. Dabei wird aus einer konstanten Anzahl von Köpfen ( $n=30$ ) synchronisierter Fliegen die gesamte RNA präpariert und anschließend quantitativ die m-RNA in cDNA umgeschrieben. Basierend auf der Tatsache, dass bei der Quantifizierung der SybrGreen-Kit von Roche zum Einsatz kam, durfte bei der Präparation kein DTT verwendet werden. Von den 20  $\mu$ l cDNA-Lösung wurden je 2  $\mu$ l für eine Reaktion im Lightcycler eingesetzt. Das Grundprinzip der Quantifizierung ist dabei eine einfache PCR-Reaktion. Der Unterschied ist nur, dass diese in Glaskapillaren stattfinden und zudem den fluoreszenten Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I beinhalten. Die Detektion erfolgt dabei im Lightcycler. Dies ist eine PCR-Maschine, die einerseits die Reaktionen mittels Luft aufheizt bzw. abkühlt und zudem die Fähigkeit der Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes besitzt. Ist dieser an doppelsträngige DNA gebunden, kann er mit einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden. Somit lässt sich am Ende jeder Amplifikationsrunde die Menge der erzeugten ds-DNA-Fragmente bestimmen. Aus den resultierenden Daten kann die DNA-Konzentration in Abhängigkeit von der Zyklenzahl ermittelt werden, da bei einer größeren Ausgangsmenge die Konzentrationszunahme schneller in den exponentiellen Bereich übergeht. Dazu wird ein Schwellenwert im Bereich der exponentiellen Amplifikation gewählt, an dem die Zyklenzahlen der getesteten Proben bestimmt werden (Abb. 12). Ein konstitutiv exprimiertes Gen (hier *cbp20*: Cap binding protein 20) wird hierfür als interne Kontrolle verwendet.



**Abb. 12. Quantitative Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge mit dem LightCycler.** Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenz infolge steigender Zyklenzahl der Amplifikation. Die Bestimmung der Zyklenzahl erfolgt bei einem bestimmten Schwellenwert in der exponentiellen Phase der Amplifikation

Die Berechnung eines Wertes erfolgt mit der  $\Delta\Delta$ CT-Methode der relativen Quantifizierung, und liefert nur die relativen DNA-Konzentrationen:

$$\text{rel. Konzentration}_{\text{Probe}} = 2^{-(\text{Zyklenzahl Probe} - \text{Zyklenzahl Kontrolle})}$$

Bei fiktiven Zyklenzahlen (n) von  $n_{\text{Kontrolle}} = 12,0$ ;  $n_{\text{Probe1}} = 14,2$  und  $n_{\text{Probe2}} = 20,3$  ergäbe sich daher die folgende Vorgehensweise. Berechnung der relativen Zyklenzahlen:

$$n_{\text{rel. Probe1}} = n_{\text{Probe1}} - n_{\text{Kontrolle}} = 14,2 - 12,0 = 2,2$$

$$n_{\text{rel. Probe2}} = n_{\text{Probe2}} - n_{\text{Kontrolle}} = 20,3 - 12,0 = 8,3$$

Daraus resultiert relative DNA-Konzentration von:

$$\text{Probe 1} = 2^{-2,2} = 2,3 \cdot 10^{-1} \text{ s sowie } \text{Probe 2} = 2^{-8,3} = 7,9 \cdot 10^{-4}$$

Um diese relativen Konzentrationswerte miteinander in Bezug zu setzen, muss der Quotient aus beiden gebildet werden: Bei mehreren Proben wird einfach durch den Minimal- oder Maximalwert geteilt.

$$\text{Probe1} = \text{rel. Konzentration}_{\text{Probe1}} / \text{rel. Konzentration}_{\text{Probe2}} = 2,3 \cdot 10^{-1} / 7,9 \cdot 10^{-4} = 291,1$$

Die DNA-Konzentration von Probe 1 ist also um den Faktor 291 höher als die von Probe 2.

### 2.3.10 m-RNA-Spleißanalyse, multiplex-PCR

Zur Analyse alternativ gespleißter m-RNA wurden Fliegen synchronisiert und auf flüssigem Stickstoff abgesammelt. Aus je 20 Köpfen wurde die gesamte RNA isoliert und quantitativ in cDNA umgeschrieben. Die Detektion der Spleißformen erfolgte durch eine multiplex-PCR (Edwards and Gibbs, 1994), wobei ein Primerpaar den gespleißten Bereich flankiert und zur internen Kontrolle mit einem weiteren Primerpaar das konstitutiv exprimierte Gen *Cap binding protein 20 (cbp20)* amplifiziert wird (Abb. 13).

Die Durchführung der Reaktion erfolgte unter Verwendung des Qiagen Multiplex-PCR-Kits und einer Primer-Stammlösung, in der jedes Oligonukleotid in einer Konzentration von 2 mM vorlag. Zur Quantifizierung wurden PCR-Programme mit 28 Zyklen verwendet, um einerseits genügend DNA zu erhalten und andererseits die Amplifikation in der Log-Phase zu unterbrechen.

#### Programm:

95°C 15 Min.

-----

94°C 30 Sek.

58°C 90 Sek.

72°C 90 Sek.

===== 28 Zyklen

72°C 10 Min.

#### Standardansatz:

25µl 2x Multiplex PCR Mix

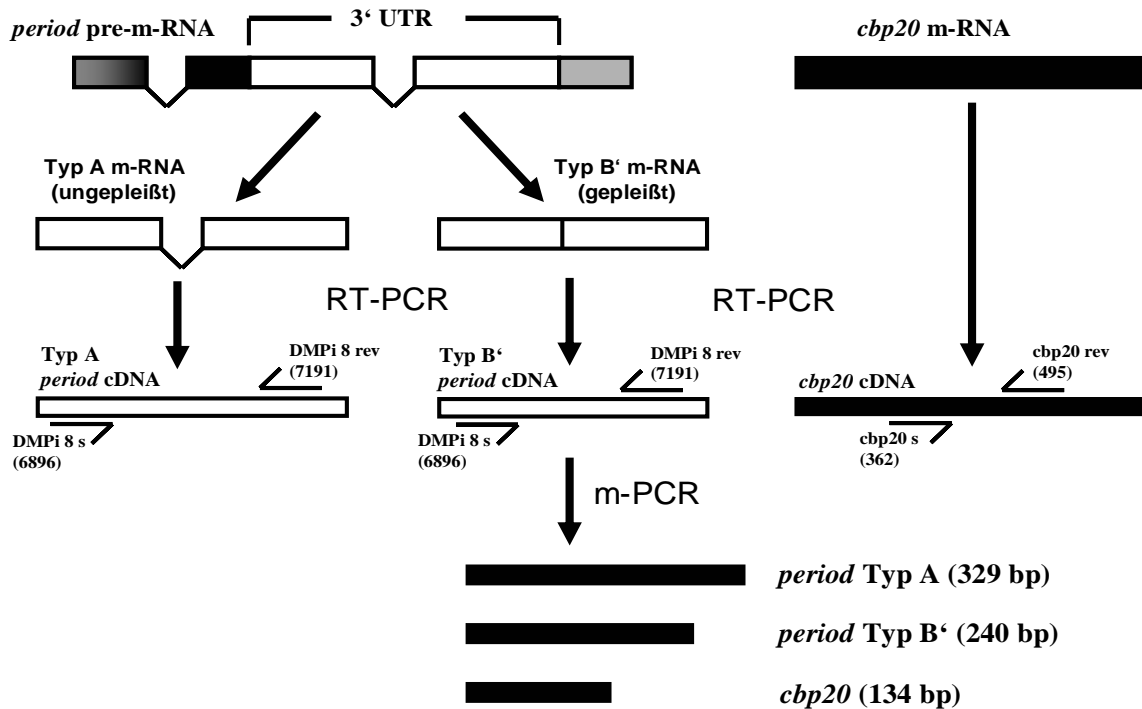
5µl 10x Primer Stamm-Lsg.

5µl Q-Lösung

2µl cDNA

13µl DEPC-Wasser





**Abb. 13. Detektion der Spleißformen des 8. Introns im UTR der *period* m-RNA.**

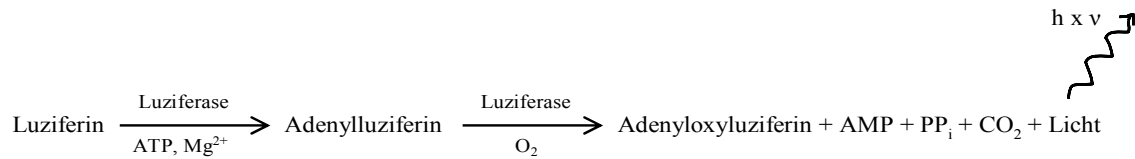
Zur Untersuchung der Spleißformen wurde die m-RNA quantitativ in cDNA umgeschrieben (RT-PCR). Anschließend folgte die quantitative Amplifikation bestimmter Sequenzabschnitte durch eine multiplex-PCR mittels zweier Primerpaare. Eines davon flankiert dabei das alternativ gespleißte 8. Intron von *period* (DMPi8). Das Zweite amplifiziert ein konstitutiv exprimiertes Gen, *Cap binding protein 20* (*cbp20*), das hierbei als interne Kontrolle fungiert. Dies führt dazu, dass drei PCR-Produkte entstehen, welche repräsentativ für die jeweilige umgeschriebene m-RNA sind: ein 329 bp *period* der ungespleißten m-RNA (Typ A), ein 240 bp Fragment der gespleißten *period* m-RNA (Typ B') und das 134 bp Fragment der *cbp20* m-RNA. Die Zahlen, die bei den Primern in Klammern vermerkt sind, geben deren Position in der genomischen DNA an.

Die PCR-Reaktionen wurden mit Ladepuffer versetzt, dessen Farbstoff sich außerhalb des DNA-Fragmentbereichs befand: 0.25% Xylencyanol und 40% (w/v) Saccharose in H<sub>2</sub>O. Dabei wurden jeweils 25 µl der PCR-Reaktionen mit einem Agarose Gel (2%) aufgetrennt (ohne EtBr), etwa 30 Minuten mit EtBr (1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Die Quantifizierung der DNA-Banden erfolgte mit dem Programm *ImageJ*. Dabei wurden die Werte jeweils mit der internen Kontrolle normalisiert und von dem Mittelwert dreier unabhängiger Experimenten der SEM berechnet.

### 2.3.11 *in-vivo* Biolumineszenzmessung der Genaktivität

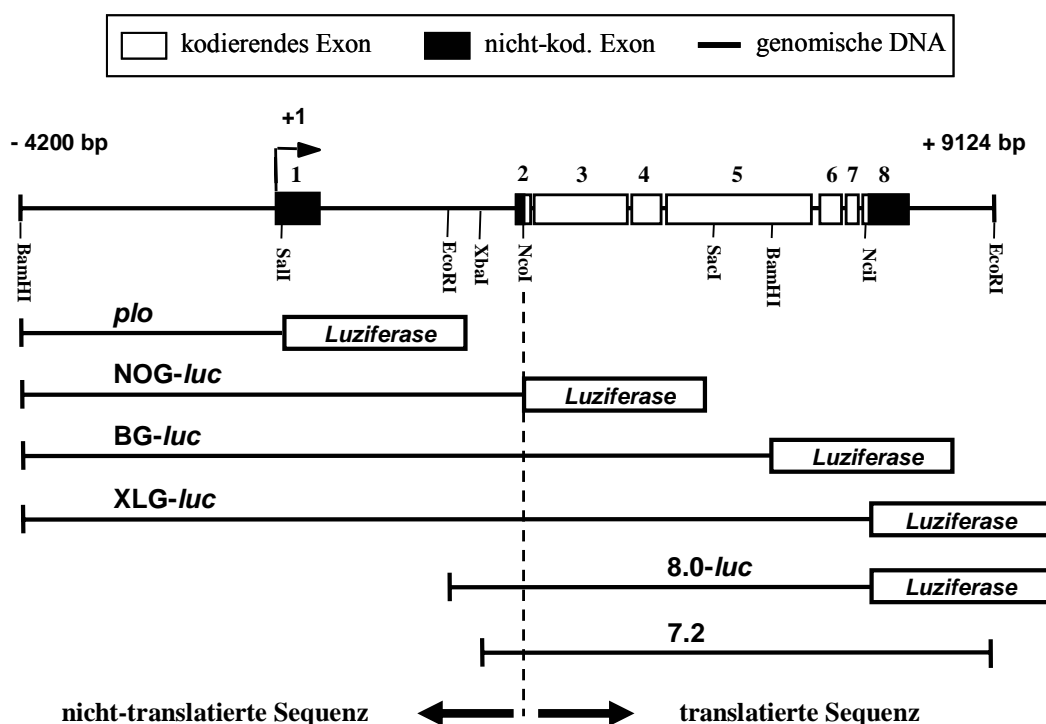
Die *in-vivo* Messung der Genexpression erfolgte mittels Reporterkonstrukten, bei welchen das Luziferase-Gen aus dem Glühwürmchen (*Photynus pyralis*) an ein zu untersuchendes Gen bzw. einen Genbereich fusioniert ist und unter dessen Kontrolle exprimiert wird. Es ist somit möglich die Messung am lebenden Organismus durchzuführen und aufgrund der

kurzen Halbwertszeit der Luziferaseaktivität (Brandes et al., 1996; Stanewsky et al., 1997b) rasche Schwankungen im Expressionslevel zu detektieren.



**Abb. 14. Die Umsetzung von Luziferin durch Luziferase.** Bei der enzymatischen Oxidation des Luziferins durch Luziferase werden Photonen ( $\lambda_{\text{max}}=560\text{nm}$ ) emittiert.

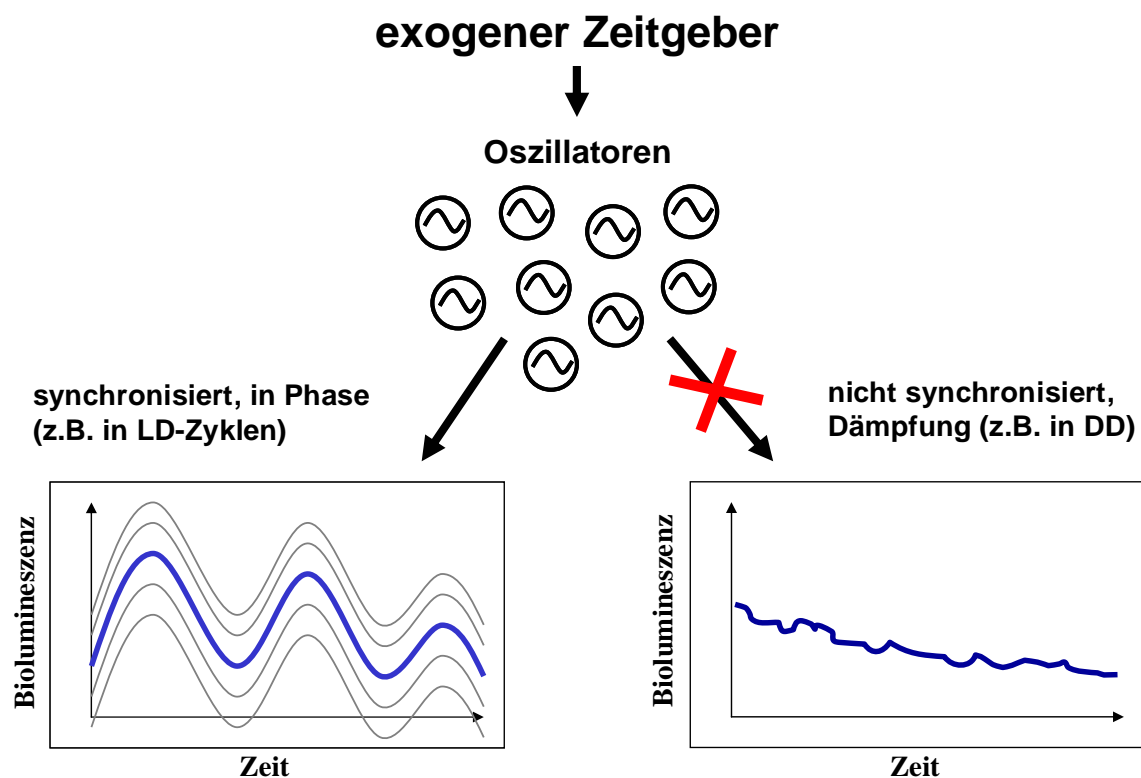
Um die molekularen Oszillationen der Uhrkomponenten erforschen zu können, wurden in dieser Arbeit Reporterkonstrukte des *period*-Gens verwendet, welches eine zentrale Komponente der inneren Uhr von *Drosophila* darstellt. Die *period*-Konstrukte können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 15): Erstere enthält nur den 5'-UTR und die Promotorsequenz (*plo*) bzw. zusätzlich das erste Intron und den nicht-translatierten Teil des zweiten Exons (*NOG-luc*) und reflektiert somit die Transkription des *period* Gens.



**Abb. 15. Übersicht verwendeter *per-luc* Konstrukte.** Alle Reporterkonstrukte bestehen aus Teilen der *period* gDNA, die im Leseraster mit 2 kb Luziferase cDNA (*Photinus pyralis*) verbunden ist (Stanewsky et al., 1997b, Veleri et al., 2003). Im Vergleich dazu steht das 7.2 *per*-Konstrukt ohne Luziferase (Frisch et al., 1994).

Die zweite Gruppe besitzt neben der flankierenden 5'-UTR-Sequenz, dem Promotor und nicht-kodierenden Bereichen zudem noch  $\frac{2}{3}$  der kodierenden Sequenz (*BG-luc*), bzw. das

ganze Protein (XLG-*luc*) und reflektiert somit die Oszillation des PER-LUC Proteins. Zu diesen Konstrukten kann auch 8.0-*luc* gerechnet werden. Bei diesem fehlen aber die regulatorischen Bereiche, was die Erzeugung von Expressionsmosaiken ermöglicht (Frisch et al., 1994, Veleri et al., 2003). Begründet auf der Tatsache, dass in nahezu allen Fliegegeweben circadiane Oszillatoren existieren (Plautz et al., 1997b; Giebultowicz et al., 2001) repräsentieren die Biolumineszenzdaten der Reporterkonstrukte in einer adulten Fliege die Summe der Signale aller *period* exprimierenden Zellen (Abb. 16). Es lassen sich in konstanten Bedingungen keine selbsterhaltenden Oszillationen beobachten (Stanewsky et al., 1997b). Die Ausnahme bildet das 8.0-*luc*-Konstrukt, welches im Hirn in bestimmten Uhrneuronen (DNs, LN<sub>d</sub>'s) exprimiert wird, und auch in konstanten Bedingungen Oszillationen hervorbringt (Veleri et al., 2003).



**Abb. 16. Die Entstehung eines rhythmischen *per-luc* Biolumineszenz-Summensignals.**

Werden durch einen exogenen Zeitgeber, wie z.B. LD-Zyklen, alle Oszillatoren einer Fliege synchronisiert, so schwingen sie in-Phase und es kann ein rhythmisches Summensignal beobachtet werden (links). Ist kein Zeitgeber aktiv (z.B. in konstanten Bedingungen), oder kann dieser nicht aufgenommen werden, erfolgt eine Dämpfung des Signals bis hin zur Arrhythmizität



**Abb. 17. Perkin-Elmer TopCount NXT und 96-well Microtiterplatte.**

Zur Biolumineszenzmessung werden Fliegen in Microtiterplatten einsortiert, die luziferinhaltiges Futter enthalten (rechts). Abhängig von der Testreihe werden bis zu neun Platten in einem Fach des Szintillationszählers (links) gestapelt und durchlaufen eine automatisierte kontinuierliche Messroutine.

Folglich kann also nur bei Anwesenheit eines synchronisierend wirkenden Zeitgebers eine andauernde rhythmische Luziferase-Expression beobachtet werden (mit Ausnahme des 8.0-*luc*-Konstrukts: Veleri et al., 2003). Dadurch wird ermöglicht, dass die Aufnahme eines Zeitgebers durch die circadiane Uhr untersucht werden kann. Diese Methode kam bereits bei der Identifikation des zellulären circadianen Photorezeptors *cryptochrom* (Stanewsky et al., 1998), sowie bei der Positionsbestimmung post-transkriptionaler regulatorischer Sequenzen im ersten nicht-translatierten Intron von *period* erfolgreich zum Einsatz (Stanewsky et al., 2002b).

Bei der Durchführung einer Messung wurden die Fliegen mit luziferinhaltigem Medium gefüttert und in verschiedenen künstlichen Tagesregimes (LD-Zyklen, Temperaturzyklen) gehalten. Die emittierten Photonen jeder einzelnen Fliege protokollierte dabei stündlich ein automatisierter Szintillationszähler (Perkin-Elmer TopCount® NXT: Abb. 17). Da sich in den Fliegen ein Pool an Luziferase ansammelt, wurden die ersten 12 Stunden jeder Messung verworfen.

Zur Begutachtung der gesammelten Rohdaten wurden mit den Excel VB-Skript-Programmen IandA (Plautz et al., 1997a) und Brass (Andrew Millar Labor) Diagramme erzeugt, in denen die Biolumineszenz (Photonenstrahlung, Counts Per Second) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen ist. Danach folgte die computergestützte Analyse mittels einer nicht-linearen FFT-Funktion mit kleinster Annäherung (Marty Straume Labor). Hierbei wird zuerst der Abwärtstrend entfernt, der aus der Konzentrationsabnahme des Luziferins im Medium resultiert. Anschließend wird mittels einer Ein-Komponenten-Cosinus-Funktion ( $n=1$ ) die Amplitude, Periode, Phasenlage und Signifikanz der Oszillationen berechnet.

Diese werden dann mit einem modifizierten Gauss-Newton-NLLS Algorithmus analysiert (Straume et al., 1991), da bei dieser Annäherung die Werte mit 95% Wahrscheinlichkeit im Vertrauensbereich liegen. Weicht die Amplitude signifikant von 0 ab, wurde die Analyse mit einer FFT-Funktion höherer Ordnung (z.B.  $n=2$  usw.) fortgesetzt. Dieser iterative Prozess wird so lange wiederholt, bis mindestens eine Cosinus-Komponente identifiziert ist, deren Amplitude nicht statistisch signifikant ist. Die errechneten Daten der zuletzt statistisch signifikanten Werte (der FFT-Analyse höchster Ordnung) repräsentieren dabei die statistisch exakte Charakterisierung des Datensatzes. Aus diesem Grund liefern die FFT-Daten einen Anhaltspunkt über die Aussagekräftigkeit der analysierten Rhythmen, wobei der relative Amplitudenfehler (rel.-Amp.F.) ein Maß für die Rhythmusstärke darstellt. In dieser Arbeit wurden Fliegen mit einer Periode von  $24 \pm 1.5$  h und einem Amplitudenfehler  $<0.7$  als rhythmisch klassifiziert. Dieser Wert von 0.7 repräsentiert dabei die experimentell bestimmte Signifikanzgrenze, die nur von 5% der Fliegen mit konstitutiver Luziferase-Expression überschritten wird und deshalb zu 95 % robuste Rhythmen garantiert (Stanewsky et al., 1997b; Plautz et al., 1997a).

### **Test adulter Fliegen**

Mikrotiterplatten mit 96-wells (Packard OptiPlate<sup>®</sup>, Abb. 15) wurden alternierend mit 100  $\mu$ l eines Luziferinmediums befüllt (1% Bacto-Agar, 5% Saccharose, 15mM Luziferin: Biosynth oder Biotium). Darin wurden mit Diethylether betäubte Fliegen einsortiert (2-5 Tage alt) und mit Plastikkappen bedeckt (200  $\mu$ l PCR-Tube-Deckel, mit Luftlöchern), um die Fliegen während der Messung in der richtigen Position der Z-Achse zu halten. Jede Platte wird mit einer Plastikschutzfolie versiegelt und mit Lüftlöchern versehen.

### **Semikulturen verschiedener Fliegengewebe**

Für die Gewebekulturen wurden die wells einer Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l eines Zellkulturmediums befüllt (85.9% M3-Insektenkulturmedium, 12% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum, 1% Penizillin-Streptomycin-Mix, 1% Biosynth-Luziferin, 0.5 % Insulin; Ivanchenko et al., 2001). Während die Präparation der Insektenhirne im Medium durchgeführt wurde, erfolgte die der anderen Körperteile „trocken“ auf 2% Bacto-Agar-Platten. Nach deren Transfer in die Wells der Platte wurde diese mit einer Plastikfolie ohne Luftlöcher versiegelt. Eine wichtige Rolle bei der Präparation scheinen dabei Schnelligkeit, Unversehrtheit der Gewebe und eine sterile Zubereitung der Lösungen zu spielen.

## 2.4 Immunohistochemie

### 2.4.1 Antikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung
$\alpha$ -PER (Kaninchen) "978-1"	Stanewsky R.	1:10.000 WB; 1:1.000 WHM
$\alpha$ -TIM (Ratte)	Rosbash M.	1:10.000 WB; 1:1.000 WHM
$\alpha$ -TIM (Ratte)	Ederly I.	1:2.000 WB; 1:400 WHM
$\alpha$ -PDH (Maus) "nb33"	Hofbauer A..	1:100 WHM
$\alpha$ -Ratte (Ziege) HRP	Pierce <sup>TM</sup>	1:20.000
$\alpha$ -Kaninchen (Ziege) HRP	Pierce <sup>TM</sup>	1:167.000
$\alpha$ -Maus Fluoreszenz 656 nm	ALEXA <sup>TM</sup>	1:200
$\alpha$ -Kaninchen Fluoreszenz 540 nm	ALEXA <sup>TM</sup>	1:200
$\alpha$ -Ratte Fluoreszenz 488 nm	ALEXA <sup>TM</sup>	1:200

**Tab. 6. Auflistung der verwendeten Antikörper.** Aufgeführt sind alle verwendeten Antikörper, deren Organismus sowie deren eingesetzte Konzentration in Westernblots (WB) bzw. bei der Färbung von Wholemount Insektenhirnen (WHM). Die Detektion der Antikörper erfolgte entweder mittels der HRP (horseradish peroxidase) und Luminol bzw. durch Fluoreszenz.

### 2.4.2 Westernblot

Für die Analyse der Proteinoszillationen wurden pro Zeitpunkt 20-25 Fliegen synchronisiert, auf flüssigem Stickstoff abgesammelt und bei -80°C gelagert. Durch Vortexen wurden die Köpfe abgetrennt und auf Trockeneis gezählt. Die Extraktion der Proteine erfolgte mit je 50  $\mu$ l Proteinextraktionspuffer (100 mM HEPES pH 7,5; 0,5 M KCl; 25 % Glycerin; 50 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 0,1 M  $\beta$ -Glycerophosphat; 0,5 mM Natriumvanadat pH 11; 0,5 mM PMSF; 20  $\mu$ g/ml Aprotinin; 1 mM DTT; 5  $\mu$ g/ml Leupeptin; 5  $\mu$ g/ml Pepstatin). Nach Abtrennen der festen Zellrückstände wurden die Proben mit Proteinladepuffer (TRIS, SDS, Glycerol,  $\beta$ -Mercapto-Ethanol, Bromphenolblau) aufgekocht und auf ein SDS-Gel (10cm x 14cm; 4,5% Sammel-Gel, 6% Trenngel) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 55 V, 150 mA und 5 W für 16 Stunden. Aufgetrennte Proteine wurden „semi-dry“ auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell<sup>TM</sup>) für 1 Stunde bei 30V 400mA 250 W geblottet. Eine reversible PonceauS-Färbung diente zur Kontrolle des Transfers. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen erfolgte 2 Stunden mit 2% BSA in TBST. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht und mit dem sekundären HRP-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Für die Detektion der Signale

wurde der Blot mit dem Pierce SuperSignal®-Kit entwickelt und die dabei entstehenden Lichtsignale auf Röntgenfilm festgehalten.

Diese Filmexponate wurden zur Auswertung eingescannt (16-Bit, SW), die Signale mit ImageJ® gegenüber dem Hintergrund quantifiziert und mit dem Maximalwert normalisiert. Zur Mittlung von Fehlern wurden jeweils drei unterschiedlich lang belichtete Filme eines Experiments verwendet, um daraus den Durchschnitt zu bestimmen. Zur Berechnung der Protein-Oszillation eines Genotypen wurden die Durchschnittswerte von mindestens drei verschiedenen Experimenten benutzt, um Mittelwert und SEM zu berechnen. Das Verhältnis der Proteinexpression der einzelnen Genotype zueinander wurde anhand der gemittelten Minima-Maxima-Unterschiede zweier Genotypen eines Filmexponats berechnet.

### **2.4.3 Antikörperfärbung an wholemount Insektenhirnen**

Pro Zeitpunkt und Genotyp wurden ca. 15 Fliegen synchronisiert, auf 4% para-Formaldehyd (4°C) abgesammelt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rüttler fixiert. Nach Auswaschen der Fixierlösung mit 1x PBS wurden die Hirne freigelegt, von Tracheen und Luftsäcken gesäubert, und erneut für 15 Min. fixiert. Das Formaldehyd musste wieder mittels 1x PBS und 0.1 % PBT ausgewaschen werden. Anschließend wurden die Hirne mit 2% Eselserum in 0.3 % PBT über Nacht bei 4°C blockiert. Nach kurzem Waschen mit 0.3 % PBT wurden die Hirne 2 Tage lang mit dem primären Antikörper (in 2% Blocking Protein 0.3 % PBT) angesetzt und bei 4°C auf einem schwingenden Rotor inkubiert. Danach musste mit 5 Waschschritten (a 15 Min.; 0.3% PBT) der überschüssige primäre Antikörper entfernt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären fluoreszenten Antikörper (in 0.3 % PBT mit 2% Blocking Protein) bei 4°C über Nacht. Der überschüssige sekundäre Antikörper wurde erneut in 5 Schritten (a 15 Min.) mit 0.3% PBT abgewaschen. Die Hirne wurden mit PBS zwischengespült, in 0.1 % PBT gesammelt und im Anschluss daran auf Glasobjektträger in Vectashield® eingebettet. Die luftdichte Versiegelung erfolgte mittels DPX Mount Medium und einem Deckglas.

### **2.4.4 Konfokale Lasermikroskopie, Quantifizierung**

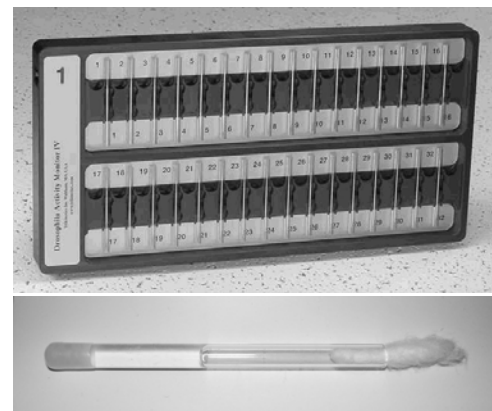
Zur Messung der PER-/TIM-Oszillationen in den Fliegenhirnen wurden pro Präparationstag von den zu vergleichenden Stämmen je 3 Zeitpunkte (ein PER-Maximum- und ein PER-Minimumzeitpunkt) präpariert und wie oben beschrieben mit jeweils ein und

dem selben Antikörperansatz gefärbt. Das Scannen der Präparate erfolgte durch ein konfokales Lasermikroskop (Zeiss, LSM 510), wobei für jeden Antikörperansatz der „amplifier offset“ und „detector gain“ eingestellt werden musste. Jedes Hirn wurde hemisphärenweise von den s-LNV bis zu den LPNs mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel und einer Schnittdicke von 2,9 µm gescannt. Erhaltenen Bilder wurden mittels dem „LSM Reader“-PlugIn in das Programm ImageJ importiert und skaliert in 8-bit RGB-Bilder konvertiert (Werte 0-255). Für jede Zelle bzw. Zellgruppe (wenn nicht differenzierbar) wurde eine Maske erstellt, um deren Intensität sowie den Färbehintergrund in unmittelbarer Nähe zu bestimmen. Anschließend wurde die Signalstärke gegenüber dem Hintergrund bestimmt ( $\text{Intensität}_{\text{Zelle}} = \frac{\text{Wert}_{\text{Zelle}}}{\text{Hintergrund}_{\text{Zelle}}}$ ; wobei keine Färbung = 1) und daraus der Mittelwert bzw. dessen SEM berechnet.

## 2.5 Verhaltenstest

### 2.5.1 Analyse der Lokomotorrhythmik

Zur Messung der Lokomotoraktivität erfolgte mit dem *Drosophila Activity Monitoring System* (Trikinetics Inc., Waltham MA). Dazu wurden 1-3 Tage alte Fliegen einzeln in Glasröhrchen (65 mm lang, Ø 5 mm, Abb. 17) gehalten. Das Ende, in dem sich das Futter befand (1 % Agar, 5 % Saccharose), wurde mit Paraffin versiegelt, während das andere Ende mit einem Wattestopfen verschlossen war. Je 32 dieser Röhrchen werden auf einen Monitor gesteckt (Abb. 18 A), so dass jedes Röhrchen mit einem



**Abb. 18 A. Monitor (oben) und Glasröhrchen (unten) für die Analyse der Laufaktivität.**

für die Fliegen nicht sichtbaren Infrarotstrahl durchleuchtet wird. Durchbricht eine Fliege diesen Lichtstrahl, wird dieses Ereignis aufgezeichnet, wobei alle Daten einer halben Stunde zu einem sog. *activity bin* zusammengefasst werden. Zur Simulation verschiedener Licht- und Temperaturregimes befanden sich diese Monitore in Inkubatoren (Precision Scientific, Mod. 818, ca. 340 Lux Leuchtstärke).

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der „*signal processing toolbox*“ für Matlab (Levine et al., 2002a), Microsoft Excel und dem Programm „*El-Temps*“ (Antoni Diez-Noguera, Barcelona), wobei in dieser Arbeit verschiedene Auswertungsmethoden benutzt wurden:



## Aktogramm

Ein Aktogramm ist eine grafische Darstellung, in der die Aktivitätsdaten einer Fliege den jeweiligen Zeitpunkten (bins) zugeordnet sind (Abb. 18 B). Dabei werden die einzelnen Tage zeilenweise untereinander gegen die Zeit aufgetragen und als 48 Stunden Doppelplot nebeneinander aufgetragen. Dadurch wird der Verlauf der Rhythmik besser herausgestellt, was deren Begutachtung erleichtert.

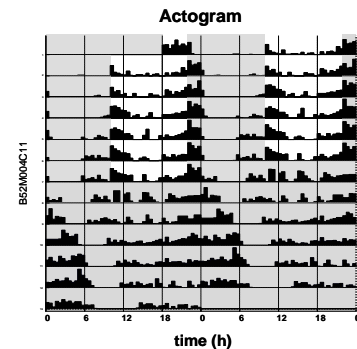


Abb. 18 B. Aktogramm.

## Daily Average

Diese Funktion bildet aus den Daten vieler Tiere einen repräsentativen Durchschnittstag, indem die Aktivitätswerte der analogen bin-Werte (Zeitpunkte) von mehreren Tagen addiert werden (Abb. 18 C). Dabei wird zunächst die durchschnittliche Tagesaktivität für jede einzelne Fliege ermittelt und anschließend der Durchschnitt aller Tiere eines Genotyps berechnet.

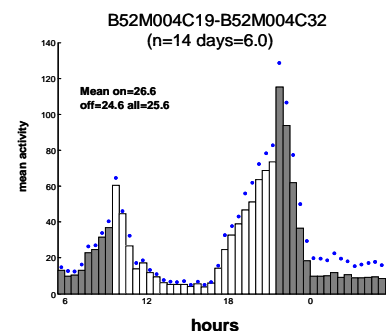


Abb. 18 C. Daily Average.

## Periodogramm, MESA

Bei der MESA-Analyse (*maximum entropy spectral analysis*) werden die Aktivitätsdaten mit einem autoregressiven Modell zur Deckung gebracht und durch eine Fourier-Funktion auf die enthaltenen rhythmischen Komponenten und deren Signifikanz hin analysiert. Überschreitet ein Rhythmus die 5%-Signifikanzgrenze, wird dessen Periodenlänge, sowie die Höhe (h) und Breite (w) des Peaks angegeben (Abb. 18 D).

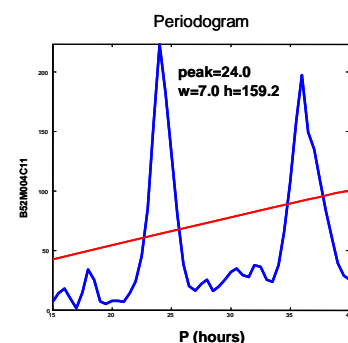


Abb. 18 D. Periodogramm.

## Autokorrelation

Die Autokorrelation stellt eine weitere Möglichkeit der Periodizitätsanalyse dar. Hierbei wird ein Datenset zeitlich verschoben mit sich selbst zur Deckung gebracht und daraus ein Korrelationskoeffizient berechnet. Dadurch wird eine bestehende Periodizität innerhalb der analysierten Daten anhand wiederkehrender periodischer Elemente enttarnen (12, 24, 36, 48). Die Signifikanz identifizierter Rhythmen wird durch den Rhythmizitätsindex (RI=Höhe des 3. Peaks im Korrelogramm) und die Rhythmusstärke (RS) angegeben (Abb. 18 E).

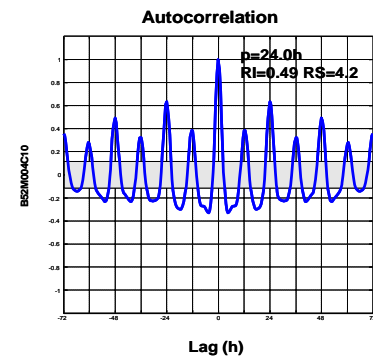


Abb. 18 E. Autokorrelation.

## Analyse der Phasenlage einzelner Aktivitätspeaks

Zur Analyse der Phasenlage einzelner Peaks wurden die Rohdaten 3-fach geglättet, d.h. ein Wert wurde seinen beiden Nachbarwerten angeglichen. Die geglätteten Aktogramme (Abb. 18 F) dienen dazu, um die Maxima der Aktivitätspeaks jedes einzelnen Tages zu bestimmen und deren Phasenlage abzulesen. Aus den Daten verschiedener Fliegen wird anschließend der Mittelwert sowie dessen SEM berechnet und in Excel gegen die Zeit aufgetragen. Diese Methode gibt vor allem bei Shiftexperimenten einen Anhaltspunkt darüber, ob die Fliegen ihr Lokomotorverhalten an phasenversetzte Zyklen synchronisieren können.

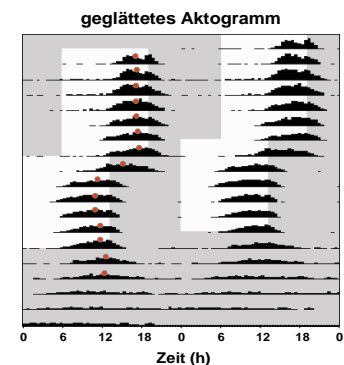


Abb. 18 F. 3-fach geglättetes Aktogramm.

## 2.6 Fehlerberechnung, Statistik

Die Rohdaten vieler Experimente enthalten oftmals Messfehler aufgrund zufälliger Abweichungen oder unvorhersehbarer äußerer Einflüsse. Um diese zu minimieren, wurde in statistischen Auswertungen der Mittelwert  $\bar{x}$  aus den Datensätzen von mindestens drei unabhängigen Experimenten gebildet. Daraus konnte wiederum der Vertrauensbereich des Mittelwertes  $s_{\bar{x}}$  (SEM, *standard error of the mean*) bestimmt, um ein Anhaltspunkt über die Streuung der eingerechneten Werte erhalten werden (Abb. 19). Man sollte dabei jedoch

im Auge behalten, dass ein Wert innerhalb des Bereiches  $\bar{x} \pm s$  liegt und formelbedingt nur eine Wahrscheinlichkeit von 68% besitzt, was aber auch im Gegenzug bedeutet, dass 32% der eingerechneten Werte außerhalb liegen können. Infolge von Wiederholungen wird sich die Messabweichung eines Einzelwertes ( $s_{\bar{x}}$ )

$$SEM = s_{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n}}$$

**Abb. 19. Formel zur Berechnung des Vertrauensbereichs des Mittelwertes (standard error of the mean).**

nicht verändern (bis auf Schwankungen), die Genauigkeit von  $\bar{x}$  aber mit  $\sqrt{n}$  sich verbessern.

## 2.7 Datenbanksuche nach Verwandtschaften

Für die Suche nach verwandten Protein- und DNA-Sequenzen wurden verschiedene Datenbanken und Algorithmen verwendet (Tab. 7). Die Analyse liefert dabei für jeden Treffer einen *Score*- und einen *E*-Wert. Während der *Score*-Wert einen Anhaltspunkt über die Sequenzübereinstimmungen bietet, ist der *E*-Wert ein Maß für die Signifikanz, mit der diese Sequenz mit einer zufällig generierten übereinstimmt.

Zudem wurde eine Analyse auf globuläre Proteindomänen (GlobPlot; [globplot.embl.de](http://globplot.embl.de)) und potentielle Transmembrandomänen (TMPred; [www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org); TMHMM: [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) durchgeführt.

Algorithmus	Beschreibung
blastn	Nukleotidsequenz gegen Nukleotidsequenzdatenbank ( <i>basic local alignment search tool</i> )
blastp	Aminosäuresequenz gegen Proteinsequenzdatenbank
blastx	Proteinsequenz gegen Nukleotidsequenzdatenbank, unter Berücksichtigung aller möglichen Leseraster
PSI-blast	aus einer Suchanfrage wird aus der Gruppe ähnlicher Proteine ein Profil erstellt, das für eine erneute Anfrage als Vorlage dient. Diese wiederholten Suchanfragen führen zur Ermittlung entfernter Verwandtschaften ( <i>position-specific iterative BLAST</i> ).
cdart	Suche nach konservierten Domänen in der CDD ( <i>conserved domains database</i> )
Pfam	Abgleich mit einer Datenbank, die Konsensus-Sequenzen homologer Familien enthält ( <i>protein family database</i> )
SMART	automatische Identifizierung und Annotierung von Proteindomänen ( <i>simple modular architecture research tool</i> )

**Tab. 7. Auflistung der verwendeten NCBI-Suchalgorithmen.**

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Die circadiane Temperatursynchronisation:

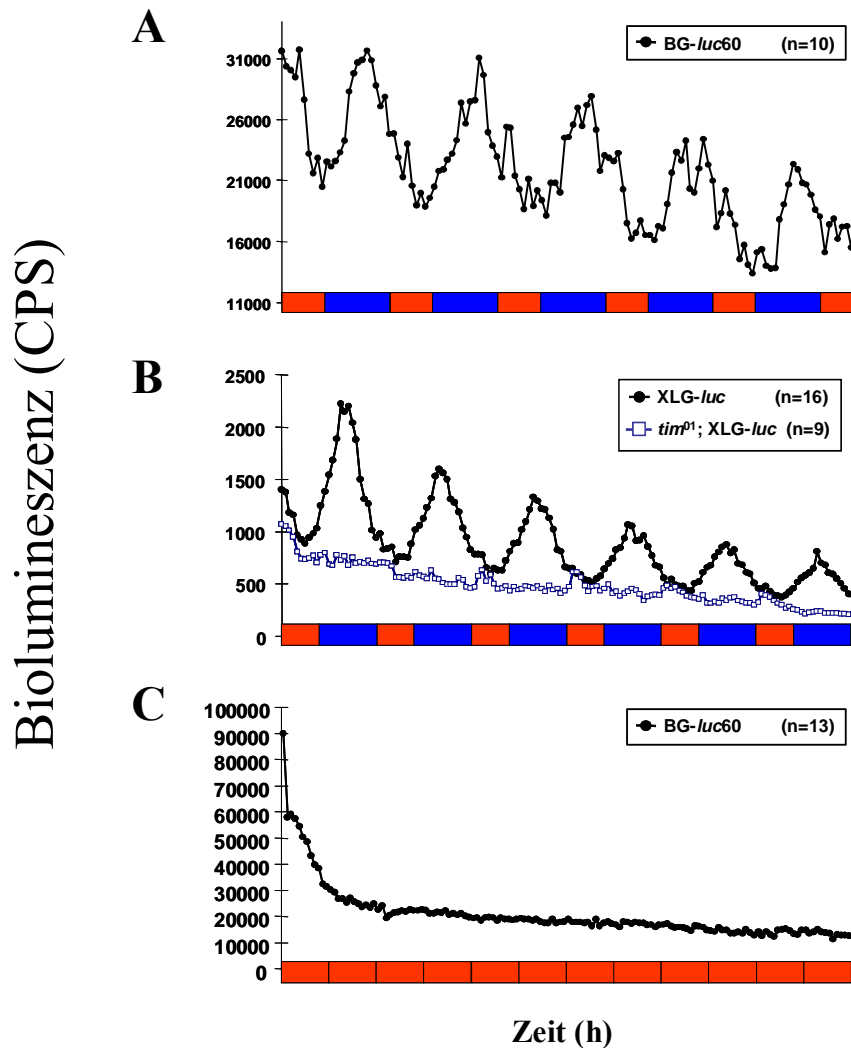
##### Analyse der involvierten Mechanismen und Rezeptoren

Das rhythmische Lokomotorverhalten von *Drosophila* lässt sich über einen Temperaturbereich von 16°C bis 30°C synchronisieren (Wheeler et al., 1993; Tomioka et al., 1998; Yoshii et al., 2002; Yoshii et al., 2005). Allerdings sind die molekularen Grundlagen der circadianen Temperatursynchronisation unbekannt, weshalb sich dieser Teil der Dissertation mit der Analyse der involvierten Mechanismen und Rezeptoren befasst.

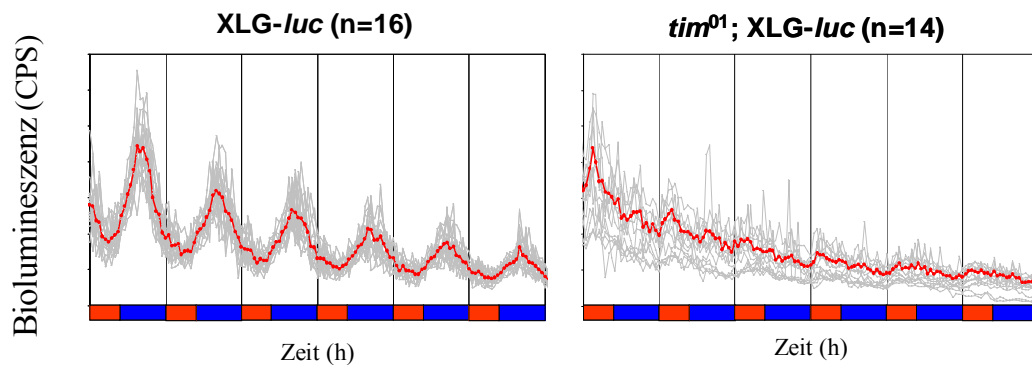
##### 3.1.1 Temperaturinduzierte *per-luc*-Oszillationen in LL

Die Untersuchung der molekularen Uhr erfolgte *in-vivo* anhand eines *per-luc* Reportergens in Wildtyp-Fliegen. An diesen Tiere fanden Messungen der Biolumineszenz statt, wobei sie in Dauerlicht und wechselnder Temperatur (10:14 h 25°:17°C) bzw. alternierenden Licht-Dunkelphasen (12:12 h LD und konst. Temperatur) gehalten wurden. Temperaturzyklen können sowohl im Dauerdunkel (DD), als auch im Dauerlicht (LL) starke Oszillationen der Biolumineszenz induzieren (Abb. 20. A, B), obwohl LL in Kombination mit konstanter Temperatur zu molekularer Arrhythmizität führt (Abb. 20 C; Marrus et al., 1996). Die Maxima der Schwingungen werden ca. 8 Stunden nach Beginn der Cryophase (17°C) erreicht (Tab. 16), was gegen einen direkten Effekt infolge Temperatur spricht. Wird die molekulare Uhr aufgrund einer *timeless*-Nullmutante zerstört (*tim*<sup>01</sup>), bleiben diese Rhythmen aus (Abb. 20 B).

Daraus zeigt sich einerseits, dass die rhythmische Biolumineszenz die molekularen Oszillationen des circadianen Systems wiedergibt und andererseits eine funktionierende circadiane Uhr voraussetzt. Allerdings können aus den Summengraphen keine Rückschlüsse auf die eingerechneten Einzelgraphen gezogen werden. Daher könnte der arrhythmische Graph der *tim*<sup>01</sup>;XLG-*luc* Tiere entweder aus arrhythmischen oder nicht-synchronisierten rhythmischen Signalen resultieren. Jedoch belegt eine Auftragung der Einzelgraphen, dass die Summengraphen (Mittelwerte) der Biolumineszenzdaten repräsentativ für die eingerechneten Einzelwerte sind und *tim*<sup>01</sup> eine arrhythmische Expression des XLG-*luc*-Reportergens verursacht (Abb. 21).



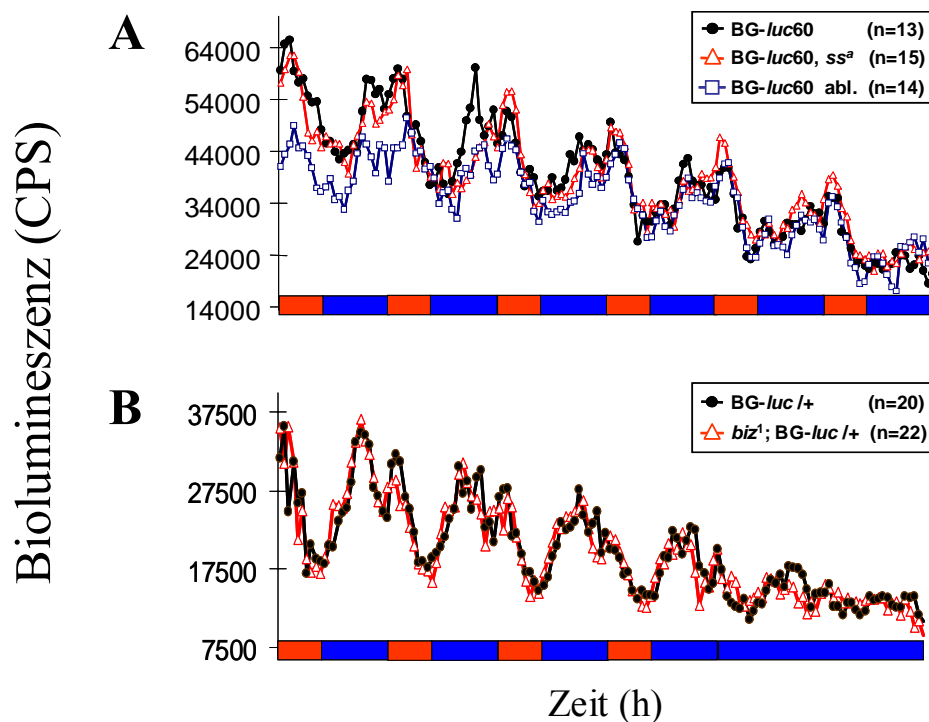
**Abb. 20. Biolumineszenzrhythmen transgener *per-luc* Fliegen in Temperaturzyklen und konstanter Beleuchtung.** Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C) induzieren robuste Biolumineszenzrhythmen in verschiedenen *per-luc* Fliegen in DD (A) und LL (B) im Wildtyp-Hintergrund, nicht aber in Fliegen mit defekter circadianer Uhr (*tim*<sup>01</sup>; XLG-*luc*) (B). In konstanter Temperatur (25°C) und Dauerlicht können hingegen keine Rhythmen beobachtet werden. (rote Balken=25°C, Thermophase, blaue Balken=18°C, Cryophase)



**Abb. 21. Summen und Einzelgraphen von XLG-*luc* Tieren im Wildtyp- und *tim*<sup>01</sup>-Hintergrund (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Aus den verschiedenen Biolumineszenzdaten individueller Fliegen (grau) wird der Mittelwert (rot) gebildet, der repräsentativ für die rhythmische Einzelgraphen wildtypischer Fliegen (links) und die arrhythmische Einzelgraphen der *tim*<sup>01</sup>; XLG-*luc* Tiere ist (rechts).

### 3.1.2 Beitrag bekannter Thermorezeptoren

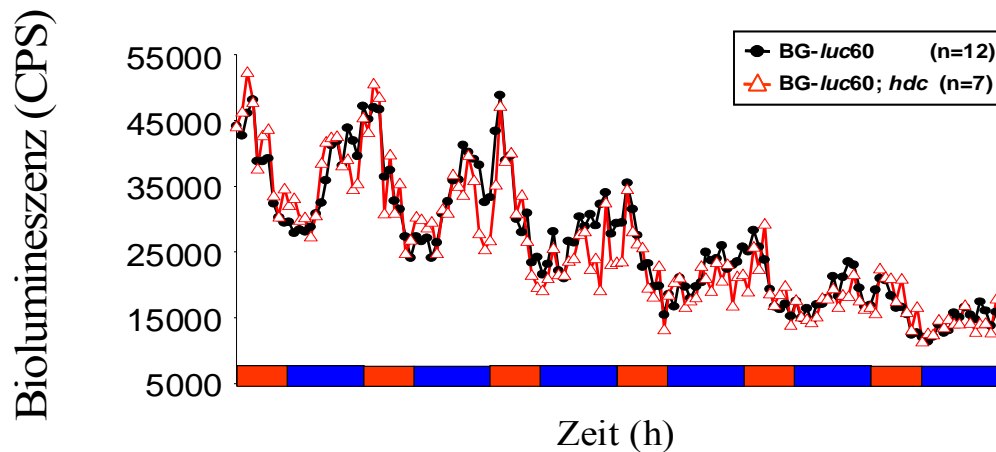
Die molekularen Oszillationen lassen sich mittels Temperatur synchronisieren (Abb. 20; Stanewsky et al., 1998). Fraglich ist jedoch, welche Rezeptoren für die Aufnahme der zeitlichen Information der Temperatur verantwortlich sind, und wie die Übermittlung dieser Signale zur inneren Uhr erfolgt. Bei der Lichtrezeption sind neben dem spezialisierten circadianen Photorezeptor *cryptochrom* (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2002) ebenfalls die retinalen Photorezeptoren beteiligt, die zur räumlichen Orientierung dienen (Rieger et al., 2003; Helfrich-Förster et al., 2001). Daher ist es möglich, dass die Temperaturinformation entweder von spezialisierten circadianen Thermorezeptoren, oder von nicht-spezialisierten Temperatursensoren (siehe 1.14), die überdies der Orientierung und der Gefahrenvermeidung nützen, bzw. von beiden gemeinsam an die innere Uhr geleitet werden. Es existieren mehrere Mutationen die dazu führen, dass Fliegen ihre Umgebungstemperatur nicht mehr wahrnehmen können: *bizarre*<sup>1</sup> und *spineless-aristapedia* (Sayeed and Benzer, 1996; Zars, 2001). Bei *spineless-aristapedia* (*ss*<sup>a</sup>) fehlen die Thermosensoren im 3. Antennensegment, da die Antennen durch eine homöothische Mutation in Beine transformiert werden.



**Abb. 22. Biolumineszenzrhythmen von *per-luc* Fliegen mit defekter Thermotaxis in Dauerlicht und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C.** BG-luc60 Fliegen mit genetisch (*ss*<sup>a</sup>) oder manuell (abl.) ablatierten Thermosensoren im 3. Antennensegment in LL und Temperaturzyklen (A). BG-luc im *bizarre*<sup>1</sup> Hintergrund in DD und Temperaturzyklen (B; R.Stanewsky). Ähnlich den Wildtyp-Fliegen zeigen sowohl die beiden Mutanten, als auch die Fliegen mit den ablatierten Antennen robuste synchronisierte Biolumineszenzrhythmen.

Diese Rezeptoren können auch manuell durch Ablation der Antennen entfernt werden (Sayeed and Benzer, 1996). Die *bizarre*<sup>1</sup> Mutation hingegen besitzt funktionale Antennen. Eine strukturelle Modifikation des Gehirns führt wahrscheinlich dazu, dass die Temperaturinformation (u.a. aus dem 3. Antennensegment) nicht mehr zum Hirn geleitet bzw. dort verarbeitet werden kann (D. Kretschmar, persönliche Mitteilung).

Als Grundlage für das Temperaturpräferenzverhalten konnte der Histamin-Signalweg und dessen Komponenten, wie z.B. die Histidincarboxylase (*hdc*; Hong et al., 2006) identifiziert werden. Um eine Beteiligung dieser Thermosensoren bzw. deren Signalkaskade zu untersuchen, wurden *per-luc* Fliegen mit *hdc*<sup>JK910</sup>, *bizarre*<sup>1</sup>- oder *ss*<sup>a</sup>-Hintergrund, bzw. mit manuell ablatierten Antennen in Bezug auf eine funktionale circadiane Temperatursynchronisation untersucht (Abb. 22; Abb. 23).

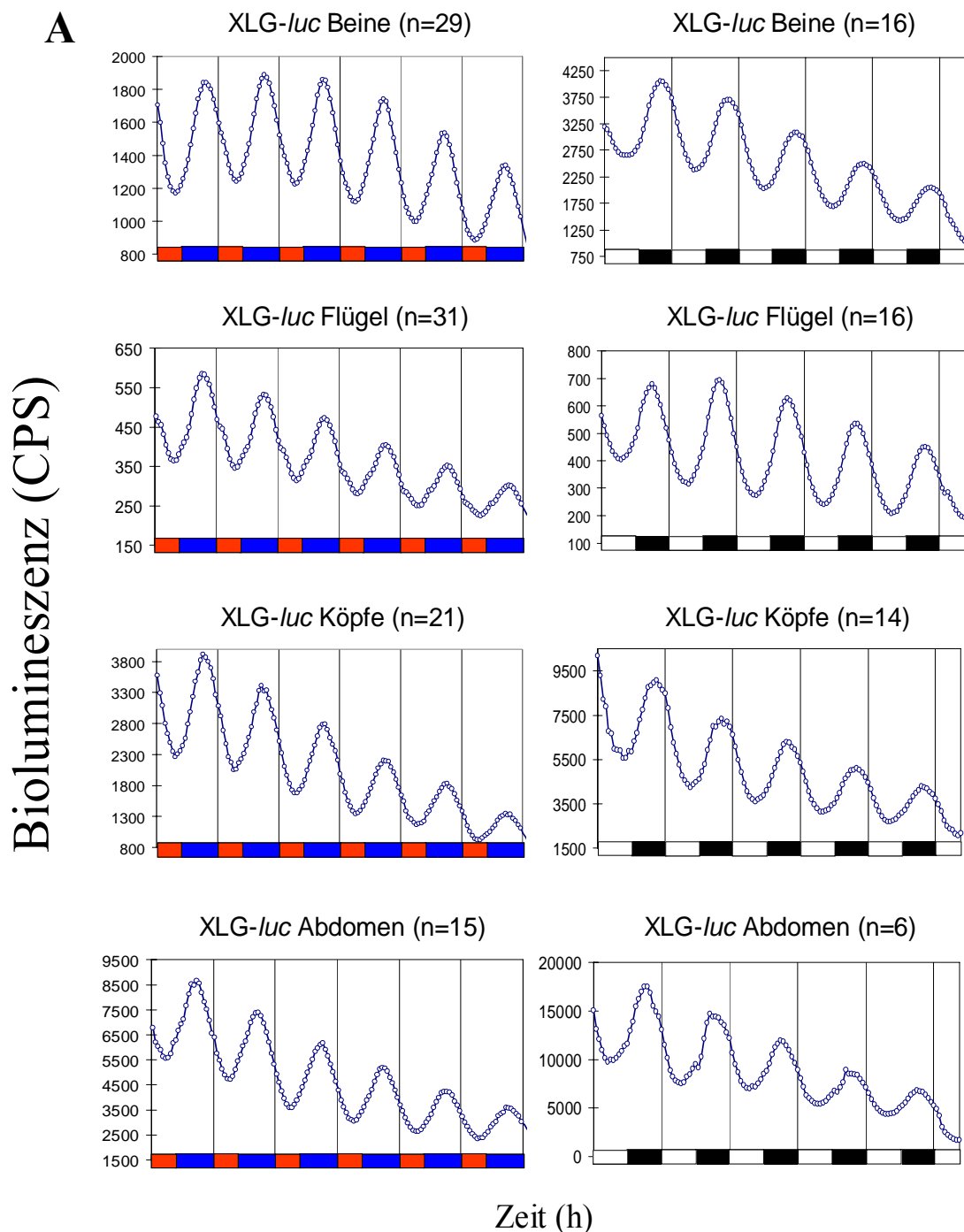


**Abb. 23.** BG-*luc60* Fliegen im Wildtyp- und *hdc*<sup>JK910</sup>-Hintergrund in LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau). Die Ablation des *hdc*-abhängigen Signalwegs (*hdc*<sup>JK910</sup>) hat keine Auswirkung auf die Synchronisation der circadianen Uhr mittels Temperaturzyklen.

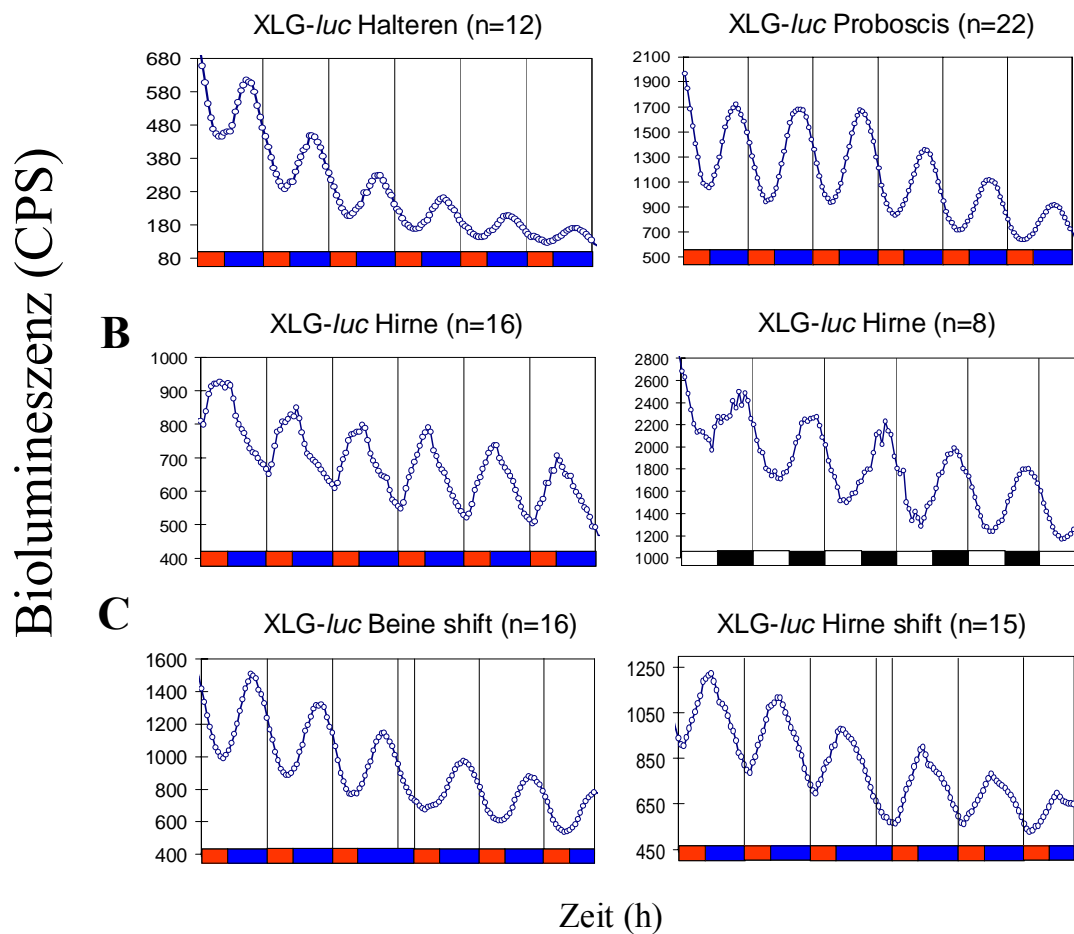
Sowohl *bizarre*<sup>1</sup> und *spineless-aristapedia*, als auch die Fliegen mit den ablatierten Antennen weisen ähnlich den Kontrollfliegen gut synchronisierte *per-luc* Biolumineszenzrhythmen in Temperaturzyklen auf (Abb. 22). Ebenso verhält es sich mit den *hdc*<sup>JK910</sup>-Fliegen, bei denen die Thermotaxis aufgrund des defekten Histamin-Signalwegs blockiert ist (Abb. 23). Bei allen Mutanten kann die Temperaturinformation sowohl aufgenommen, verarbeitet und an die innere Uhr weitergeleitet werden. Somit scheinen die Thermosensoren im 3. Antennensegment, sowie deren Signalwege keine essentielle Rolle bei der Aufnahme und Verarbeitung der zeitlichen Temperaturinformation durch die innere Uhr zu besitzen.

### 3.1.3 Die circadiane Thermorezeption ist gewebeunabhängig

Keine der bekannten Thermotaxis-Mutanten weist einen Defekt in der circadianen Thermorezeption auf. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Fähigkeit der circadianen Temperaturentnahme auf bestimmte Gewebe beschränkt, oder gewebeunabhängig ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gewebe von *per-luc* Fliegen präpariert, und deren Expression in „Semikultur“ während Temperatur- bzw. Licht-Dunkel-Zyklen gemessen (Abb. 24). Ähnliche Experimente haben bereits die Existenz unabhängiger photosensitiver Oszillatoren in vielen Fliegengeweben aufgedeckt (Plautz et al., 1997b).







**Abb. 24. *per-luc* Oszillationen von Kulturen isolierter Fliegengewebe in LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (rot:blau) bzw. in 12:12 h LD-Zyklen (weiß:schwarz) und 25°C.** (A) Biolumineszenzrhythmen separierter Fliegengewebe (Beine, Flügel, Köpfe, Abdomen, Halteren und Proboscis) induziert durch Licht oder Temperatur. (B) Hirne adulter Fliegen zeigen einen Phasenunterschied zwischen Temperatur- und Licht-Entrainment. (C) Beine und Hirne in phasenverschobenen Temperaturzyklen („*delay shift*“): die Cryophase des 3. Tages wurde um 6 h verlängert, die Rhythmen beider Gewebe folgen unmittelbar der Phasenverschiebung.

Die Biolumineszenzrhythmen zeigen, dass sich molekulare Oszillationen in verschiedenen Geweben (Köpfe, Flügel, Beine, Abdomen, Proboscis, Hirne und Halteren) mittels Temperaturzyklen induzieren lassen und dazu das Fliegenhirn nicht benötigt wird (Abb. 24 A, B). Zudem beweist die direkte Reaktion der Rhythmen auf phasenverschobene Zyklen, dass die Temperatur unmittelbar aufgenommen und verarbeitet werden kann (Abb. 24 C). Die circadiane Thermorezeption ist also gewebeautonom und schließt damit Thermosensoren aus, die sich lediglich auf eine Struktur beschränken, wie z.B. die Rezeptoren im dritten Antennensegment (Sayeed and Benzer, 1996).

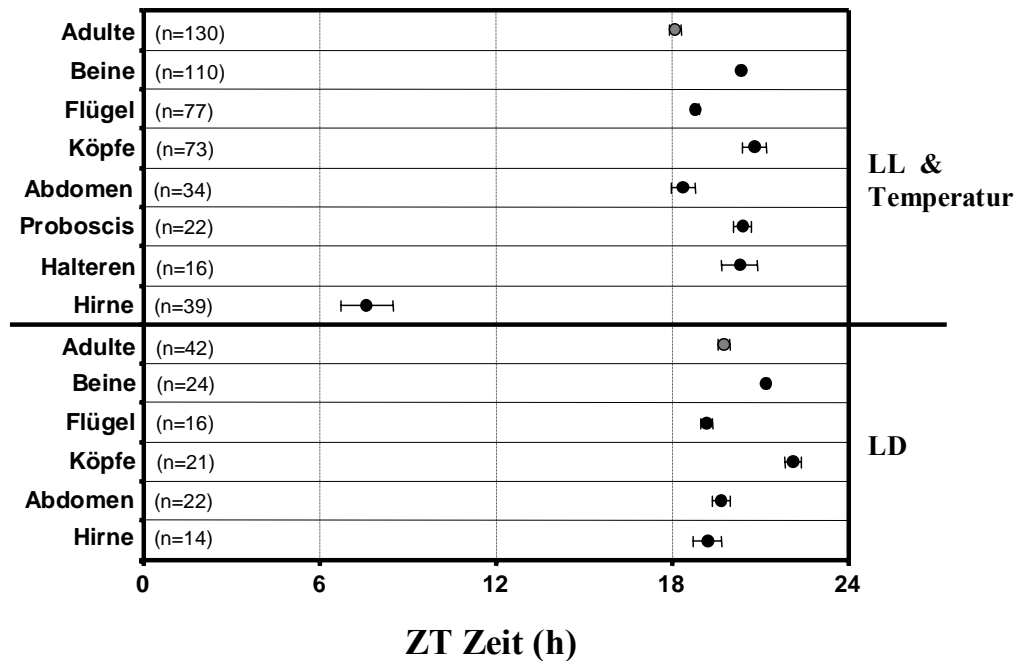
Die Phase der temperaturinduzierten Biolumineszenz sitzt bei nahezu allen getesteten Körperteilen in der Cryophase und ist ausschließlich bei den Hirnen in der Thermophase lokalisierbar (Abb. 24 B, C). Interessanterweise kann diese Diskrepanz in LD-Zyklen nicht beobachtet werden, da sich das Maximum der *per-luc*-Expression aller Fliegengewebe, inklusive der Fliegenhirne, in der Mitte der Dunkelphase befindet (Abb. 24 A, B; Tab. 8; Abb. 25). Solche Unterschiede lassen eine mechanistische Differenz zwischen der Synchronisation an Licht- und Temperaturzyklen vermuten, die auf der Regulation der Oszillationen im Fliegenhirn basieren.

Zudem fällt auf, dass die Biolumineszenz der Hirne in Temperaturzyklen keine regelmäßigen Sinusschwingungen aufzeigen, wie sie bei allen anderen Geweben, sowie den Gehirnkulturen in LD-Zyklen beobachtet werden können (Abb. 24 A, B, C). Jedoch ist unklar, ob diese Experimente an kultivierten separierten Geweben repräsentativ für einen vollständigen und lebenden Organismus sind, da sich durch die Abtrennung vom Körper das natürliche Umfeld in Bezug auf Nährstoffversorgung und Signaltransfer verändert.

<b>XLG-luc</b>	<b>n</b>	<b>Periode (h)</b>	<b>rel.-Amp.F.</b>	<b>Phase (h)</b>
<b>LL und 10:14 h 25°:17°C</b>				
Adulte (89.7 % rhy)	145	24.2 ± 0.1	0.35 ± 0.01	18.1 ± 0.2
Beine	110	23.6 ± 0.1	0.15 ± 0.01	20.6 ± 0.1
Flügel	77	23.7 ± 0.1	0.17 ± 0.01	19.3 ± 0.2
Köpfe	73	23.8 ± 0.1	0.23 ± 0.01	21.4 ± 0.3
Abdomen	34	24.1 ± 0.1	0.22 ± 0.01	18.4 ± 0.4
Proboscis	22	23.5 ± 0.1	0.18 ± 0.01	20.4 ± 0.3
Halteren	16	23.6 ± 0.1	0.23 ± 0.02	20.3 ± 0.6
Hirne	39	24.4 ± 0.1	0.24 ± 0.01	7.6 ± 0.9
<b>LD 12:12 h und 25°C</b>				
Adulte (97,6 % rhy)	42	24.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02	19.8 ± 0.2
Beine	24	24.3 ± 0.1	0.14 ± 0.01	21.3 ± 0.1
Flügel	16	24.3 ± 0.1	0.09 ± 0.01	19.2 ± 0.2
Köpfe	21	23.9 ± 0.1	0.21 ± 0.02	22.7 ± 0.2
Abdomen	22	24.3 ± 0.1	0.30 ± 0.02	19.7 ± 0.4
Hirne	14	24.5 ± 0.1	0.36 ± 0.04	19.0 ± 0.4

**Tab 8. FFT-NLLS Analyse der Biolumineszenzdaten isolierter Körperteile von XLG-luc-Fliegen.** Die Biolumineszenz der isolierten Gewebe einer wildtypischen XLG-luc Fliege wurde für 6 Tage in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C, LL) oder in LD-Zyklen mit konst. 25°C gemessen. Mittels einer FFT-NLLS-Analyse wurden die Phasenlage, Periode und deren Signifikanz (rel.Amp.F) bestimmt. Die Anzahl (n) repräsentiert dabei entweder die getesteten Fliegen (bei Adulten) oder die Zahl der analysierten Körperteile.

Auffällig ist, dass die *per-luc* Expression der isolierten Hirne einen Unterschied in der Phasenlage zwischen LD- und Temperaturzyklen aufweist.

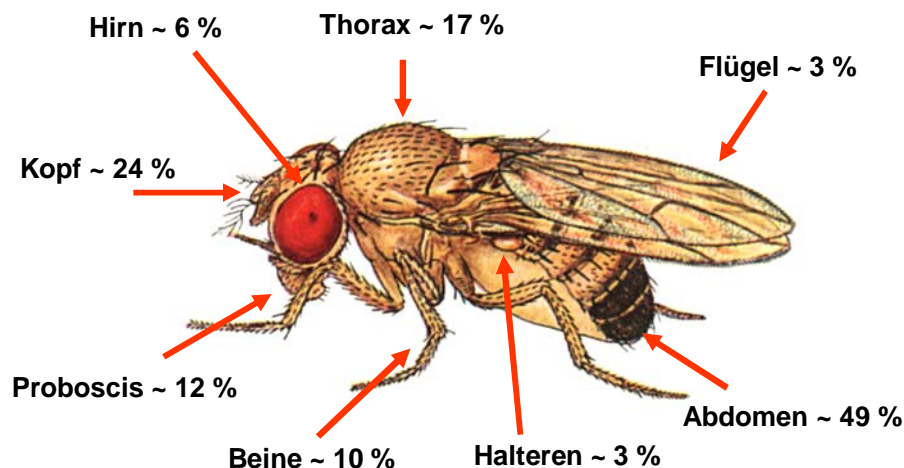


**Abb. 25. Phasenlage der Biolumineszenz isolierter Fliegengewebe in LD- und Temperaturzyklen.** In LL und Temperatur zeigen adulte Fliegen und isolierte Körperteile Peakphasen von ZT 18.1 bis ZT 21.4, bis auf das Hirn, welches bei ZT 7.6 peakt (oben). In LD und konst. 25°C liegen alle Maxima der *per-luc*-Expressionen, einschließlich der von Hirnen, zwischen ZT 19.0 und ZT 22.7 (unten). Die Balken repräsentieren die SEM-Werte.

Nahezu jedes Gewebe der Fliege besitzt circadiane Oszillatoren, die ein temperaturinduziertes rhythmisches Biolumineszenzsignal aussenden und demzufolge zu der Biolumineszenz einer adulten Fliege beitragen. Um die Frage zu beantworten, welche Körperteile dabei den größten Beitrag liefern, wurde die gewebespezifischen Signalstärke des *per-luc*-Reporters bestimmt. Eine Schwierigkeit dabei ist, dass im Gegensatz zur adulten Fliege, in Kultur möglicherweise auch andere Gewebereiche mit Luziferin in Kontakt geraten könnten. Die Signalsumme der Körperteile ergibt jedoch nahezu den selben Wert von adulten Fliegen, weshalb dieses Problem vernachlässigt werden kann. Obwohl die analysierten Daten aus wenigen, vergleichbaren Experimenten stammen (gleiche Luziferin-Charge, etc.), weisen die Mittelwerte große Abweichungen auf (Tab. 9). Deshalb geben die Ergebnisse nur eine Tendenz wieder, die zeigt, dass ein Großteil des gemessenen Signals bei adulten Fliegen aus dem Körper stammt (Tab. 9; Abb. 26).

<i>XLG-luc</i>	n	Signalstärke (CPS)	Anteil (%)
<b>LL und 10:14 h 25°C:17°C</b>			
Adulte	49	2232 ± 77	100
Köpfe	11	535 ± 56	24
Abdomen	15	1099 ± 148	49
Beine	26	227 ± 19	10
Thorax	-	-	17
Proboscis	22	264 ± 20	12
Halteren	16	65 ± 8	3
Hirne	39	123 ± 11	6
Flügel	31	65 ± 5	3
Beine	26	227 ± 19	10

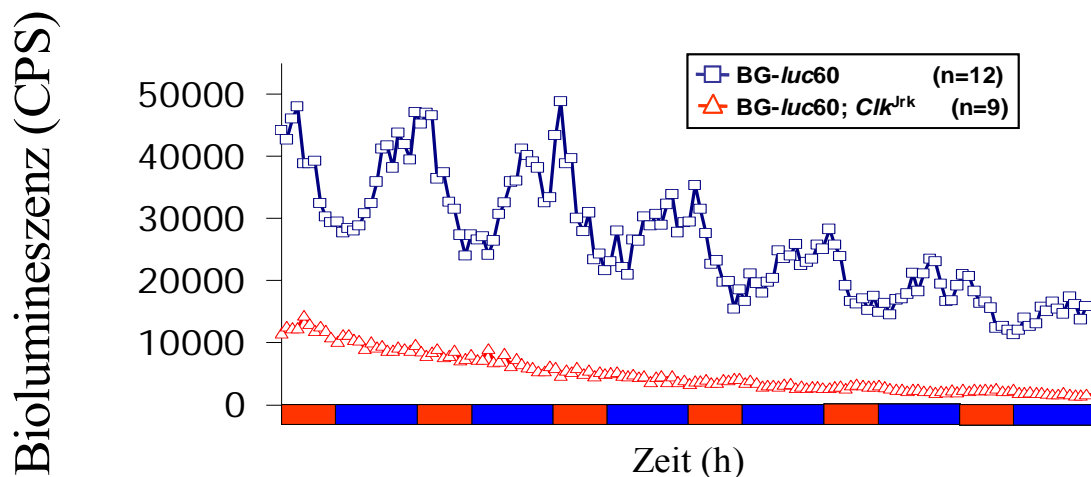
**Tab 9. Die Signalstärken einzelner isolierten *XLG-luc* Körperteile in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C; LL).** Die durchschnittliche Signalstärke der Biolumineszenz (Photonen-Counts pro Sekunde) liefert einen Anhaltspunkt über deren Anteil am Summensignal adulter Fliegen. Der Wert des Thorax wurde aus der Differenz 100-(Köpfe+Beine+Abdomen+Flügel) gebildet.



**Abb. 26. Prozentualer Anteil der einzelnen Gewebe am *XLG-luc* Biolumineszenz-Summensignal in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C; LL).** Aus den Durchschnittswerten der Biolumineszenz-Signalstärke der verschiedenen Körperteile wurde deren prozentualer Beitrag zum Signal adulter Fliegen berechnet. Dies zeigt, dass ein Großteil des Biolumineszenzsignals aus den peripheren Oszillatoren im Körper stammt. (Bildquelle: Flybase)

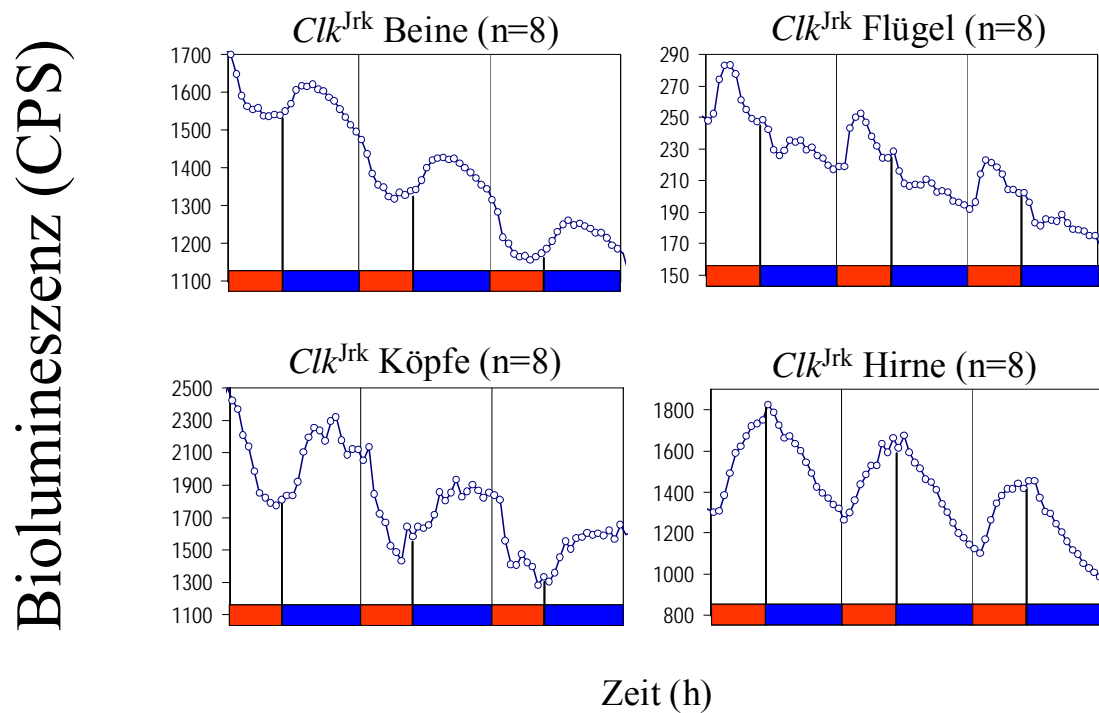
### 3.1.4 Temperaturinduzierte Biolumineszenzsignale im $Clk^{Jrk}$ - und $tim^{01}$ -Hintergrund

Betrachtet man die Biolumineszenzsignale der Fliegenhirne in Temperaturzyklen, so fällt auf, dass diese im Vergleich zu den anderen Körperteilen keine klaren Sinusschwingungen, sondern eher sägezahnartige Muster hervorbringen (Abb. 24 B, C). Es erscheint daher denkbar, dass jene durch direkte Effekte der Temperatur verursacht werden. Zur Klärung dieser Frage wurde daher die Biolumineszenz isolierter Körperteile von BG-*luc60*-Fliegen im  $Clk^{Jrk}$ -Hintergrund in LL und Temperaturzyklen analysiert. Diese dominant-negative Mutation im *Clock* Gen führt zum Verlust der molekularen Rhythmik (Abb. 27; Allada et al., 1998).



**Abb. 27. Biolumineszenzrhythmen von BG-*luc60* Fliegen im Wildtyp- und  $Clk^{Jrk}$ -Hintergrund in LL und 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau).** Die Mutation  $Clk^{Jrk}$  führt zum Zusammenbruch der molekularen Oszillationen und folglich zu einem linearen Biolumineszenzsignal. Es kann aber dennoch eine konstante Restmenge an PER-LUC beobachtet werden.

Während die  $Clk^{Jrk}$  Mutation in adulten Fliegen eine lineare Biolumineszenz auslöst (Abb. 27), lassen die peripheren Oszillatoren eine direkte Reaktion als Antwort auf die unterschiedlichen Temperaturen erkennen. Die Signale sind zwar den Oszillationen im Wildtyp-Hintergrund ähnlich, die genauere Analyse zeigt aber, dass sie relativ exakt den 10:14 Stunden Zyklus der Temperatur reflektieren, ohne die charakteristische Sinuskurven-Form aufzuweisen (Abb. 28). In Flügeln, Beinen und Köpfen wird der Level an PER-LUC durch die Temperatur moduliert. Die Gehirne zeigen hingegen eine konstante Zu- (25°C) oder Abnahme (17°C) der Biolumineszenz. Während die Flügel mit einem kurzen Signalanstieg auf die Thermophase reagieren, führen die hohen Temperaturen in den Beinen und Köpfen zu einem Abfall des Signals (Abb. 28).

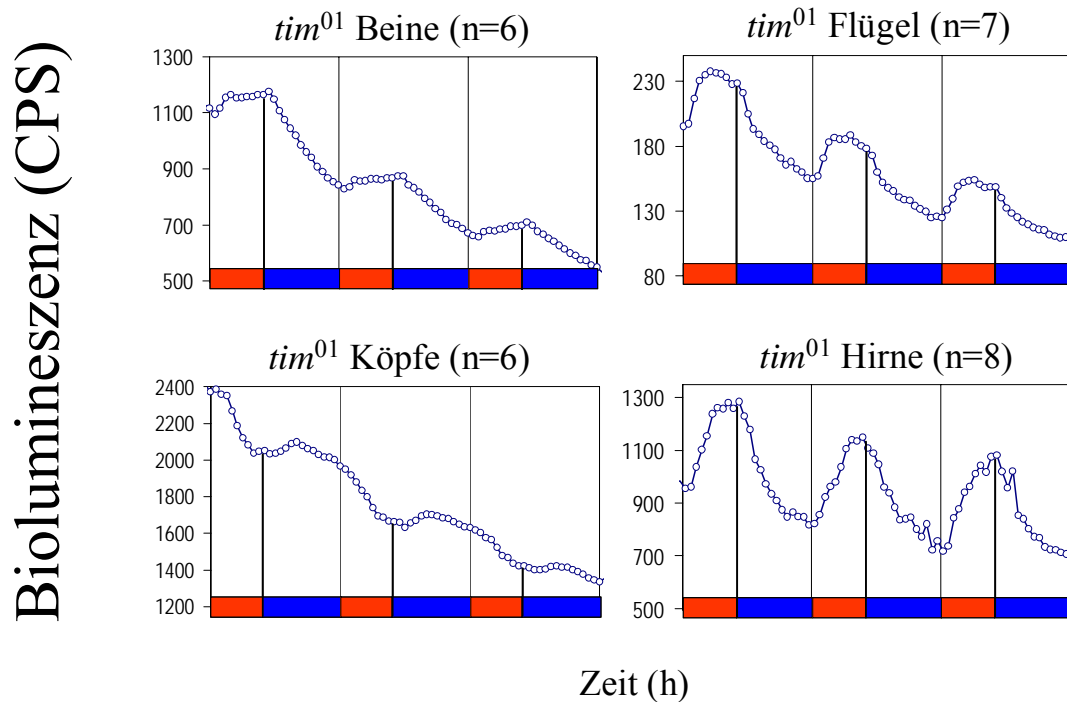


**Abb. 28. Biolumineszenzrhythmen isolierter Gewebe von BG-*luc60*; *Clk<sup>Jrk</sup>*-Fliegen in LL und 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau).** Entgegen adulten Tieren spiegelt die Biolumineszenz isolierter Gewebe auf unterschiedliche Weise die 10:14 h Temperaturzyklen wider: Während in Beinen und Köpfen die Temperatur das konstante Level der PER-LUC Menge beeinflusst, führt die Temperaturerhöhung in den Hirnen zur konstanten Zu- (25°C) oder Abnahme (17°C) der PER-LUC-Menge. Der schwarze Balken markiert den warm-kalt-Wechsel.

LL und 10:14 h 25°C:17°C	n	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>BG-<i>luc60</i>; <i>Clk<sup>Jrk</sup></i></b>				
Adulte (25.9 % rhy)	27	24.3 ± 0.1	0.59 ± 0.03	6.7 ± 0.6
Köpfe	9	24.1 ± 0.1	0.33 ± 0.05	20.2 ± 0.4
Beine	6	23.7 ± 0.4	0.34 ± 0.03	23.2 ± 2.5
Flügel	13	24.8 ± 0.1	0.42 ± 0.02	1.9 ± 0.5
Abdomen	6	24.7 ± 0.2	0.33 ± 0.05	15.6 ± 1.0
Hirne	12	24.1 ± 0.1	0.27 ± 0.02	6.2 ± 2.1
<b>BG-<i>luc60</i></b>				
Adulte (87.9 % rhy)	223	24.1 ± 0.1	0.39 ± 0.01	21.6 ± 0.2
Köpfe	56	24.2 ± 0.1	0.34 ± 0.02	21.0 ± 0.3
Beine	84	24.0 ± 0.1	0.24 ± 0.01	21.8 ± 0.2
Flügel	74	24.3 ± 0.1	0.22 ± 0.01	22.2 ± 0.2
Abdomen	35	24.1 ± 0.1	0.33 ± 0.02	20.9 ± 0.3
Hirne	20	24.2 ± 0.2	0.40 ± 0.03	5.2 ± 1.9

**Tab. 10. FFT-NLLS-Analyse der Biolumineszenz isolierter Körperteile von BG-*luc60* Fliegen im *Clk<sup>Jrk</sup>* - und Wildtyp-Hintergrund in Temperaturzyklen und LL.** Im Gegensatz zum Kontrollstamm weisen nur wenig adulte *Clk<sup>Jrk</sup>*-Fliegen schlecht synchronisierte Rhythmen auf (rel.Amp.F. > 0.50). Die Phasen der isolierten *Clk<sup>Jrk</sup>*-Körperteile reflektieren die direkte Reaktion auf die Temperaturzyklen.

Derartige Temperatureffekte in der Biolumineszenz lassen sich gleichermaßen im *tim*<sup>01</sup>-Hintergrund beobachten (Abb. 29). Die Flügel reagieren auf den Temperaturanstieg mit einem erhöhten Biolumineszenzsignal, während dies in den Beinen und Köpfen als Reaktion auf die kalten Temperaturen geschieht. Ähnlich dem *Clk*<sup>Jrk</sup>-Hintergrund weisen auch die *tim*<sup>01</sup>-Hirne eine temperaturinduzierte Zu- bzw. Abnahme des Biolumineszenzsignals in Abhängigkeit von Temperatur auf (Abb. 29; Tab. 11).



**Abb. 29. Biolumineszenzsignale von isolierten XLG-luc Geweben im *tim*<sup>01</sup>-Hintergrund (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Ähnlich dem *Clk*<sup>Jrk</sup>-Hintergrund weist die Biolumineszenz von *tim*<sup>01</sup>-Fliegen auch direkte Effekte durch Temperaturwechsel auf.

Die Tatsache, dass die Temperaturzyklen in den *Clk*<sup>Jrk</sup>- und *tim*<sup>01</sup>-Gewebekulturen ausschließlich direkte Effekte induzieren spricht dafür, dass die temperaturinduzierten Rhythmen in den peripheren Geweben der Wildtyp-Fliegen die molekularen Oszillationen der circadianen Uhr wiedergeben.

Interessanterweise können bei allen getesteten Gehirnkulturen, unabhängig von *Clk*<sup>Jrk</sup>-, *tim*<sup>01</sup> oder Wildtyp-Hintergrund, in Temperaturzyklen diese sägezahnartigen Biolumineszenzsignale beobachtet werden, die zudem auch eine ähnliche Phasenlage besitzen (Tab. 11). Dies deutet darauf hin, dass in den Hirnen mittels Temperaturzyklen keine circadianen Oszillationen induziert werden können. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass das neuronale Gewebe als Folge der Präparation einen Schaden erleidet, die Anzahl der getesteten Hirne (n=248; Tab. 11) und die Synchronisation in LD-Zyklen sprechen jedoch eindeutig dagegen (Abb. 24 B).

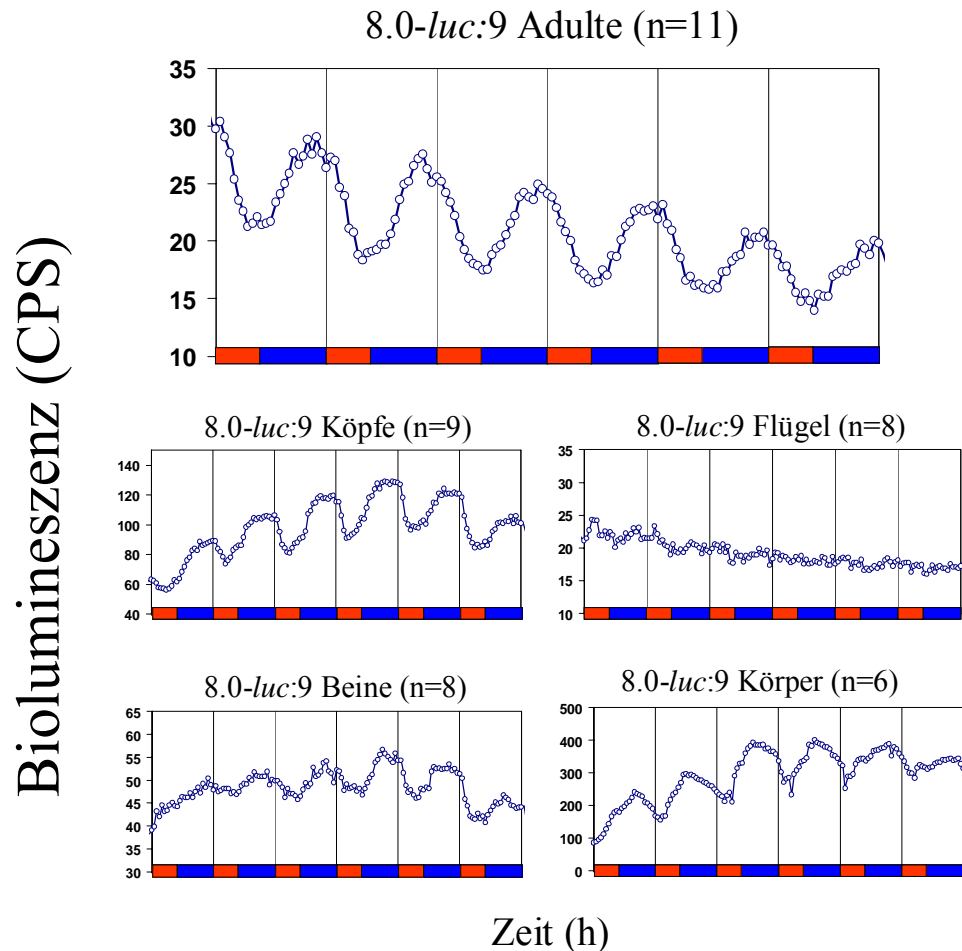
Isolierte Hirne	n	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>LL und 10:14 h 25°:17°C</b>				
BG- <i>luc60</i> ; <i>Clk<sup>Jrk</sup></i>	12	24.1 ± 0.1	0.27 ± 0.02	6.2 ± 2.1
BG- <i>luc60</i>	20	24.2 ± 0.2	0.40 ± 0.03	5.2 ± 1.9
BG- <i>luc60</i> , <i>nocte</i>	13	24.0 ± 0.2	0.35 ± 0.04	3.5 ± 2.4
XLG- <i>luc</i>	39	24.4 ± 0.1	0.24 ± 0.01	7.6 ± 0.9
<i>tim<sup>01</sup></i> ; XLG- <i>luc</i>	17	24.2 ± 0.1	0.36 ± 0.02	6.7 ± 1.9
<i>norpa<sup>P41</sup></i> ; XLG- <i>luc</i>	23	24.3 ± 0.1	0.34 ± 0.03	4.6 ± 1.8
<i>yw</i> ; 8.0- <i>luc</i> :9D	39	24.1 ± 0.1	0.26 ± 0.02	5.1 ± 1.4
<i>per<sup>01</sup></i> ; 8.0- <i>luc</i> :9D	12	23.8 ± 0.1	0.29 ± 0.05	7.3 ± 0.3
<i>disco</i> ; 8.0- <i>luc</i> :9D	14	24.3 ± 0.1	0.24 ± 0.02	6.7 ± 2.0
<i>yw</i> ; 8.0- <i>luc</i> :2	15	24.2 ± 0.1	0.30 ± 0.03	6.3 ± 1.8
<i>per<sup>01</sup></i> ; 8.0- <i>luc</i> :2	20	23.8 ± 0.1	0.31 ± 0.02	7.1 ± 1.5
<i>norpa<sup>P41</sup></i> ; 8.0- <i>luc</i> :9D	12	24.1 ± 0.1	0.21 ± 0.02	8.9 ± 0.4
<i>norpa<sup>P41</sup></i> ; 8.0- <i>luc</i> :9D; <i>cry<sup>b</sup></i>	12	24.0 ± 0.1	0.17 ± 0.02	9.9 ± 0.3
<b>12:12 h LD, konst. 25°C</b>				
XLG- <i>luc</i>	14	24.5 ± 0.1	0.36 ± 0.04	19.0 ± 0.4

**Tab. 11. FFT-Analyse der Biolumineszenz isolierte Hirne von *per-luc* Fliegen in verschiedenen genetischen Hintergründen (in LL und Temperaturzyklen bzw. LD und konst. 25°C).** Die Rhythmen aller isolierten Gehirne, einschließlich jener im arrhythmischen *Clk<sup>Jrk</sup>*- oder *tim<sup>01</sup>*-Hintergrund, weisen in Temperaturzyklen ähnliche Phasen auf, die um ca. 10 Stunden von den isolierten Wildtyp-Gehirnen in LD-Zyklen abweichen.

### 3.1.5 Die 8.0-*luc*-Expression ist nicht auf das Hirn beschränkt

Resultierend aus den Ergebnissen der separierten Fliegenhirne stellt sich Frage, wie sich die Biolumineszenz der Hirne einer lebenden Fliege in Temperaturzyklen verhält. Aus diesem Grund wurde auf das 8.0-*luc* Reporterkonstrukt zurückgegriffen. Dieses beinhaltet zwar den vollständigen *period* ORF, jedoch nicht den Promotor und keine Teile der 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 15; Veleri et al., 2003). Dadurch können stabile Expressionsmosaiken erzeugt werden, die nur auf Teilgruppen aller *period* exprimierenden Zellen beschränkt sind (Frisch et al., 1994). Die verwendeten 8.0-*luc* Fliegenlinien #2 und #9 exprimieren den *per-luc* Reporter selektiv in den DN<sub>s</sub> (8.0-*luc*:9D: DN<sub>1</sub>-DN<sub>3</sub>), bzw. in den DN<sub>s</sub> und LN<sub>d</sub>'s (8.0-*luc*:2), was eine Analyse der PER-Oszillation innerhalb dieser Neuronengruppen *in-vivo* ermöglicht (Wuelbeck et al., 2005; Veleri et al., 2003). Im Laufe dieser Arbeit konnten aber - entgegen dem veröffentlichten Expressionsmuster - auch in isolierten Beinen und Körpern (= Thorax und Abdomen) Biolumineszenzsignale erfasst werden, die im Vergleich zu adulten Fliegen ein sehr hohes Level erreichen (Abb. 30).

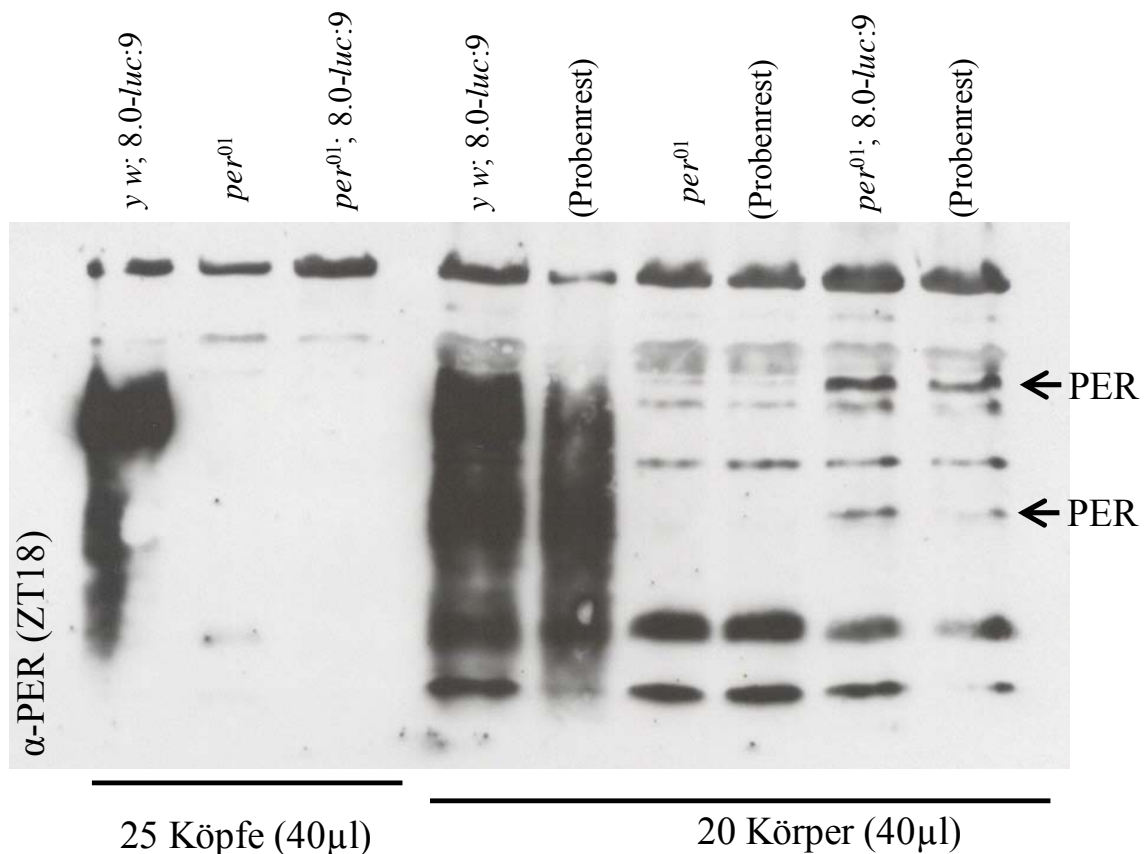




**Abb. 30. Temperaturinduzierte (LL und 10:14 h 25°C:18°C=rot:blau) Biolumineszenzsignale von 8.0-*luc*:9 Adulten und Gewebekulturen.** Rhythmische Biolumineszenz adulter 8.0-*luc*:9 Fliegen (oben). Entgegen dem publizierten Expressionsmuster können auch in Beinen und Körpern (= Thorax und Abdomen) Luziferase-Signale festgestellt werden (unten).

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden an synchronisierten *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc*:9 Köpfen und Körpern Westernblots mit PER-Antikörper durchgeführt (Abb. 31). Dabei ist aufgrund der *period*-Nullmutation (Stoppcodon nach 463 AS) lediglich in den 8.0-*luc* exprimierenden Zellen ein detektierbares PERIOD Protein vorhanden (Yu et al., 1987; Baylies et al., 1987). In den Köpfen kann ausschließlich im Wildtyp-Hintergrund eine  $\alpha$ -PER-Färbung beobachtet werden. Die PER-Menge in den *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc*:9 Fliegen ist unterhalb der Nachweisgrenze, was mit der restriktiven Expression in einzelnen Neuronensubgruppen übereinstimmt. Eine sehr schwache PER-Bande herrscht dagegen in den Körpern vor (Abb. 31). Somit scheint die Expression des 8.0-*luc*:9 Reporters nicht nur auf einzelne Uhrneuronen im Hirn beschränkt zu sein. Angesichts der sehr niedrigen Signalwerte adulter Fliegen erscheint es als unsicher, ob zu diesem Signal auch die 8.0-*luc* Expression im Körper beiträgt. Diese könnte ebenso in Gewebebereichen stattfinden, die in

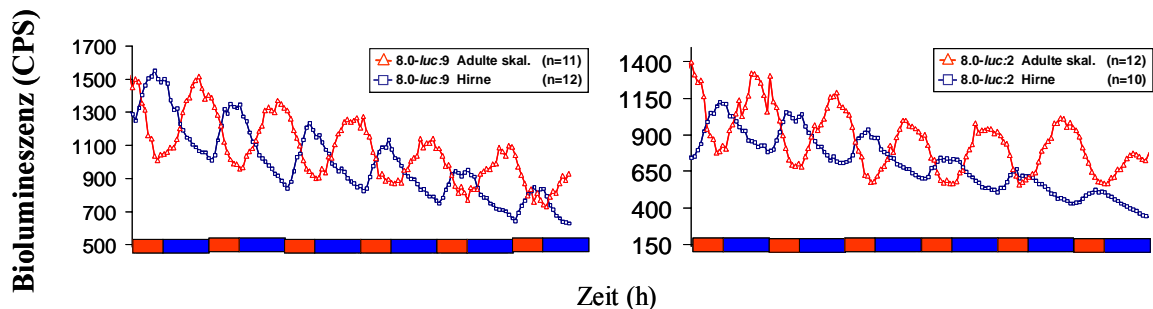
der adulten Fliege nicht mit Luziferin in Kontakt kommen, wohl aber in den isolierten Geweben. Zudem weisen adulte 8.0-*luc* Fliegen unter konstanten Bedingungen (DD und konst. Temperatur) fortdauernde Biolumineszenzrhythmen auf (Veleri et al., 2003), während die Oszillationen aller anderen Reporterkonstrukte ausdämpfen (Plautz et al., 1997a). Trotz der 8.0-*luc* Expression im Körper scheinen somit die Signale der adulten 8.0-*luc* Fliegen neuronalen Ursprungs zu sein.



**Abb. 31. Westernblot mit  $\alpha$ -PER Färbung von Fliegenköpfen und Körpern (LD-Synchronisation, ZT18).** Proteine aus Kopfhomogenisaten von y w; 8.0-*luc*:9, *per*<sup>01</sup> und *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc*:9 (Spur 1-3): Nur in der Wildtyp-Kontrolle (y w) lässt sich PER-Protein detektieren, die PER-Menge in den *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc*:9 Köpfen befindet sich unterhalb der Nachweisgrenze. In den 8.0-*luc*:9 Körpern (Spur 4-6) kann hingegen sowohl im Wildtyp, als auch in geringer Menge im *per*<sup>01</sup> Hintergrund ein PER-Signal festgestellt werden.

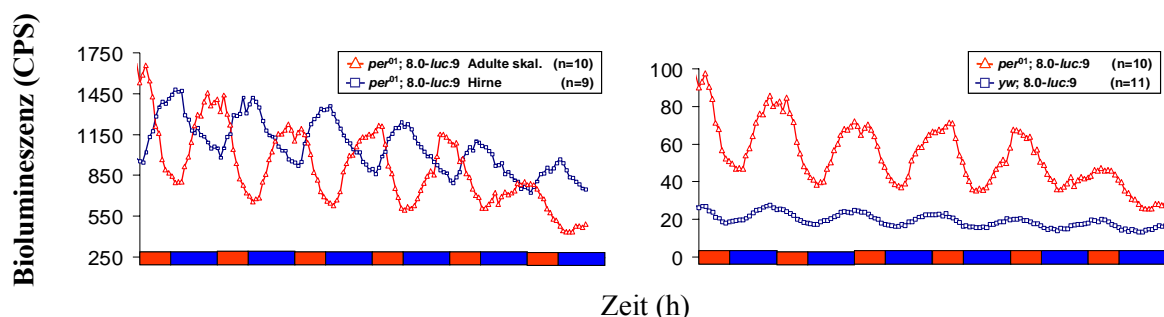
### 3.1.6 Differenz zwischen 8.0-*luc*-Adulten und separierten Hirnen

Die Analyse temperaturinduzierter Biolumineszenz von Hirnen *in-vivo* erfolgte an Fliegen und Hirnkulturen mit Hilfe des 8.0-*luc* Reportergens. Ähnlich dem *Clk<sup>Jrk</sup>*- und *tim<sup>01</sup>*-Hintergrund zeigen die separierten 8.0-*luc*-Hirne einen direkten Effekt der Biolumineszenz auf die Temperaturzyklen (Abb. 32). Dagegen sind die temperaturinduzierten Rhythmen adulter 8.0-*luc* Tiere mit den Signalen von Adulten oder peripheren Geweben anderer Reporterkonstrukte vergleichbar (Abb. 32; Abb. 30; Abb. 20).



**Abb. 32. Phasenunterschied zwischen separierten 8.0-*luc* Hirnen und Adulten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).** Die Biolumineszenzsignale der 8.0-*luc* exprimierenden Neuronen (#2: DN's + LN<sub>d</sub>, #9: DN's) in separierten Hirnen liefern eine andere Phase als die gesamte Fliege. Aufgrund des Signalunterschieds wurden die Werte der adulten Fliegen um den Faktor 55 (#9) bzw. 20 (#2) verstärkt, damit die Datensätze in einem Diagramm dargestellt werden konnten.

Entsprechende Ergebnisse lassen sich auch im *per<sup>01</sup>*-Hintergrund beobachten, obwohl die *per<sup>01</sup>*; 8.0-*luc* Fliegen nur in den 8.0-*luc* exprimierenden Zellen eine vollständig funktionierende Uhr besitzen (Abb. 33). Im Vergleich zu den *per<sup>+</sup>* Tieren ist jedoch im *per<sup>01</sup>*-Hintergrund das Expressionslevel erhöht und zudem die Phase nach hinten verschoben (Abb. 33; Tab. 12). Die Tatsache, dass PER eine zentrale Rolle als Repressor in der molekularen Rückkopplungsschleife bekleidet (Rothenfluh et al., 2000; Collins et al., 2006), bietet einen Hinweis, dass diese Rhythmen von der Uhr reguliert werden.



**Abb. 33. Effekt von *per<sup>01</sup>* auf das 8.0-*luc* Biolumineszenzsignal (LL, 10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).** Die *per<sup>01</sup>*-Mutation hat keinen Einfluss auf die Phasenlage der Expression in isolierten Hirnen (links; vgl. Abb. 32). Bei den *per<sup>01</sup>*-Adulten ist aber im Vergleich zu den *per<sup>+</sup>*-Tieren das Expressionslevel stark erhöht (rechts). Die Biolumineszenzdaten der Adulten im linken Diagramm wurde um den Faktor 13 verstärkt.

Aus genannten Gründen scheint der Unterschied zwischen den separierten Hirnen und den Adulten der 8.0-*luc* Linie darauf hinzudeuten, dass die *per-luc*-Expression in den dorsalen Uhrneuronen in Kontakt zu dem umgebenden Gewebe (=Peripherie) stehen muss, damit deren Oszillationen mittels Temperaturzyklen synchronisiert werden können.

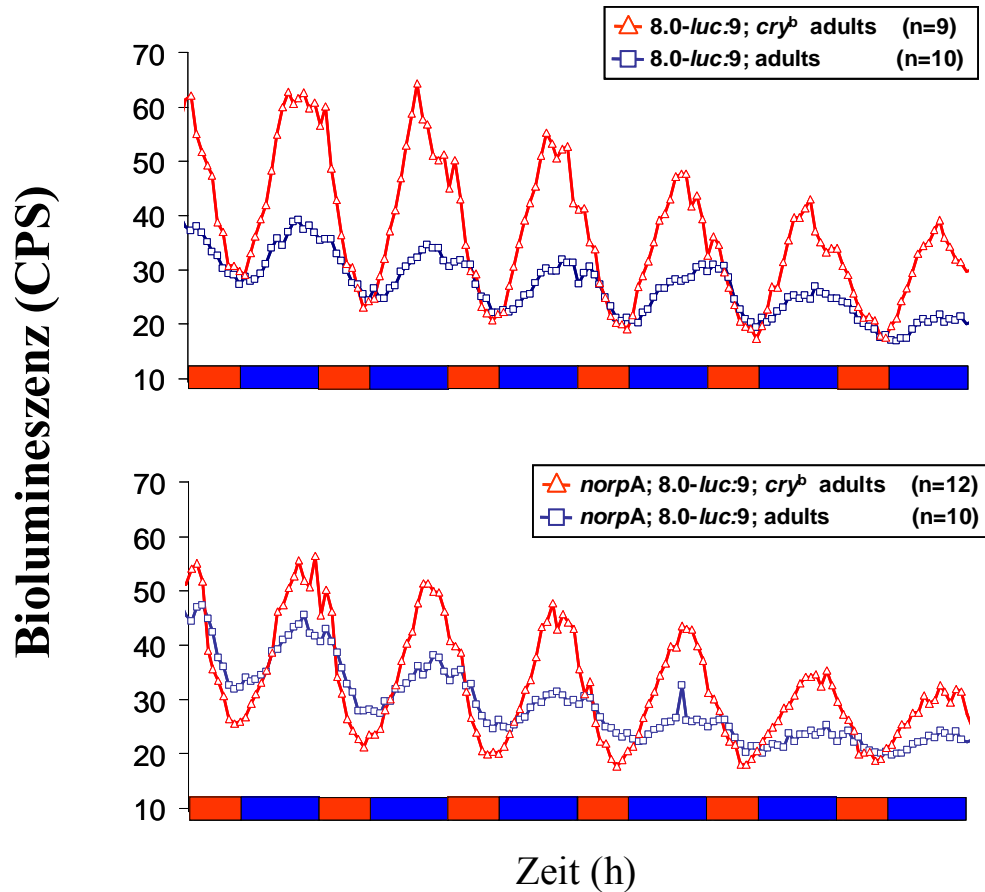
LL und 10:14 h 25°:17°C	n	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b><i>yw</i>;8.0-<i>luc</i>:9D</b>				
<b>Adulte (89.5 % rhy)</b>	114	24.1 ± 0.1	0.30 ± 0.01	22.0 ± 0.2
<b>Hirne</b>	28	24.1 ± 0.1	0.24 ± 0.02	5.5 ± 1.6
<b><i>per</i><sup>01</sup>;8.0-<i>luc</i>:9D</b>				
<b>Adulte (85.7 % rhy)</b>	63	24.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02	23.7 ± 0.2
<b>Hirne</b>	12	23.8 ± 0.1	0.29 ± 0.05	7.3 ± 0.3
<b><i>yw</i>; 8.0-<i>luc</i>:9D;<i>cry</i><sup>b</sup></b>				
<b>Adulte (91.7 % rhy)</b>	12	23.5 ± 0.1	0.25 ± 0.04	22.1 ± 0.5
<b><i>yw</i>;8.0-<i>luc</i>:2</b>				
<b>Adulte (97.2 % rhy)</b>	36	24.1 ± 0.1	0.27 ± 0.02	22.0 ± 0.3
<b>Hirne</b>	15	24.2 ± 0.1	0.30 ± 0.03	6.3 ± 1.8
<b><i>per</i><sup>01</sup>;8.0-<i>luc</i>:2</b>				
<b>Adulte (73.1 % rhy)</b>	26	23.7 ± 0.1	0.44 ± 0.02	2.3 ± 0.3
<b>Hirne</b>	20	23.8 ± 0.1	0.31 ± 0.02	7.1 ± 1.5
<b><i>norpA</i><sup>P41</sup>;8.0-<i>luc</i>:9D</b>				
<b>Adults (90.0 % rhy)</b>	50	24.1 ± 0.1	0.34 ± 0.02	22.8 ± 0.4
<b>Hirne</b>	12	24.1 ± 0.1	0.21 ± 0.02	8.9 ± 0.4
<b><i>norpA</i><sup>P41</sup>; 8.0-<i>luc</i>:9D;<i>cry</i><sup>b</sup></b>				
<b>Adulte (100.0 % rhy)</b>	23	23.6 ± 0.1	0.26 ± 0.03	22.1 ± 0.3
<b>Hirne</b>	12	24.0 ± 0.1	0.17 ± 0.02	9.9 ± 0.3

**Tab. 12. FFT-Analyse der 8.0-*luc* Biolumineszenzdaten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C).** Alle getesteten Hirnkulturen zeigen ähnliche Phasenlagen in der Thermophase (25°C). Die 8.0-*luc* Rhythmen der *per*<sup>+</sup> Adulten weisen Phasen auf, die denen wildtypischer Adulten anderer Reporter gleichen (Tab. 16). Bei den *per*<sup>01</sup>-Fliegen ist hingegen die Phase nach hinten verschoben.

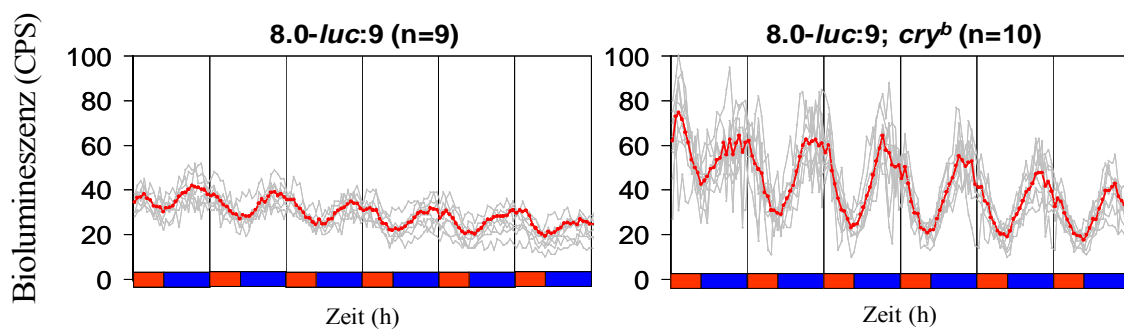
### 3.1.7 8.0-*luc*-Expression im *cry*<sup>b</sup>-Hintergrund

Temperaturzyklen synchronisieren das Lokomotorverhalten sowie die molekularen Oszillationen von PER und TIM in *cry*<sup>b</sup> Fliegen (Abb. 47; Stanewsky et al., 1998). Wird die Funktion des circadianen Photorezeptors genetisch blockiert (*cry*<sup>b</sup>), hat dies eine 1,8-fache Amplitudenverstärkung (1,3 → 2,3) der 8.0-*luc*-Biolumineszenzrhythmen zur Folge (Abb. 34). Die genetische Ablation der auf Rhodopsin-basierenden Photorezeptoren durch eine *norpA* Mutante verändert die Amplitude nicht. Somit wird diese Entkopplung spezifisch durch den defekten circadianen Photorezeptor ausgelöst (Abb. 34, unten).

Da dieser enthemmende Effekt von *cry<sup>b</sup>* aber ausschließlich mit dem 8.0-*luc*-Reportergen beobachtet werden kann, nicht aber in BG-*luc* Fliegen (Abb. 47), scheint es sich um einen neuronalen Effekt zu handeln.



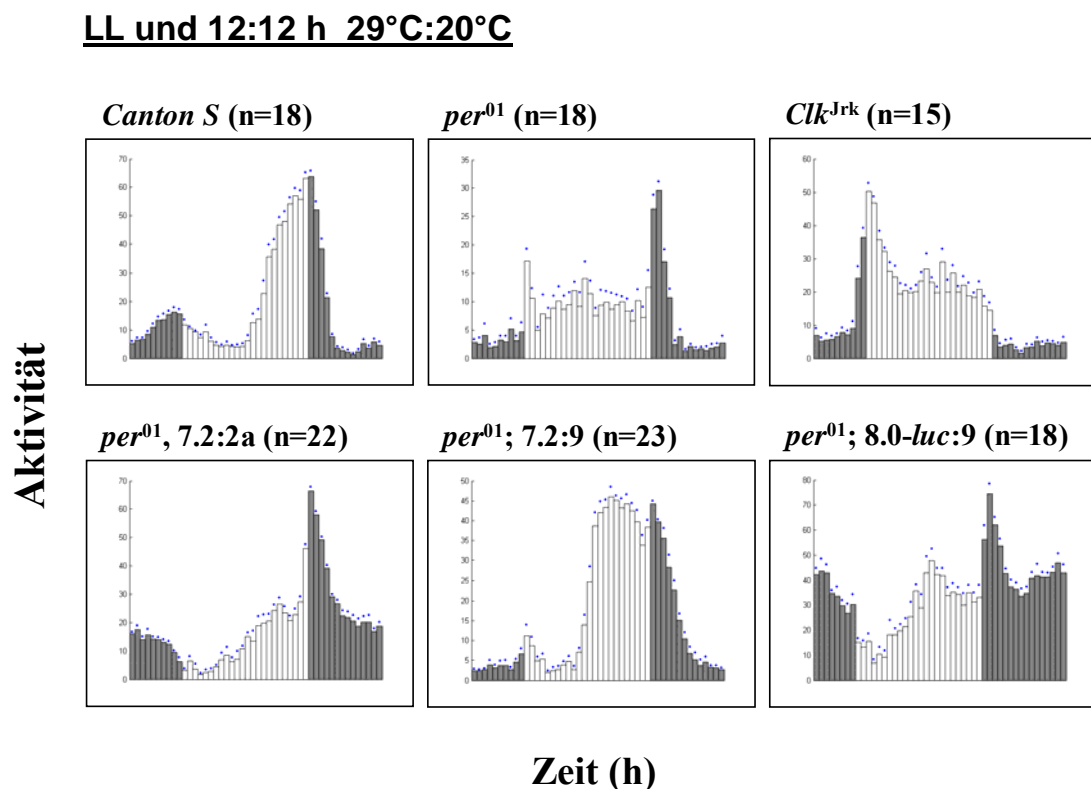
**Abb. 34. 8.0-*luc* Expression im *cry<sup>b</sup>*- und *norpA<sup>P41</sup>*; *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL). Die genetische Ablation des circadianen Photorezeptors (*cry<sup>b</sup>*) hat eine Amplitudenverstärkung der 8.0-*luc* Biolumineszenzsignals zur Folge (oben). Die zusätzliche genetische Ablation des durch PLC vermittelten Lichtinputs zeigt keinen Effekt (unten).**



**Abb. 35. Summen- und Einzelgraphen von 8.0-*luc*:9-Tieren im Wildtyp und *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C, LL). Die Darstellung zeigt, dass die Durchschnittsgraphen der Biolumineszenzrhythmen (rot) repräsentativ für die eingerechneten Einzeldaten (grau) sind.**

### 3.1.8 Temperatursynchronisation von *per*<sup>01</sup>; *per* 7.2-Fliegen

Die Experimente mit den isolierten Gehirnen werfen die Frage auf, ob die Peripherie zur Temperatursynchronisation der adulten Tiere beiträgt. Aus diesem Grund wurde auf *per*<sup>01</sup>-Fliegen mit dem *per*7.2-Konstrukt zurückgegriffen, da diese selektiv in bestimmten Geweben eine funktionierende Uhr besitzen (Frisch et al., 1994). Die Expression eines solchen Konstrukts mit 7.2 kb der genomischen *period* DNA (*per* 7.2; Abb. 15) erfolgt mosaikisch, weshalb die *per*<sup>01</sup>-Mutation entweder nur in den LNs (*per* 7.2:2a), oder in allen Uhrneuronen und peripheren Geweben (*per* 7.2:9) gerettet wird (Frisch et al., 1994). Von beiden Stämmen wurde die rhythmischer Laufaktivität in LL und Temperaturzyklen analysiert (Abb. 36).



**Abb. 36. Temperatursynchronisation der Lokomotorrhythmik von *per*<sup>01</sup> Fliegen mit verschiedenen *period*-Konstrukten.** *CantonS*-Wildtypfliegen zeigen ein bimodales Verhalten in LL und Temperaturzyklen, wobei die Abendaktivität stärker ausgeprägt ist. Die Aktivitätssteigerung gegen Ende des Tages spiegelt die Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels wieder (Abb. 58 C). Die Fliegen mit genetisch zerstörter molekularer Oszillation (*per*<sup>01</sup> und *ClkJrk*) zeigen als direkte Reaktion auf die erhöhte Temperatur eine Aktivitätssteigerung in der Thermophase. Wird das Rettungskonstrukt hingegen in allen Neuronen und in der Peripherie exprimiert (7.2:9), bringen die *per*<sup>01</sup>-Fliegen ein wildtypisches Verhaltensmuster hervor. Die Expression in den LNs (7.2:2a) hingegen reicht nicht aus, um das Lokomotorverhalten in Temperaturzyklen vollständig zu retten. Es bewirkt zwar eine Repression der Aktivität zu Anfang der Thermophase, nicht aber während der Nacht. Ein ähnliches Ergebnis liefern die *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc*:9-Fliegen, die nur in den DN und wenigen Zellen in der Peripherie eine vollständig funktionstüchtige Uhr besitzen.

Während in LD-Zyklen und konstanter Temperatur das Lokomotorverhalten beider Linien gut synchronisiert wird (Frisch et al., 1994), zeigt sich in LL und Temperaturzyklen ein klarer Unterschied (Abb. 36). Sind die Oszillatoren in allen Neuronen und der Peripherie voll funktionsfähig ( $per^{01}; 7.2:9$ ), führt dies - ähnlich den wildtypischen *CantonS*-Fliegen - zu einem bimodalen Aktivitätsmuster und einer klaren Repression der Aktivität während der Cryophase. Die Abendaktivität, welche eine Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels durch eine funktionierende circadiane Uhr in LL und Temperaturzyklen erkennen lässt (Yoshii et al., 2002), verschiebt sich dabei jedoch etwas in den Tag. Besitzen hingegen nur die LN's eine vollständig funktionierende circadiane Uhr ( $per^{01}$ , 7.2:2), ist die Aktivität während der Warmphase stark gedämpft und die Morgenaktivität nicht zu differenzieren. Auffällig ist, dass die Repression der Aktivität nachts nur schwach ausgeprägt ist. Ähnliche Beobachtungen können auch an  $per^{01}; 8.0-luc:9$  Fliegen getätigt werden, die nur in den DN's und wenigen Zellen in der Peripherie eine funktionierende Uhr besitzen. Die Repression des Verhaltens innerhalb Cryophase funktioniert nicht, zudem ist die Aktivität während warmen Temperaturen abgedämpft.

Beide Fliegenlinien ( $per^{01}$ ; 7.2:2a und  $per^{01}$ ; 8.0-*luc*:9) scheinen Daueraktivität aufzuweisen, die stark auf die Warm-Kalt-Wechsel reagiert: Während ein Anstieg der Temperatur die Aktivität kurz unterdrückt und sich diese wieder auf einem Level einpendelt, führt der Temperaturabfall zu einer kurzen Verstärkung der Aktivität (Abb. 36).

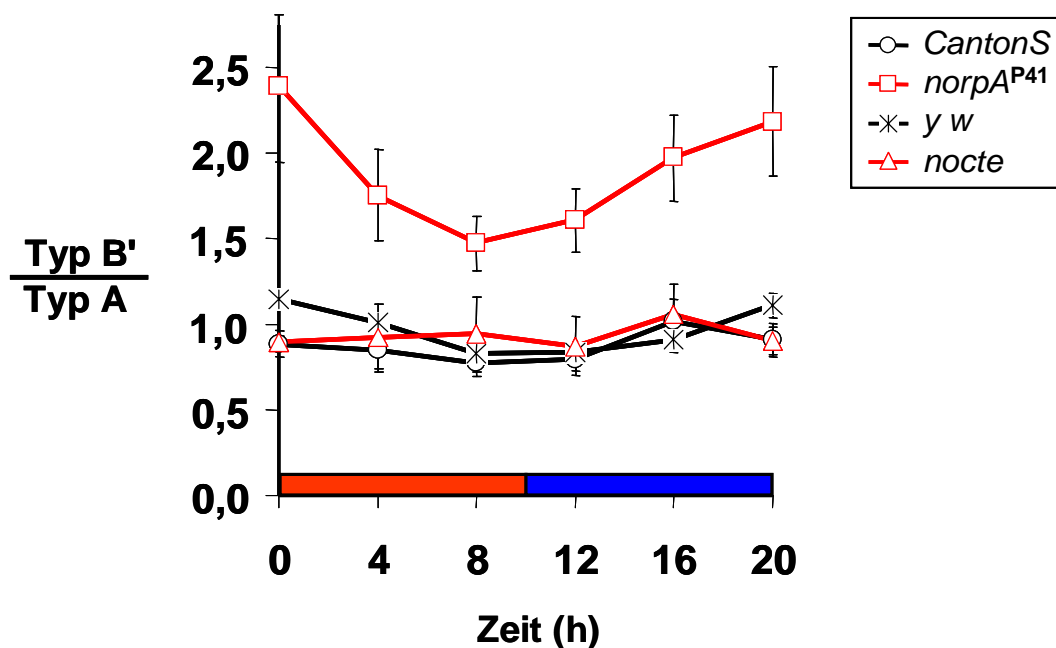
Dies zeigt, dass im Gegensatz zu LD-Zyklen die Funktion der LNs (s-LN<sub>v</sub> und l-LN<sub>v</sub>) oder DN's (DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub>, DN<sub>3</sub>) in Temperaturzyklen nicht zur Synchronisation des Laufverhaltens ausreicht, sondern weitere Neuronen bzw. periphere Signale dazu beitragen.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte beobachten, dass M-Zellen (s-LN<sub>v</sub> und l-LN<sub>v</sub>) zur Synchronisation der rhythmischen Aktivität in Temperaturzyklen, sowie zur fortdauernden Rhythmik in darauf folgenden konstanten Bedingungen benötigt werden. Die Rekonstruktion der PER-Oszillationen in den M-Zellen ( $per^{01}; cry$ -PER) führt jedoch zu dem Resultat, dass neben den klassischen Uhrneuronen zum Temperatur-Entrainment noch andere Neuronen beitragen (A.Busza und P.Emery, persönliche Mitteilung).

### 3.1.9 Spleißen des untranslatierten 8. Introns der *period* m-RNA

Ein alternatives Spleiß-Event im untranslatierten Bereich der *period* m-RNA stellt eine Strategie dar, um die molekularen Oszillationen der Transkripte und Proteine von *period* und *timeless* an jahreszeitliche Schwankungen in Temperatur und Tageslänge anzupassen

(Majercak et al., 1999). Warme Durchschnittstemperaturen und lange Photoperioden inhibieren das Spleißen des untranslatierten 8. Introns der *period* 3'-UTR-Region. Demgegenüber führt an kalten, kurzen Tagen eine Verstärkung dieses Spleiß-Ereignisses zur rascheren Akkumulation der täglich schwankenden *period* Transkript-Menge, verbunden mit einer nach vorne verschobenen Abend-Lokomotoraktivität (Majercak et al., 2004; Majercak et al., 1999). Die PhospholipaseC (PLC) ist in die temperaturabhängige Regulation (Inhibition) dieses Spleiß-Ereignisses involviert, da *loss-of-function* Mutationen der PLC (z.B. *norpA*<sup>P41</sup>) das Gleichgewicht in Richtung gespleißter *period* m-RNA verschieben (Majercak et al., 2004; Collins et al., 2004). Dieser Mechanismus könnte deshalb theoretisch auch zur täglichen Synchronisation an Temperaturzyklen beitragen, weshalb das Verhältnis beider Spleißformen nach 3 Tagen in LL und Temperaturzyklen (25°C:18°C) in Wildtypfliegen und Mutanten untersucht wurde (Abb. 37; Abb. 38).



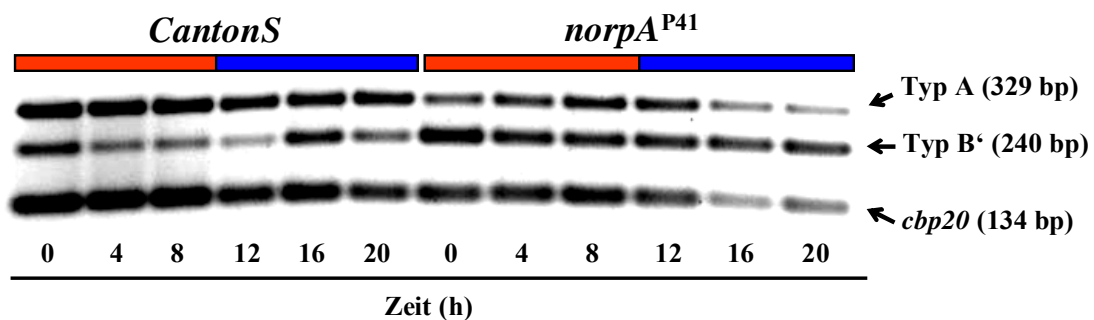
**Abb. 37. Spleißen des 8. Introns im 3'-UTR der *period* m-RNA (in LL und 12:12 h 25°C:18°C=rot:blau).** Ähnlich Licht-Dunkel-Zyklen ist in der *norpA*-Mutante die gespleißte Form der *period* m-RNA vorherrschend. In den Kontrollen und den *nocte*-Fliegen liegen vergleichbare Mengen an gespleißter und ungespleißter m-RNA vor.

Analog zu den Ergebnissen in LD-Zyklen dominiert im *norpA*<sup>P41</sup>-Hintergrund die gespleißte B'-Form (1,5- bis 2,5-fache Menge), was durch das Fehlen der PhospholipaseC als Repressor verursacht wird (Majercak et al., 2004).

In den Kontrollfliegen (*CantonS*, *y w*) und der Temperatur-Entrainment-Mutante *nocte* liegen hingegen gespleißte (Typ B') und ungespleißte Varianten (Typ A) in ungefähr



gleicher Menge vor (Abb. 37), was den inhibitorischen Effekt des Dauerlichts (LL) widerspiegelt (Majercak et al., 2004; Majercak et al., 1999). In *norpA*-Fliegen weist die RNA zudem eine Oszillation auf, die aufgrund des niedrigen Verhältnisses (TypB'/Typ A) bei den anderen genetische Hintergründen aus der Auftragung nicht ersichtlich ist. Obwohl in wildtypischen Fliegen dieses Spleißereignis durch das Dauerlicht gehemmt wird, erfolgt eine robuste Temperatursynchronisation der molekularen Uhr (Abb. 20). Dadurch kann ein maßgeblicher Beitrag dieses Mechanismus zur täglichen Synchronisation der circadianen Uhr mittels Temperaturzyklen ausgeschlossen werden (Glaser and Stanewsky, 2005).



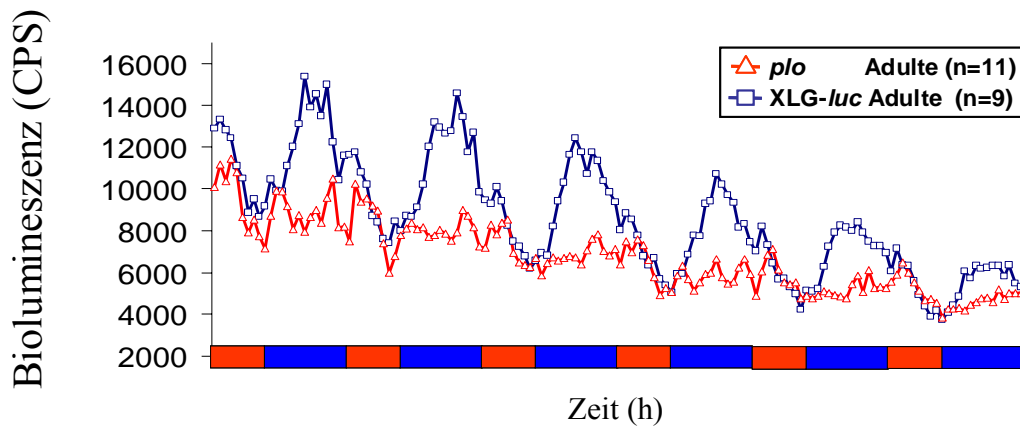
**Abb. 38. Gelphotographie der verschiedenen *period* Spleißformen im Wildtyp und in *norpA*-Mutanten während Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C=rot:blau, LL).**

Zu sehen sind die auf dem Gel aufgetragenen m-PCR-Reaktionen von *CantonS* und *norpA*. Im Vergleich zum Wildtyp liegt in der *norpA*-Mutante deutlich mehr gespleißte *period* m-RNA (Typ B') vor, als Ungespleißte (Typ A). Das Gen *Cap-binding protein 20* (*cbp20*) fungiert dabei als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle.

### 3.1.10 Transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen tragen zur Temperatursynchronisation bei

In dieser Arbeit wurden zwei Gruppen von *per-luc* Reporterkonstrukten verwendet (siehe Abb. 15): Eine besitzt nicht-translatierte Sequenzbereiche (*plo*, *NOG-luc*) und reflektiert daher die RNA-Regulation des *period* Gens. Die zweite Gruppe beinhaltet mindestens  $\frac{2}{3}$  des PER-Proteins (*BG-luc*, *XLG-luc* und *8.0-luc*) und verdeutlicht die Oszillation des jeweiligen PER-LUC-Fusionsproteins. Während in Licht-Dunkel-Zyklen alle Konstrukte rhythmische Biolumineszenz zeigen (Stanewsky et al., 2002b; Stanewsky et al., 1997b), können Temperaturzyklen nur in solchen *per-luc* Fliegen signifikante rhythmische Oszillationen induzieren, deren Reporterkonstrukte Teile des PER-Proteins beinhalten (Abb. 39; Tab. 13; Glaser and Stanewsky, 2005). Im Gegensatz zu den adulten *plo*- und *NOG-luc*-Fliegen lassen sich deren periphere Oszillatoren gut mittels Temperatur

synchronisieren (Abb. 40; Tab. 14). Dies zeigt, dass für die Aufnahme von Temperatur in den isolierten Geweben (periphere Oszillatoren) keine post-transkriptionellen Mechanismen benötigt werden, wohl aber zur Bildung des Summensignals adulter Fliegen.



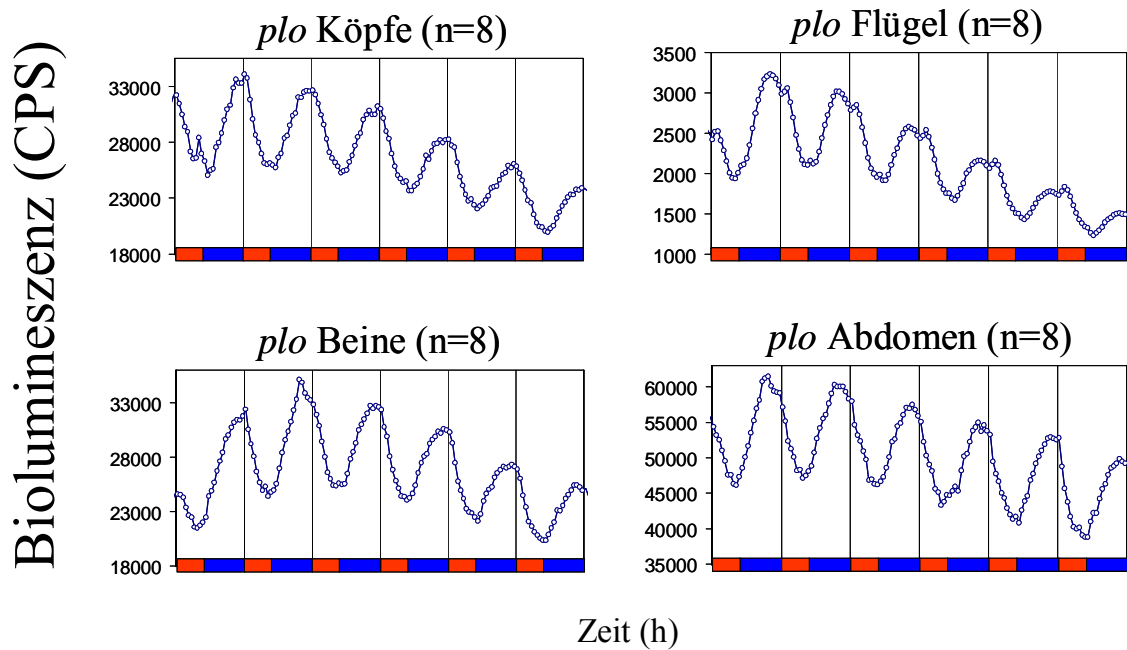
**Abb. 39. Temperaturinduzierte Biolumineszenz von XLG-luc und *plo* (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).** Im Gegensatz zu LD-Zyklen zeigen *per-luc* Konstrukte ohne kodierende *period*-Bereiche in Temperaturzyklen keine Oszillationen.

Genotyp	n	rhy. (%)	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>LD</b>					
BG-luc60	60	96.7	24.3 ± 0.1	0.24 ± 0.01	20.0 ± 0.2
<sup>1</sup> <i>plo</i>	269	91.1	24.3 ± 0.1	0.32 ± 0.04	17.9 ± 0.4
<sup>1</sup> NOG-luc	169	79.3	24.3 ± 0.1	0.31 ± 0.03	19.9 ± 0.5
XLG-luc:1-3	42	97.6	24.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02	19.8 ± 0.2
<i>tim</i> <sup>01</sup> ;XLG-luc:1-3	8	0	-	-	-
<b>LL und Temperatur (10:14 h 25°C:17°C)</b>					
<i>plo</i>	116	23.3	24.0 ± 0.1	0.53 ± 0.02	20.2 ± 0.9
NOG-luc	72	29.2	24.1 ± 0.1	0.52 ± 0.02	21.0 ± 0.5
BG-luc60	223	87.9	24.1 ± 0.1	0.39 ± 0.01	21.6 ± 0.2
XLG-luc:1-3	145	89.7	24.2 ± 0.1	0.35 ± 0.01	18.1 ± 0.2
<i>tim</i> <sup>01</sup> ;XLG-luc:1-3	68	26.5	24.1 ± 0.1	0.53 ± 0.03	6.2 ± 0.6

**Tab. 13. FFT-Analyse der Biolumineszenz verschiedener *per-luc* Reporterkonstrukte.**

Während in LD-Zyklen alle Reporterkonstrukte robuste Rhythmen hervorbringen, bewegt sich in Temperaturzyklen die Anzahl der rhythmischen Tiere von *plo*- (23.3%) und NOG-luc-Fliegen (29.2%) im Bereich von *tim*<sup>01</sup>;XLG-luc (26.5%). Die relativen Werte der Amplitudenfehler (rel.-Amp-F.) von ca. 0.5 zeigen zudem, dass diese Rhythmen nur sehr schwach sind.

<sup>1</sup>Daten aus (Stanewsky et al., 2002b)



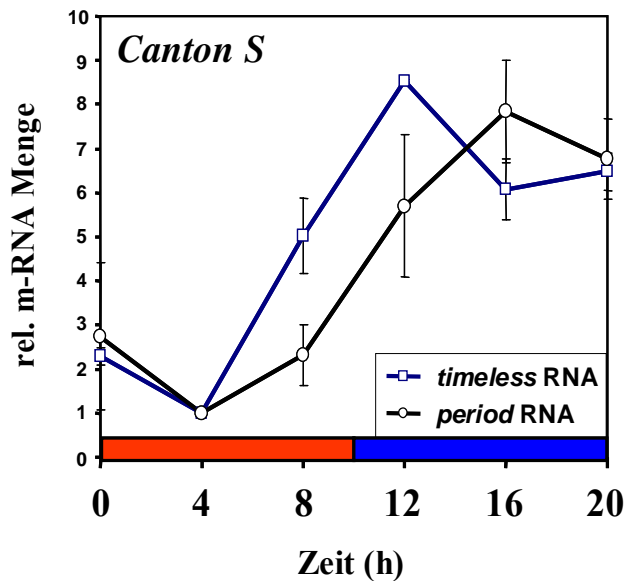
**Abb. 40. Biolumineszenzrhythmen von *plo*-Gewebekulturen in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Entgegen den adulten *plo*-Fliegen lassen sich in separierten Geweben robuste Rhythmen mittels Temperaturschwankungen induzieren.

LL und 10:14 h 25°:17°C	n	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<i>plo</i>				
Köpfe	33	24.3 ± 0.1	0.23 ± 0.02	21.6 ± 0.4
Beine	23	24.2 ± 0.1	0.17 ± 0.01	20.1 ± 0.3
Flügel	26	25.0 ± 0.1	0.21 ± 0.01	18.2 ± 0.2
Abdomen	27	24.3 ± 0.1	0.22 ± 0.01	18.9 ± 0.7
Hirne	14	23.9 ± 0.2	0.39 ± 0.03	23.6 ± 2.1
<i>NOG-luc</i>				
Köpfe	15	23.4 ± 0.1	0.35 ± 0.03	0.0 ± 0.6
Beine	18	23.7 ± 0.1	0.24 ± 0.01	23.1 ± 0.5
Flügel	17	24.3 ± 0.1	0.23 ± 0.02	20.8 ± 0.3
Abdomen	15	24.3 ± 0.2	0.28 ± 0.02	20.8 ± 0.9

**Tab. 14. FFT-Analyse der Biolumineszenzrhythmen separierter Körperteile von *plo*- und *NOG-luc* Fliegen in Temperaturzyklen.** Alle getesteten separierten Körperteile weisen robuste rhythmische Biolumineszenzsignale auf (rel.Amp.F.<0.4).

Zur Verifizierung der Biolumineszenz-Resultate wurden in Temperaturzyklen die m-RNA-Mengen in den Fliegenköpfen bestimmt. Konform mit den auf Transkription basierenden, temperaturinduzierten Biolumineszenzrhythmen isolierter Gewebe lassen sich in den Köpfen von *CantonS*-Fliegen Oszillationen der *period* und *timeless* m-RNA nachweisen. Dies bestätigt, dass die Regulation der Rhythmen nicht nur auf Proteinebene abläuft (Abb.

41). Die Induktion der Transkriptionsrhythmen durch Temperaturwechsel konnte ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Yoshii et al., 2006).

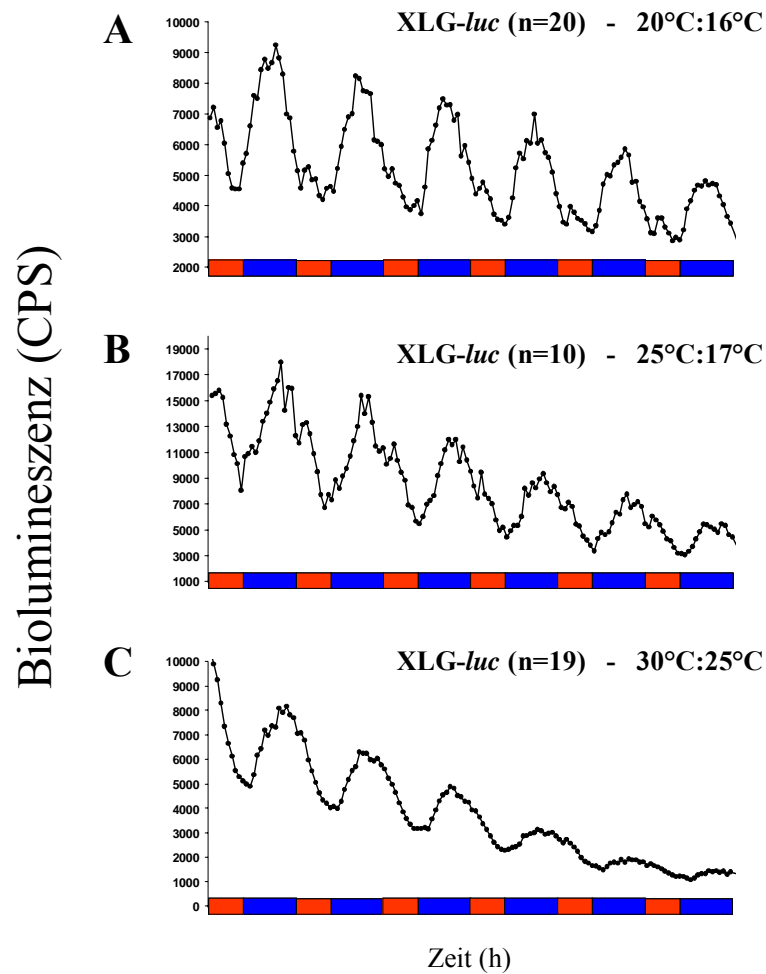


**Abb. 41. Temperaturinduzierte RNA-Oszillationen in den Köpfen von Wildtyp-Fliegen.** Die Analyse der m-RNA in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C=rot:blau, LL) mittels quantitativer RT-PCR bestätigt, dass Temperaturzyklen eine Oszillation der *period* und *timeless* Transkripte induzieren. Dabei scheint *timeless* der *period* RNA leicht voranzuschreiten. Dargestellt ist jeweils der Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.11 Die Temperaturspanne der Synchronisation

*Drosophila melanogaster* bevorzugt einen Temperaturbereich von ca. 24°C (Sayeed and Benzer, 1996; Zars, 2001; Hong et al., 2006), das rhythmische Lokomotorverhalten kann jedoch über einen Temperaturbereich von 16°C bis 30°C synchronisiert werden (Wheeler et al., 1993; Tomioka et al., 1998; Yoshii et al., 2002; Yoshii et al., 2005). Da die rhythmische Laufaktivität von den lateralen Uhrneuronen im Fliegenhirn gesteuert wird, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Ergebnisse auf die peripheren Oszillatoren der Fliege übertragbar sind.

Analog zur Lokomotorrhythmik induzieren verschiedene Temperaturbereiche (20°C:16°C, 25°C:17°C, 30°C:25°C) rhythmische *per-luc* Oszillationen (Abb. 42). Dies zeigt, dass eine Synchronisation der inneren Uhr über den gesamten physiologischen Temperaturbereich der Fliege möglich ist, und zudem graduierte Abstufungen der Temperaturhöhe wahrgenommen werden können. Klassische Thermorezeptoren, wie z.B. die TRP-Ionenkanäle werden durch das Überschreiten einer bestimmten Temperaturschwelle aktiviert (Viswanath et al., 2003; Tominanga and Caterina, 2004), was darauf hindeutet, dass bei der circadianen Thermorezeption mehrere verschiedene Rezeptoren zusammenwirken. Auffallend ist aber, dass die Oszillationen bei höheren Temperaturen (30°C:25°C) in der Phase verschoben sind und zudem eine niedrigere Amplitude besitzen (Abb. 42; Tab. 15). Als mögliche Auslöser hierfür können zum einen der schnellere Zerfall des instabilen Luziferins, oder zum anderen ein Austrocknen des luziferinhaltigen Futters angeführt werden.



**Abb. 42. Biolumineszenzrhythmen von XLG-*luc* Fliegen in LL und verschiedenen Temperaturintervallen: A) 20°C:16°C B) 25°C:17°C C) 30°C:25°C.**

Rhythmische Biolumineszenzsignale lassen sich über den gesamten physiologischen Temperaturbereich hinweg induzieren. Bei hohen Temperaturen (30°C:25°C) weisen die Rhythmen allerdings eine niedrigere Amplitude auf. (rot=Thermophase; blau=Cryophase)

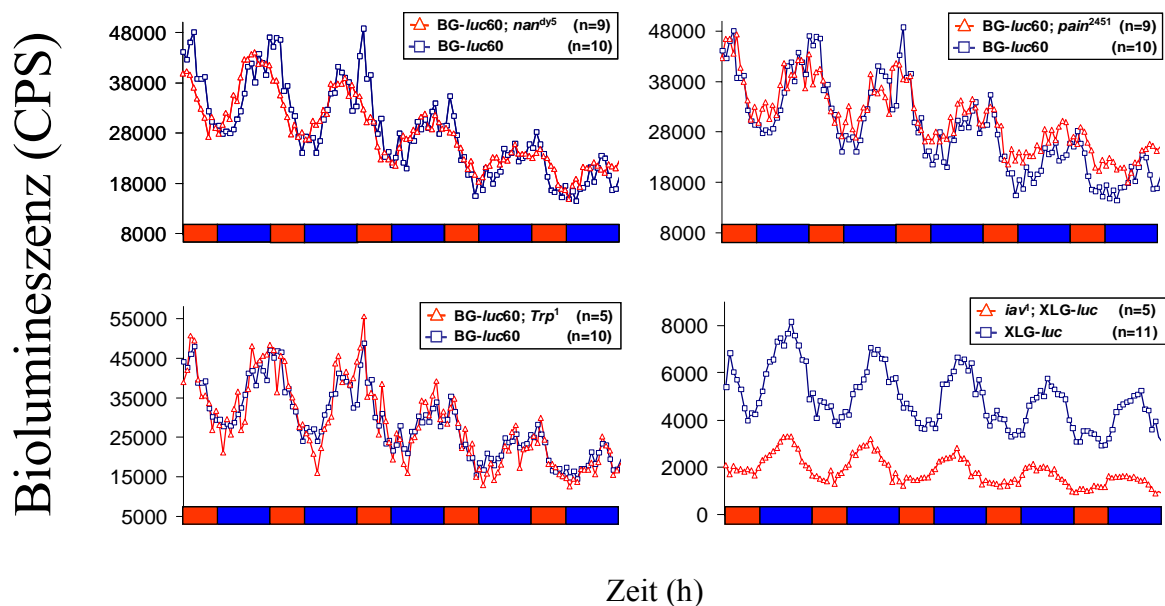
XLG- <i>luc</i>	n	rhy. (%)	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>LL und Temperatur</b>					
20°C:16°C	23	91.3	23.9 ± 0.1	0.29 ± 0.02	18.5 ± 0.2
25°C:17°C	145	89.7	24.2 ± 0.1	0.35 ± 0.01	18.1 ± 0.2
30°C:25°C	27	92.6	24.0 ± 0.1	0.37 ± 0.02	22.0 ± 0.2

**Tab. 15. FFT-Analyse der Biolumineszenzrhythmen in verschiedenen Temperaturbereichen.** In allen Temperaturbereichen konnten robuste Biolumineszenzrhythmen induziert werden. In den hohen Temperaturen (30°C:25°C) verschiebt sich jedoch die Phase um 4 h nach hinten.

### 3.1.12 Ionenkanäle als mögliche circadiane Thermorezeptoren

#### Trp-Kanäle

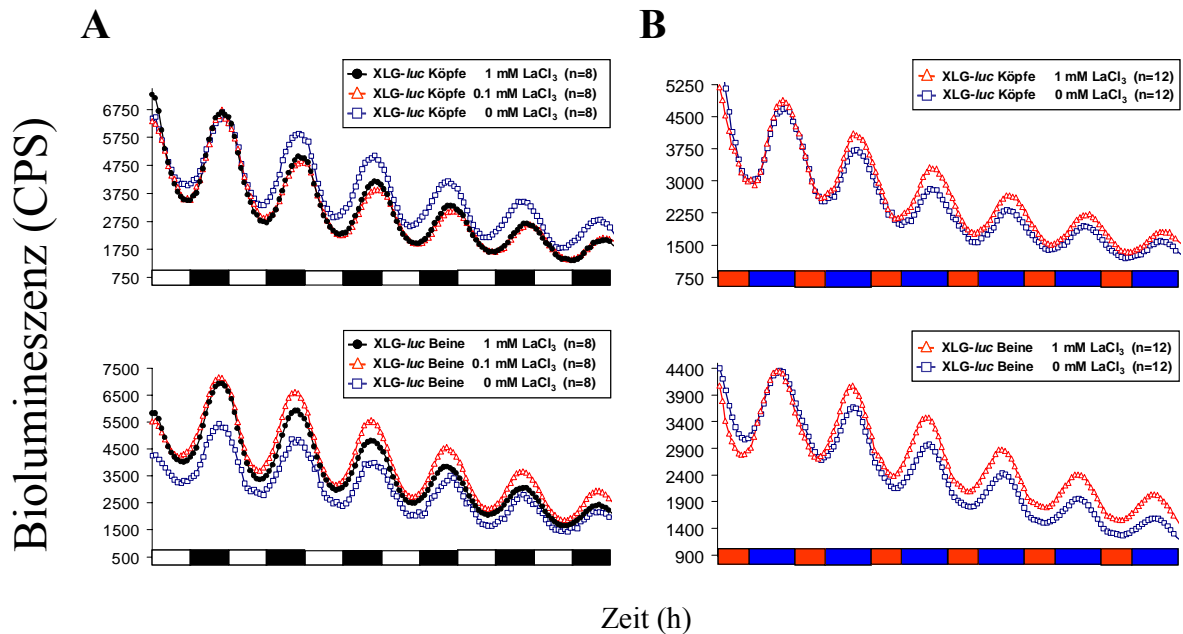
Viele Temperatursensoren der Säuger stammen aus der Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential, siehe 1.13). In *Drosophila* konnten mittlerweile 14 TRP-Kanäle identifiziert werden, aber nur von wenigen sind Mutanten erhältlich, die vital sind und homozygot getestet werden können. Die Beteiligung einiger TRP-Kanäle an der circadianen Thermorezeption wurde mit dem Biolumineszenz-Assay (Abb. 43) getestet.



**Abb. 43. Biolumineszenz verschiedener Trp-Kanal-Mutanten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).** Die getesteten Mutanten *Trp<sup>1</sup>*, *nanchung<sup>dy5</sup>*, *painless<sup>2451</sup>* sowie *inactive<sup>1</sup>* zeigen gut synchronisierte Rhythmen. Die *inactive*-Mutation verursacht eine Absenkung des *per-luc* Expressionslevels.

Alle analysierten Kanal-Mutanten bringen robuste Rhythmen in LL und Temperaturzyklen hervor. Bei den *inactive<sup>1</sup>*-Fliegen ist das Expressionslevel vermindert, was auf eine mögliche Beteiligung an der circadianen Thermorezeption hinweist. Jedoch wurde die *inactive*-Mutante nicht in LD-Zyklen getestet, wodurch ebenso ein genereller Effekt dieser Mutation auf die molekularen Rhythmen bzw. auf die circadiane Uhr vorliegen könnte.

Analog dazu wurde versucht, die Trp-Kanäle mit 1 mM Lanthanchlorid in Kulturen isolierter Köpfe und Beine zu inhibieren (Abb. 44). Die Blockierung der Trp-Kanäle in den Kulturen isolierter Gewebe wildtypischer *per-luc*-Fliegen zeigte keinen Effekt auf die Synchronisierung der Biolumineszenz, unabhängig von LD- oder Temperatur-Zyklen. Indessen fehlt allerdings eine Positivkontrolle, die aufzeigt, ob die Kanäle in den Versuchen wirklich blockiert waren. Deshalb können die Lanthan-Experimente nur als Hinweis, nicht aber als Beweis betrachtet werden.



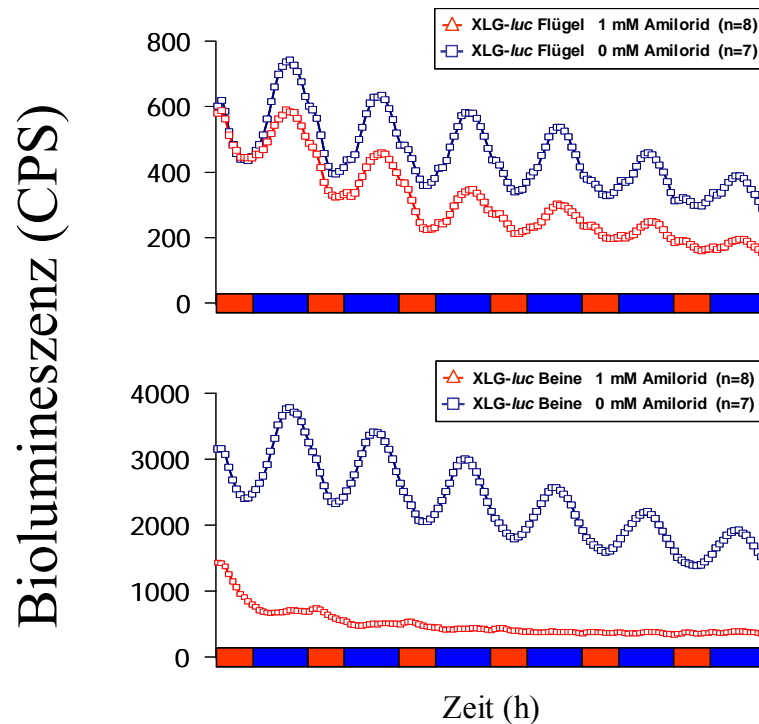
**Abb. 44. Inhibierung der TRP-Kanäle in isolierten Beinen und Köpfen in (A) 12:12 h LD-Zyklen (=weiß:schwarz), oder (B) Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Die Blockierung der TRP-Kanäle in isolierten Körperteilen von Wildtyp-Fliegen zeigt keinen signifikanten Defekt in der Synchronisation durch Temperatur- oder LD-Zyklen.

Somit schließen die Biolumineszenzdaten eine Beteiligung des *Trp*-, *nanchung*- und *painless*-Kanals an der Temperatursynchronisation der circadianen Uhr aus. Die Dämpfung des Expressionslevels im *inactive*<sup>1</sup>-Hintergrund kann auf eine mögliche Involvierung dieses Kanals bei der circadianen Thermorezeption hindeuten (Abb. 43). Aufgrund der fehlenden Biolumineszenzdaten in LD-Zyklen ist jedoch ungewiss, ob nicht ein genereller Effekt dieser Mutation vorliegt.

### DEG/ENaC-Kanäle

Die epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle repräsentieren eine weitere Gruppe multisensorischer Ionenkanäle. Ein charakteristisches Merkmal dieser Rezeptor-Familie ist die Sensitivität gegenüber Amilorid (Jenkins and Tompkins, 1990). Aufgrund fehlender Mutanten wurde daher versucht, analog zu den Trp-Kanälen die DEG/EnaC-Kanäle in isolierten Gewebekulturen mit Amiloridchlorid zu inhibieren und deren Biolumineszenz in Temperaturzyklen zu messen (Abb. 45). Während in den Flügeln eine Dämpfung der molekularen Rhythmen in Verbindung mit einem leicht abgesenkten Expressionslevel zu beobachten ist, führt der Hemmstoff in den Beinen dazu, dass keine weiteren Oszillationen des Reportergens induziert werden können. Die Biolumineszenzsignale in den Beinen erinnern dabei stark an die Rhythmen adulter *Cik*<sup>Jrk</sup>-Fliegen (Abb. 27), wohingegen ein konstantes *per-luc* Level vorliegt.



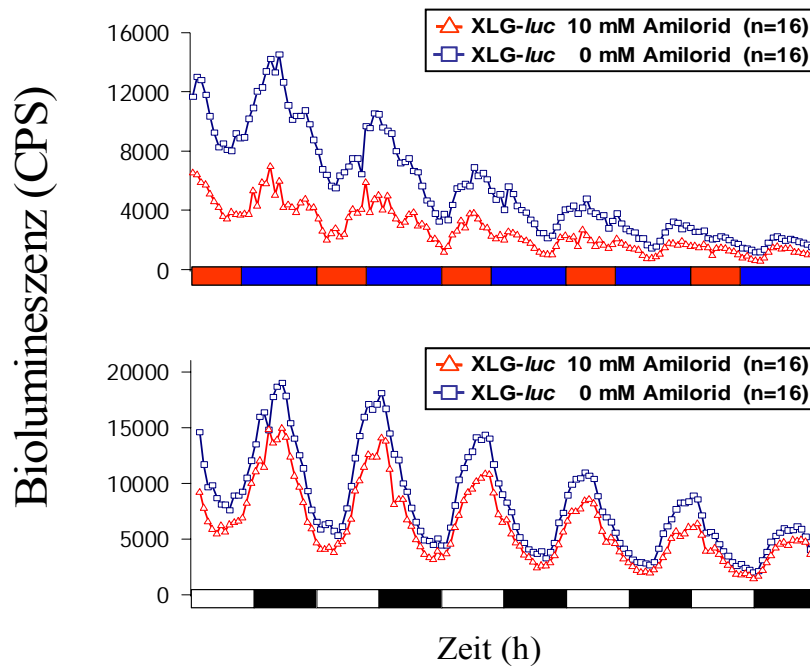


**Abb. 45. Inhibition von DEG/ENaC-Kanälen in Kulturen isolierter Flügel und Beine in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Während die Behandlung mit 1 mM Amilorid in den isolierten Flügeln eine Dämpfung der Rhythmen verursacht, führt dies in den Beinkulturen zum Zusammenbruch der molekularen Oszillationen. Es kann nur noch ein konstantes PER-LUC Level gemessen werden, das an das Signal adulter *Clk<sup>Jrk</sup>*-Fliegen erinnert (Abb. 27).

Darüber hinaus blockiert Amilorid zahlreiche Transportprozesse durch die Membran (Frings et al., 1992; Garty and Palmer, 1997; Luciani et al., 1992; Tang et al., 1988). Da membranabhängige Stoffwechselprozesse lebensnotwendig sind, können in den Gewebekulturen Sekundäreffekte auf die Vitalität nicht ausgeschlossen werden. Es ist aber bekannt, dass eine Konzentration von 10 mM Amilorid für adulte Tiere nicht toxisch ist und zuverlässig die Wahrnehmung von Salz und Bitterstoffen hemmt (Jenkins and Tompkins, 1990; Liu et al., 2003). Deshalb wurden die Biolumineszenzversuche an adulten Fliegen wiederholt, welchen eine Konzentration von 10 mM Amiloridchlorid verabreicht wurde (Abb. 46).

In Temperaturzyklen führt die Inhibierung der DEG/ENaC-Kanäle adulter Fliegen zu einer gedämpften *per-luc* Expression und weist somit eine Parallele zu der Inhibierung in den isolierten Flügeln auf (Abb. 46; Abb. 45). Interessanterweise kann eine solche Dämpfung in LD-Zyklen nicht beobachtet werden, was dafür spricht, dass einerseits die Hemmung der Kanäle funktioniert, und andererseits selektiv die Temperatureaufnahme betroffen ist (Abb. 46). Somit scheinen die DEG/ENaC-Kanäle daher an der Temperatureaufnahme der circadianen Uhr beteiligt zu sein.





**Abb. 46. Inhibition amiloridsensitiver Ionenkanäle in adulten XLG-*luc*-Fliegen in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL; oben) und 12:12 h LD-Zyklen (unten; weiß:schwarz).** Ähnlich den isolierten Flügeln bewirkt Amilorid (10 mM) in Temperaturzyklen bei den adulten Fliegen ein geringeres *per-luc* Expressionslevel (oben). In LD-Zyklen kann hingegen nur ein minimaler Effekt des Hemmstoffes beobachtet werden (unten).

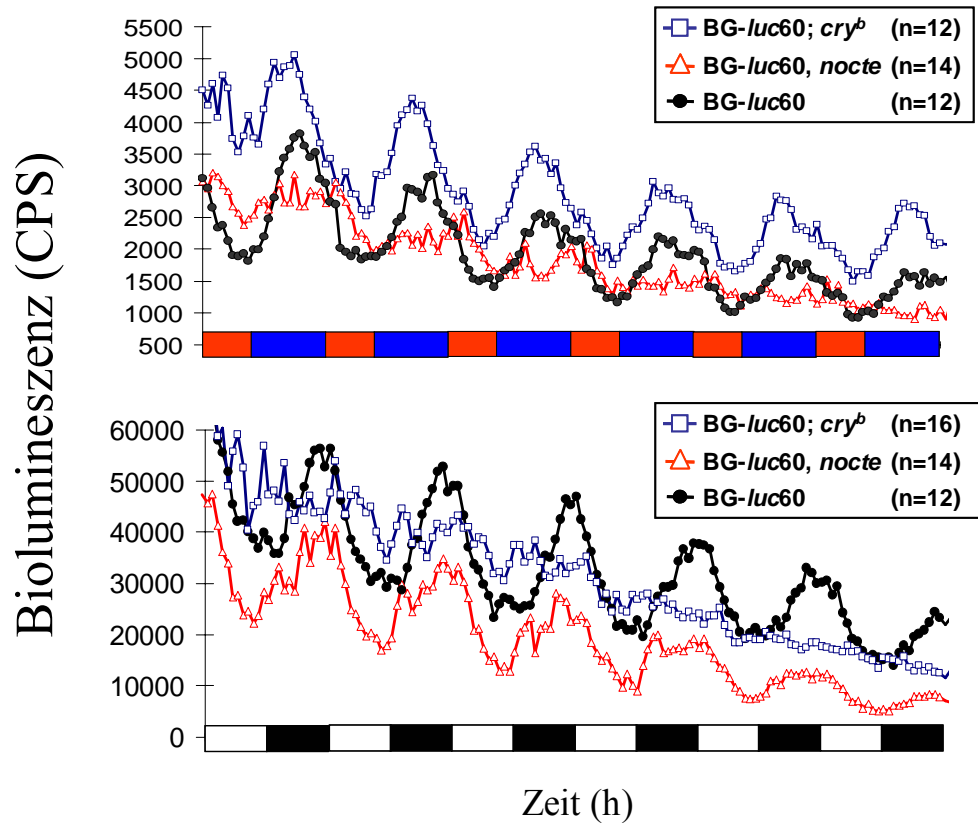
## 3.2 Charakterisierung der Temperatur-Entrainment-Mutanten *nocte* und *norpA*

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Screen durchgeführt, um neue Faktoren zu isolieren, die am Temperatur-Entrainment der circadianen Uhr mitwirken. Daraus resultierte die Mutante *nocte*, die zusammen mit einer *norpA*-Mutation im folgenden Abschnitt charakterisiert wird. Beide verursachen eine defekte Temperatursynchronisation.

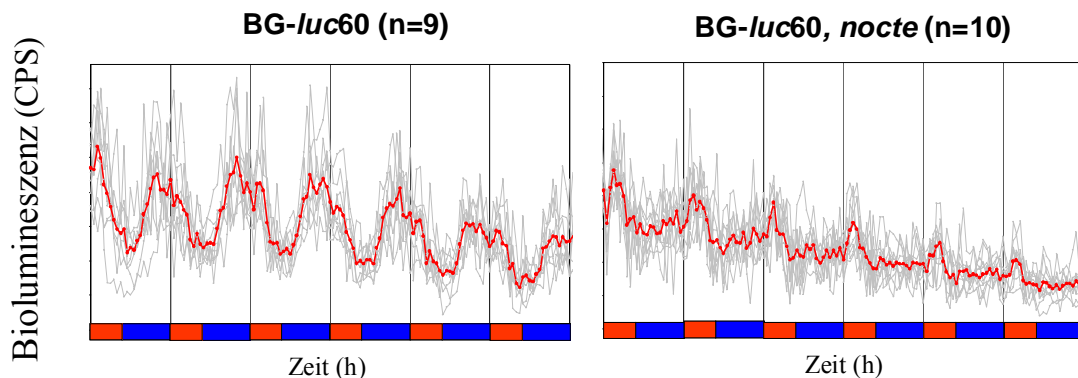
### 3.2.1 Synchronisationsdefekt der Biolumineszenzrhythmen in Temperaturzyklen

Mit Hilfe einer EMS-Mutagenese (*Ethyl-methan-sulfonat*, Durchführung siehe 2.2.1) gelang es, eine Mutante zu isolieren, die einen temperaturspezifischen Synchronisationsdefekt der molekularen circadianen Oszillationen aufweist. Die *per-luc* Rhythmen dieser Mutante lassen sich mittels LD-Zyklen synchronisieren, was auf eine funktionierende circadiane Uhr, sowie einen intakten Lichtinputweg hinweist (Abb. 47, unten). Darauf basierend, dass Temperaturwechsel keine molekularen Oszillationen mehr

induzieren können (Abb. 47, oben), prägte sich für diese Mutation der Begriff „*nocte*“ (= „*no circadian temperature entrainment*“).

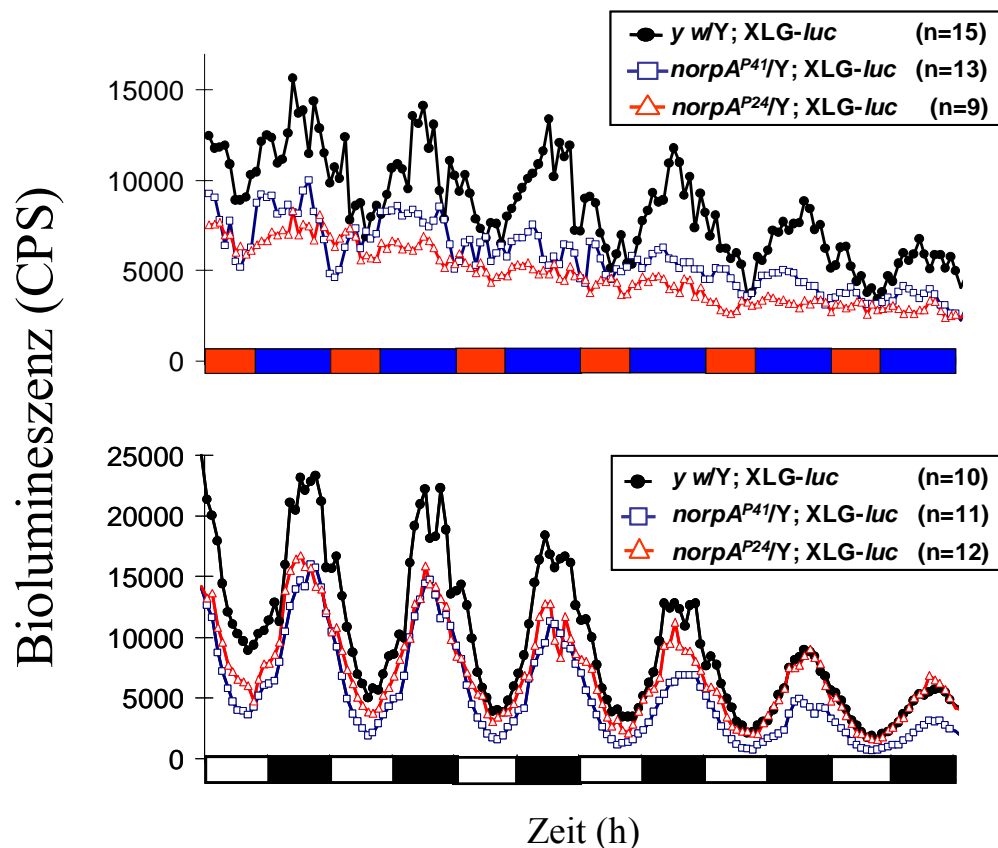


**Abb. 47. Biolumineszenzdaten von BG-*luc60*-Fliegen im *nocte*- und *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund.** In Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL) zeigen *nocte*-Fliegen einen Synchronisationsdefekt der Biolumineszenzrhythmen (oben), während die Synchronisation der molekularen Oszillationen in LD-Zyklen (weiß:schwarz) nicht betroffen ist (unten). Darin besteht eine gewisse Symmetrie zu der *cry<sup>b</sup>*-Mutante, welche spezifisch die Lichtsynchronisation verhindert, dagegen aber mit Temperaturzyklen synchronisiert werden kann (Stanewsky et al., 1998).

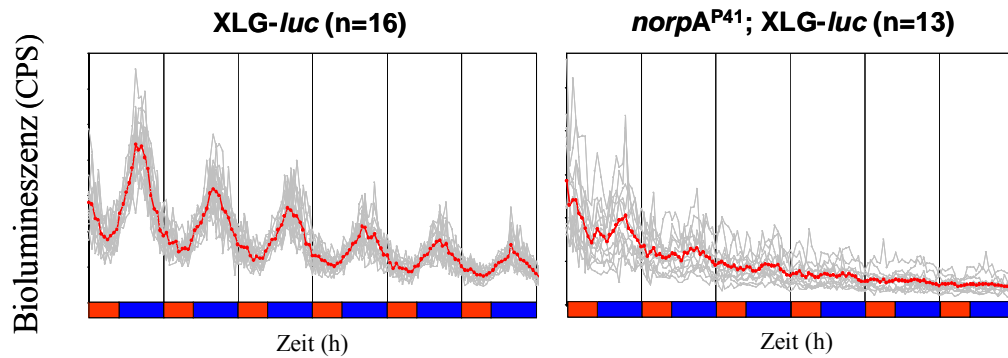


**Abb. 48. Temperaturinduzierte Summen- und Einzelgraphen von BG-*luc60*-Fliegen mit Wildtyp- oder *nocte*-Hintergrund.** Die Summengraphen (rot) beider Genotypen repräsentieren die eingerechneten Einzeldaten (grau). Auffällig ist die direkte Reaktion der Biolumineszenz auf die Temperatur-Step-Ups im *nocte* Hintergrund (rechts).

Neben der Rolle in der visuellen Photosignaltransduktionskaskade ist die PhospholipaseC (kodiert durch das *norpA*) auch an der Adaption der Uhr an saisonalen Schwankungen in Tageslänge und Temperatur involviert (Majercak et al., 2004; Collins et al., 2004). Aus diesem Grund wurde von zwei *loss-of-function* Mutanten im *norpA* Gen (*norpA*<sup>P41</sup> und *norpA*<sup>P24</sup>; Pearn et al., 1996) die Synchronisation der Biolumineszenzrhythmen untersucht. Ähnlich der *nocte*-Mutation lässt sich bei keinem der beiden *norpA*-Null-Allele eine rhythmische *per-luc* Expression mittels Temperatur induzieren. Die rhythmischen Oszillationen im Licht-Dunkel Regime sind jedoch nicht betroffen (Abb. 49). Somit stellen *nocte* und *norpA* ein Spiegelbild der *cryptochrom*-Mutante *cry<sup>b</sup>* dar, die spezifisch den Lichtsynchronisationsweg für die molekularen Rhythmen ablatiert, während keine Einwirkung auf das Temperatur-Entrainment erfolgt (Abb. 47; Stanewsky et al., 1998).



**Abb. 49. Biolumineszenzrhythmen der *norpA*-Mutante in Temperaturzyklen (10:14h 25°C:17°C=rot:blau, LL) und LD-Zyklen (weiß:schwarz). Ähnlich der *nocte*-Mutation verursachen die *norpA*-Mutanten einen temperaturspezifischen Synchronisationsdefekt der Biolumineszenzsignale (oben). Demgegenüber lassen sich in Licht-Dunkel-Zyklen robuste Rhythmen der PER-LUC Expression induzieren (unten).**



**Abb. 50. Temperaturinduzierte Summengraphen und Einzelgraphen von XLG-luc Fliegen im Wildtyp- und *norpA*<sup>P41</sup>-Hintergrund.** Beide Diagramme verdeutlichen, dass die Summengraphen (rot) jeweils die eingerechneten Einzeldaten (grau) wiedergeben. Im Gegensatz zu den *nocte*-Fliegen weist die Biolumineszenz der *norpA*-Mutante keine Reaktion auf den Temperaturanstieg auf.

Die FFT-Analyse der Biolumineszenzdaten von *nocte*- und *norpA*-Mutanten zeigt eine signifikante Verminderung der rhythmischen Tiere in Temperaturzyklen um ca. 45% gegenüber dem Wildtyp (Tab. 16). Zudem weisen die Rhythmen im *nocte* Hintergrund eine Phase von 0.9 auf. Dies kann als ein Indiz dafür angesehen werden, dass die detektierten Signale lediglich eine direkte Antwort auf die Temperaturerhöhung (Step-Ups) darstellen (Tab. 16; Abb. 48). Im *norpA*-Hintergrund scheint hingegen der Rhythmus stark gedämpft zu sein, da die Restmenge an rhythmischen Fliegen eine wildtypische Phase aufweist (Tab. 16). In LD-Zyklen liegt die Anzahl rhythmischer Tiere beider Mutanten im Bereich der jeweiligen wildtypischen Kontrolle.

Zusammengefasst lässt sich daher feststellen, dass sowohl die Mutation *nocte*, als auch die *norpA*-Mutanten einen Synchronisationsdefekt auslösen, der spezifisch den Zeitgeber Temperatur betrifft.

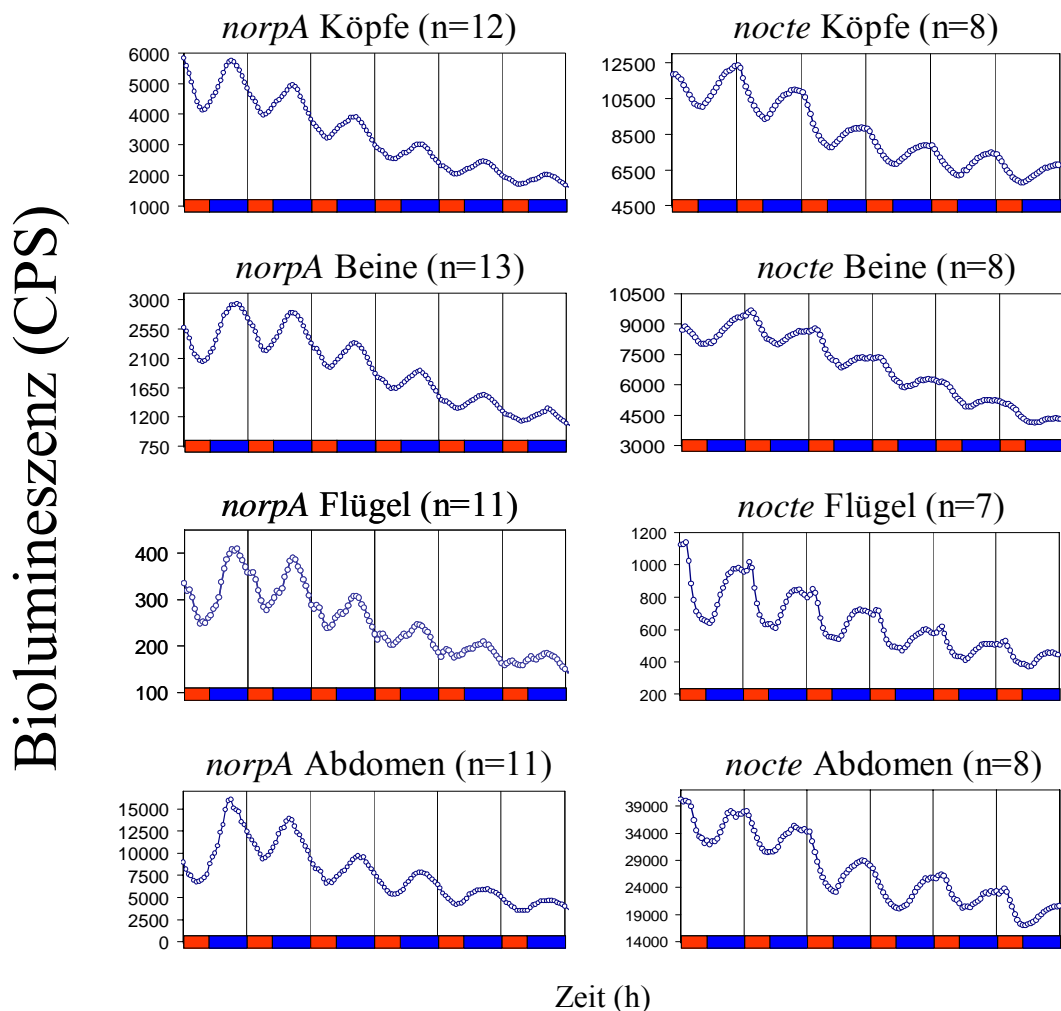
Genotyp	n	rhy. (%)	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>LD</b>					
<sup>1</sup> BG- <i>luc</i>	298	89.5	24.3 ± 0.1	0.24 ± 0.02	20.0 ± 0.3
BG- <i>luc</i> 60	60	96.7	24.3 ± 0.1	0.24 ± 0.01	20.0 ± 0.2
<sup>2</sup> BG- <i>luc</i> 60; <i>cry</i> <sup>b</sup>	16	12.5	24.4 ± 0.1	0.55 ± 0.03	2.5 ± 0.6
BG- <i>luc</i> 60, <i>nocte</i>	76	86.8	24.2 ± 0.1	0.32 ± 0.01	20.0 ± 0.2
XLG- <i>luc</i> :1-3	42	97.6	24.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02	19.8 ± 0.2
<i>norpA</i> <sup>P24</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	9	100.0	24.1 ± 0.1	0.24 ± 0.04	19.9 ± 0.5
<i>norpA</i> <sup>P41</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	16	100.0	24.3 ± 0.1	0.21 ± 0.04	19.4 ± 0.4
<i>norpA</i> <sup>P24</sup> ;BG- <i>luc</i>	9	100.0	24.1 ± 0.1	0.24 ± 0.04	19.9 ± 0.5
<i>norpA</i> <sup>P41</sup> ;BG- <i>luc</i>	16	100.0	24.3 ± 0.1	0.21 ± 0.04	19.4 ± 0.4
<i>tim</i> <sup>01</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	8	0	-	-	-
<b>LL und Temperatur (10:14 h 25°C:17°C)</b>					
BG- <i>luc</i> 60	223	87.9	24.1 ± 0.1	0.39 ± 0.01	21.6 ± 0.2
BG- <i>luc</i> 60; <i>cry</i> <sup>b</sup>	65	76.9	24.2 ± 0.1	0.46 ± 0.02	18.7 ± 0.3
BG- <i>luc</i> 60, <i>nocte</i>	207	46.9	24.1 ± 0.1	0.54 ± 0.01	0.9 ± 0.3
BG- <i>luc</i> 60, <i>ss</i> <sup>a</sup>	54	79.6	24.4 ± 0.1	0.38 ± 0.01	21.8 ± 0.4
BG- <i>luc</i> 60, <i>ablated</i>	35	77.2	24.3 ± 0.1	0.51 ± 0.01	23.4 ± 0.4
BG- <i>luc</i> 60, <i>tvm</i> 53	33	75.8	24.2 ± 0.1	0.46 ± 0.02	3.6 ± 0.3
BG- <i>luc</i> 60; <i>Clk</i> <sup>Jrk</sup>	27	25.9	24.3 ± 0.1	0.59 ± 0.03	6.7 ± 0.3
XLG- <i>luc</i> :1-3	145	89.7	24.2 ± 0.1	0.35 ± 0.01	18.2 ± 0.2
<i>norpA</i> <sup>P24</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	35	40.0	23.9 ± 0.1	0.47 ± 0.03	17.8 ± 0.5
<i>norpA</i> <sup>P41</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	61	54.1	24.0 ± 0.1	0.48 ± 0.02	18.2 ± 0.6
<i>tim</i> <sup>01</sup> ;XLG- <i>luc</i> :1-3	68	26.5	24.1 ± 0.1	0.53 ± 0.03	6.2 ± 0.6
BG- <i>luc</i>	146	84.9	24.1 ± 0.1	0.37 ± 0.01	20.3 ± 0.2
<i>norpA</i> <sup>P24</sup> ;BG- <i>luc</i>	36	25.0	24.5 ± 0.2	0.59 ± 0.02	0.6 ± 0.5
<i>norpA</i> <sup>P41</sup> ;BG- <i>luc</i>	31	19.4	24.3 ± 0.3	0.57 ± 0.04	0.1 ± 1.6
<b>DD und Temperatur (10:14 h 25°C:17°C)</b>					
BG- <i>luc</i> 60	135	80.7	24.1 ± 0.1	0.40 ± 0.01	21.0 ± 0.3
BG- <i>luc</i> 60, <i>nocte</i>	112	21.4	24.0 ± 0.2	0.56 ± 0.01	23.6 ± 0.4

**Tab. 16. FFT-Analyse der Biolumineszenzdaten transgener *per-luc* Fliegen verschiedener genetischer Hintergründe in LD und 25°C, oder 10:14 h 25°C:17°C und Dauerlicht (LL) oder Dauerdunkel (DD).** In Temperaturzyklen ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollstämmen die Anzahl der rhythmischen Tiere im mutanten *norpA*- und *nocte*-Hintergrund signifikant vermindert. Die Biolumineszenz der rhythmischen *nocte*-Tiere weist zudem eine Phase am Anfang der Thermophase auf, welche die direkte Reaktion auf den Temperaturanstieg wiedergibt. In LD-Zyklen liegen bei *norpA* und *nocte* sowohl die Menge der rhythmischen Tiere, als auch deren Phasen im gleichen Bereich wie die Kontrollstämme.

<sup>1,2</sup>Daten aus <sup>1</sup>(Stanewsky et al., 2002b) und <sup>2</sup>(Stanewsky et al., 1998).

### 3.2.2 Biolumineszenzrhythmen von *nocte*- und *norpA*-Kulturen

Nahezu jedes Gewebe einer Fliege besitzt periphere circadiane Oszillatoren, die durch Licht- und Temperaturzyklen synchronisiert werden können (Abb. 24; Plautz et al., 1997b). Da sowohl *nocte*, als auch *norpA* die Temperatursynchronisation adulter Fliegen betrifft, wurde untersucht, welche Auswirkungen diese Mutationen auf die peripheren Oszillatoren haben. Im Gegensatz zu den adulten Tieren (Abb. 47; Abb. 49) konnten in allen Gewebekulturen beider Mutanten robuste und synchronisierte Rhythmen mittels Temperaturzyklen induziert werden (Abb. 51). Einige Gewebe weisen aber geringe Phasenunterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf (Tab. 17). Vergleichbar mit dem *Clk<sup>Jrk</sup>*- und *tim<sup>01</sup>*-Hintergrund lässt sich in den Gehirnen beider Mutanten nur eine direkte Reaktion auf die Temperaturzyklen beobachten (Abb. 53).

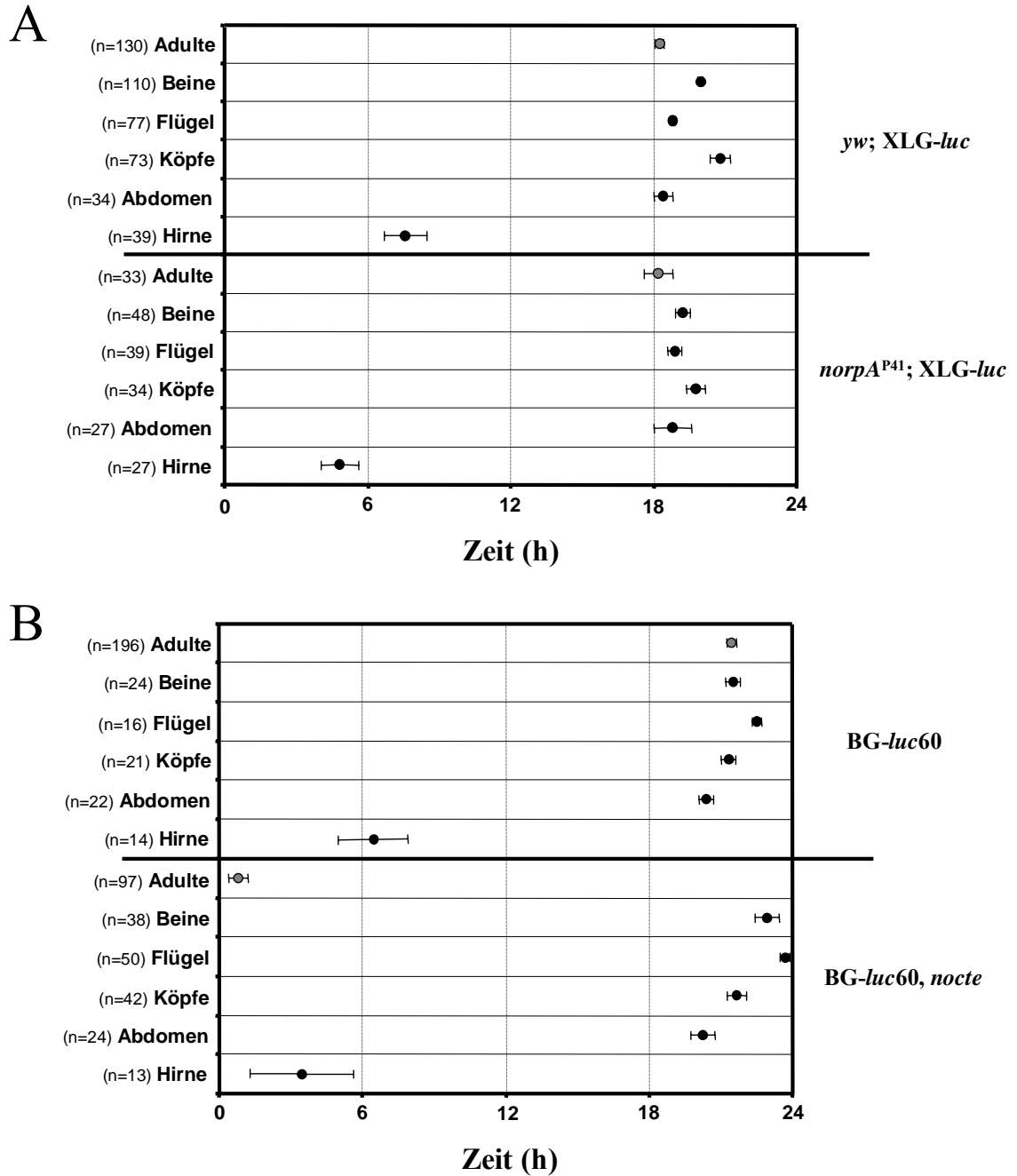


**Abb. 51. Temperaturinduzierte Biolumineszenzrhythmen in Gewebekulturen von *norpA<sup>P41</sup>*; XLG-*luc* und BG-*luc60*, *nocte*-Fliegen.** Entgegen den adulten *norpA*- und *nocte*-Tieren können die separierten Fliegengewebe in beiden genetischen Hintergründen mittels Temperatur (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL) synchronisiert werden.

LL und 10:14 h 25°:17°C	n	Periode (h)	rel.-Amp.F.	Phase (h)
<b>BG-luc60</b>				
Adulte (87.9 % rhy.)	223	24.1 ± 0.1	0.39 ± 0.01	21.6 ± 0.2
Köpfe	56	24.2 ± 0.1	0.34 ± 0.02	21.0 ± 0.3
Beine	84	24.0 ± 0.1	0.24 ± 0.01	21.8 ± 0.2
Flügel	74	24.3 ± 0.1	0.22 ± 0.01	22.2 ± 0.2
Abdomen	35	24.1 ± 0.1	0.33 ± 0.02	20.9 ± 0.3
Gehirne	20	24.2 ± 0.2	0.40 ± 0.03	5.2 ± 1.9
<b>BG-luc60, nocte</b>				
Adulte (46.9 % rhy.)	207	24.1 ± 0.1	0.54 ± 0.01	0.9 ± 0.3
Köpfe	42	24.1 ± 0.1	0.30 ± 0.03	22.0 ± 0.4
Beine	38	24.0 ± 0.1	0.27 ± 0.02	23.0 ± 0.5
Flügel	50	24.3 ± 0.1	0.27 ± 0.01	23.8 ± 0.2
Abdomen	24	24.3 ± 0.1	0.32 ± 0.03	20.2 ± 0.5
Gehirne	13	24.0 ± 0.2	0.35 ± 0.04	3.5 ± 2.5
<b>XLG-luc</b>				
Adulte (89.7 % rhy.)	145	24.2 ± 0.1	0.35 ± 0.01	18.2 ± 0.2
Köpfe	73	23.8 ± 0.1	0.23 ± 0.01	21.4 ± 0.3
Beine	110	23.6 ± 0.1	0.15 ± 0.01	20.6 ± 0.1
Flügel	77	23.7 ± 0.1	0.17 ± 0.01	19.3 ± 0.2
Abdomen	34	24.1 ± 0.1	0.22 ± 0.01	18.4 ± 0.4
Gehirne	39	24.4 ± 0.1	0.24 ± 0.01	7.6 ± 0.9
<b><i>norpA</i><sup>P41</sup>; XLG-luc</b>				
Adulte (54.1 % rhy.)	61	24.0 ± 0.1	0.48 ± 0.02	18.2 ± 0.6
Köpfe	34	24.0 ± 0.1	0.26 ± 0.02	19.8 ± 0.4
Beine	48	23.8 ± 0.1	0.22 ± 0.02	19.4 ± 0.3
Flügel	39	23.7 ± 0.1	0.33 ± 0.02	18.9 ± 0.3
Abdomen	27	24.1 ± 0.1	0.29 ± 0.02	18.8 ± 0.8
Gehirne	27	24.1 ± 0.1	0.29 ± 0.02	5.2 ± 0.8

**Tab. 17. Biolumineszenz-FFT-Analyse der *norpA* und *nocte* Gewebekulturen.**

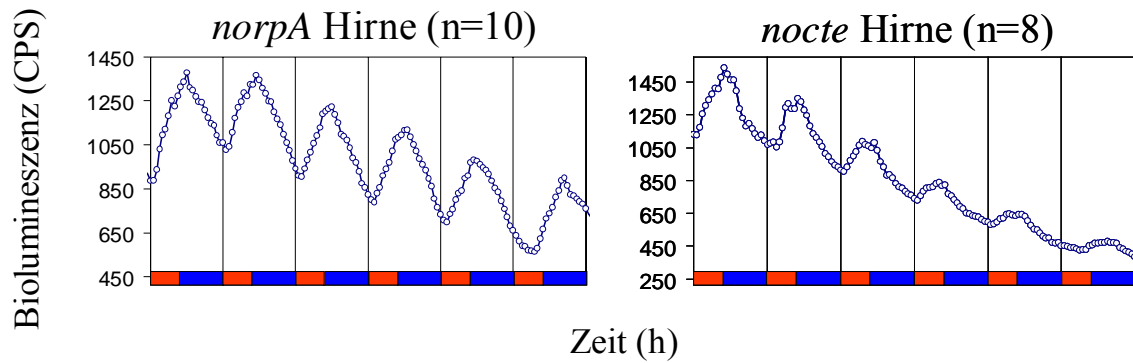
Die Biolumineszenzdaten, gemessen an 6 Tagen in Temperaturzyklen, wurden mit einer FFT-NLLS-Analyse auf Periode, Phasenlage und Signifikanz der Rhythmen hin untersucht. Im Kontrast zu den adulten *norpA*<sup>P41</sup>- und *nocte*-Tieren können in den separierten Körperteilen mittels Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C, LL) rhythmische Oszillationen der PER-LUC Expression erzeugt werden. Jedoch lassen sich im Vergleich zu den Kontrollen lediglich geringe Unterschiede in der Phase beobachten. Im *nocte*-Hintergrund sind die Rhythmen von Köpfen, Beinen und Flügeln um eine Stunde nach hinten verschoben. Die *norpA*-Mutation verursacht hingegen in den Köpfen und Beinen eine nach vorne versetzte Periodenlage der Oszillationen (Abb. 52).



**Abb. 52. Phasenplot der Biolumineszenzdaten isolierter Gewebe von (A) *norpA<sup>P41</sup>* und (B) *nocte* in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C, LL).**

Die Phasenlagen der temperaturinduzierten *per-luc*-Expression in den isolierten Geweben ist im mutanten und wildtypischen Hintergrund nahezu identisch, dennoch können kleine Unterschiede beobachtet werden. Im Gegensatz zum Wildtyp wird durch die *nocte* Mutation die Phasenlage der rhythmischen Biolumineszenz in den Köpfen, Beinen und Flügeln um eine Stunde nach hinten versetzt. Dagegen weist die *norpA*-Mutante in den Köpfen und Beinen eine nach vorne verschobene Phase auf.





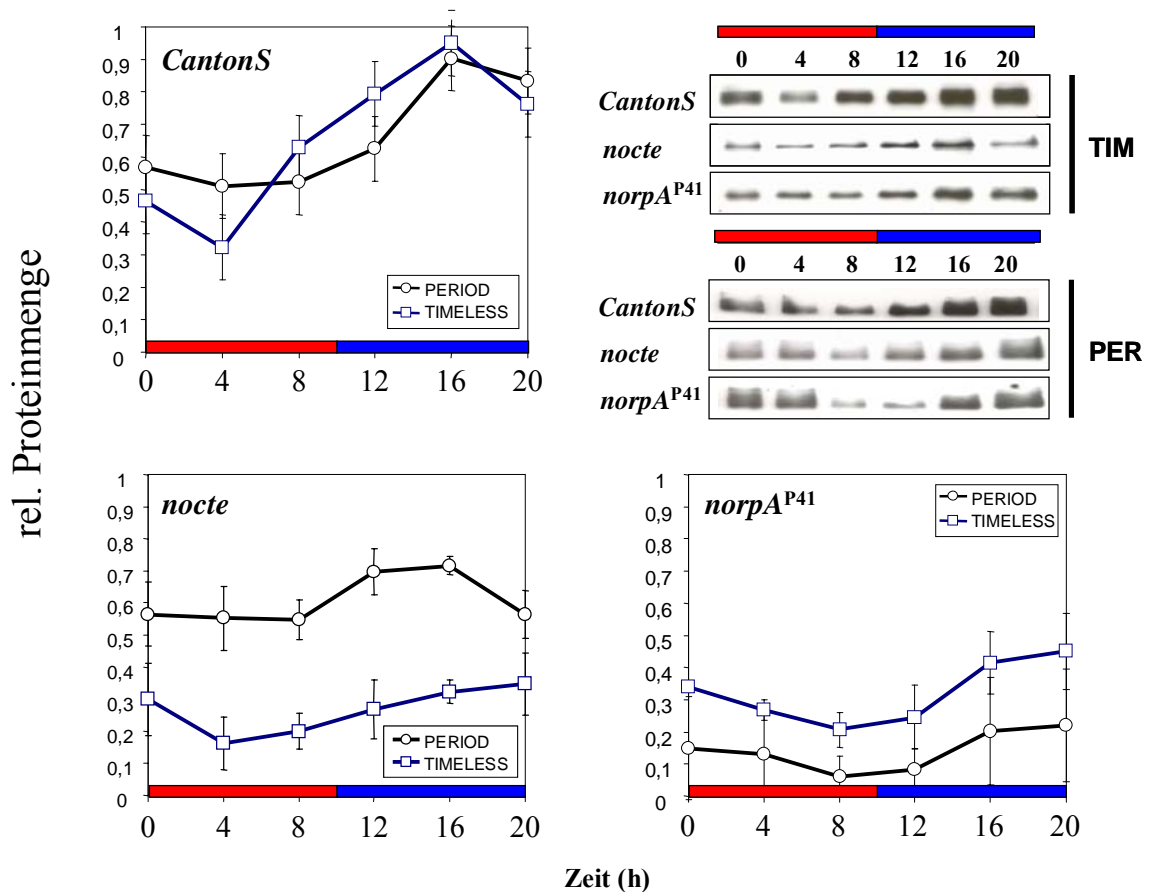
**Abb. 53. Temperaturinduzierte Biolumineszenzsignale isolierter Hirne von *norpA*<sup>P41</sup>; *XLG-luc* und *BG-luc60*, *nocte*-Fliegen.** In den separierten Fliegenhirnen beider Mutanten erzeugen Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL) direkte Effekte auf die Temperatur, ähnlich dem *Clk*<sup>Jrk</sup>- und *tim*<sup>01</sup>-Hintergrund (s. 3.1.4).

Erstaunlicherweise scheint daher weder *norpA* noch *nocte* die Temperraturaufnahme, sowie die Synchronisation der peripheren Oszillatoren zu beeinflussen. Dies bedeutet, dass in beiden Mutanten die Temperraturaufnahme durch die circadiane Uhr nicht oder nur teilweise blockiert ist.

Die Diskrepanz zwischen den Adulten und den Geweben ist vergleichbar mit den Tieren, deren Reporterkonstrukte nur nicht-translatierte Bereiche der *period* gDNA enthalten (Abb. 39; Abb. 40). Es wäre daher denkbar, dass sowohl im *nocte*, als auch im *norpA* Hintergrund das arhythmische Signal der Adulten durch eine defekte interzelluläre Synchronisation der einzelnen Oszillationen verursacht wird, die auf post-transkriptionaler Ebene abläuft.

### 3.2.3 PER-/TIM-Oszillationen in den Köpfen von *norpA*- und *nocte*-Fliegen

Die Biolumineszenzsignale reflektieren nur die Rhythmen der *per-luc* Reporterkonstrukte. Aus diesem Gesichtspunkt heraus, war eine Untersuchung der Oszillationen nativer PER- und TIM-Proteine in den Fliegenköpfen mittels Westernblots an synchronisierten Fliegen notwendig (4 Tage in LL und 12:12 h 25°C:18°C bzw. 3 Tage LD und konst. 25°C). Parallel zu früheren Ergebnissen im Dauerdunkel (Stanewsky et al., 1998) treten bei Temperaturzyklen in LL auch noch nach 4 Tagen starke rhythmische Oszillationen der zentralen Uhrproteine PERIOD und TIMELESS in den Fliegenköpfen auf (Abb. 54; Glaser and Stanewsky, 2005). Beide Proteine prägen auch die charakteristischen Mobilitätsunterschiede der unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien aus (Stanewsky et al., 1998; Edery et al. 1994b).

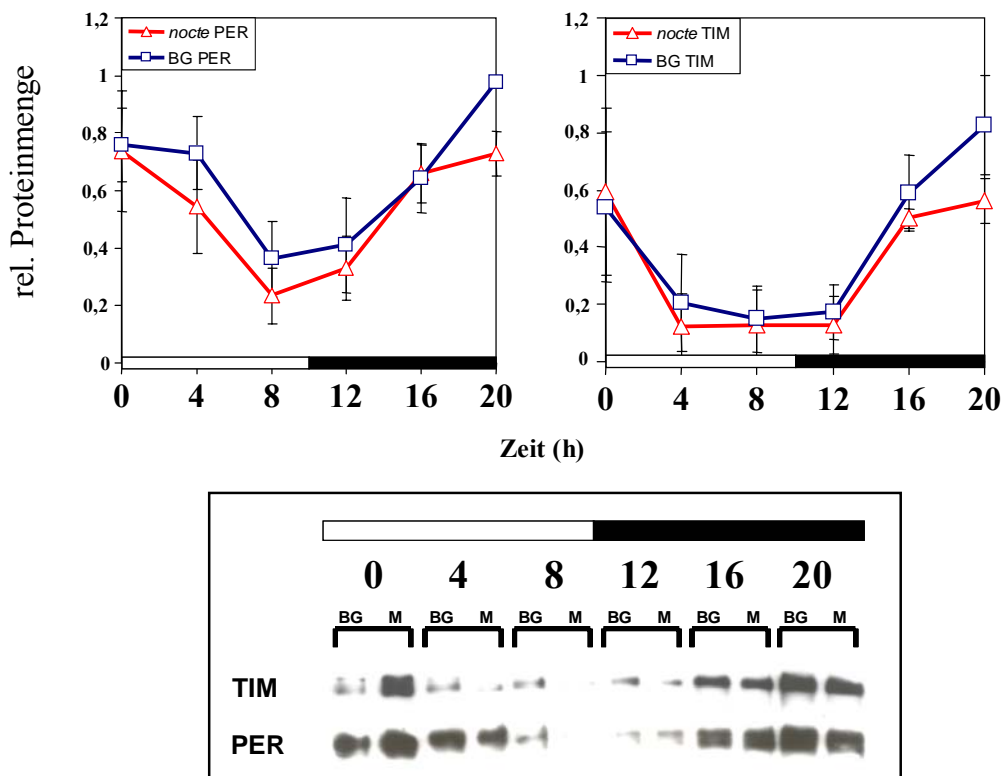


**Abb. 54. Oszillationen der Proteine PER und TIM in den Köpfen wildtypischer und mutanter Fliegen während Temperaturzyklen (12:12 h 25°:18°C, LL).** Temperaturzyklen induzieren Oszillationen von PER und TIM in den Köpfen von *CantonS* Fliegen in Dauerlicht (oben), was normalerweise zum CRY-vermittelten Abbau des TIM-Proteins, und somit zum Stillstand der molekularen Oszillationen führt. Wie ein Vergleich mit dem Wildtyp zeigt, bewirkt *nocte* sowohl eine gedämpfte PER-Oszillation, als auch eine geringe TIM-Menge (unten links), während bei *norpA* die Oszillationen beider Proteine abgeschwächt vorliegen (unten rechts). Alle Daten repräsentieren mindestens 3 unabhängige Experimente. Die Werte beider Mutanten wurden mit denen des Wildtyps (*CantonS*) in Bezug gesetzt.

Besonders beachtlich erscheint dies, da die *CantonS*-Fliegen eine funktionierende Kopie des circadianen Photorezeptors CRY in sich tragen. Im Dauerlicht und bei konstanten Temperaturen wird das TIM-Protein CRY-vermittelt abgebaut, wodurch die molekularen Oszillationen unterbrochen werden und die Menge an TIM-Protein bereits nach 2 Tagen stark reduziert ist (Emery et al., 2000b; Price et al., 1995; Marrus et al., 1996). Im Vergleich zu den PER-/TIM-Oszillationen in LD-Zyklen rückt die Phase der temperaturinduzierten Oszillationen um ca. 4 Stunden nach vorne (Abb. 54; Stanewsky et al., 1998). Dies geschieht analog zur temperatursynchronisierten Lokomotorrhythmik, dessen Phase sich im Vergleich zu LD-Zyklen ebenfalls nach vorne verschiebt (Abb. 58 A, B; Wheeler et al., 1993).

Einen Kontrast zum Wildtyp bilden die *nocte* Fliegen, da sich hier die PER-Menge reduziert, und somit eine gedämpfte Oszillation vorherrscht, wobei die Menge an TIM während des ganzen Tages sehr niedrig ausfällt und nur schwach oszilliert. Als Reaktion auf die Temperaturwechsel kann man einerseits eine Abnahme der TIM-Menge bereits am Anfang der Thermophase, und andererseits eine leichte Zunahme derselben in der Cryophase beobachten. Die Effekte der *norpA* Mutation auf PER- und TIM lassen sich in Bezug auf Menge und Oszillation mit denen von *nocte* vergleichen.

Während in Temperaturzyklen die Oszillationen von PER und TIM in den *nocte* Fliegenköpfen einen Synchronisationsdefekt aufweisen, besteht in Licht-Dunkel-Zyklen kein Unterschied zu den Kontrolltieren (Abb. 55).



**Abb. 55. Lichtsynchronisierte PER-/TIM-Oszillationen in *nocte* und Wildtyp-Fliegen.** In LD-Zyklen (weiß:schwarz) zeigen sowohl die mutanten BG-*luc60*, *nocte* Fliegen (M), als auch die BG-*luc60*-Kontrolltiere (BG) ähnliche zeitabhängige Schwankungen in Proteinmenge und Phosphorylierung.

Zusammenfassend kann man daher konstatieren, dass analog zu den Biolumineszenzdaten beide Mutanten in den Fliegenköpfen einen Synchronisationsdefekt der PER-/TIM-Oszillationen in Temperaturzyklen aufweisen.

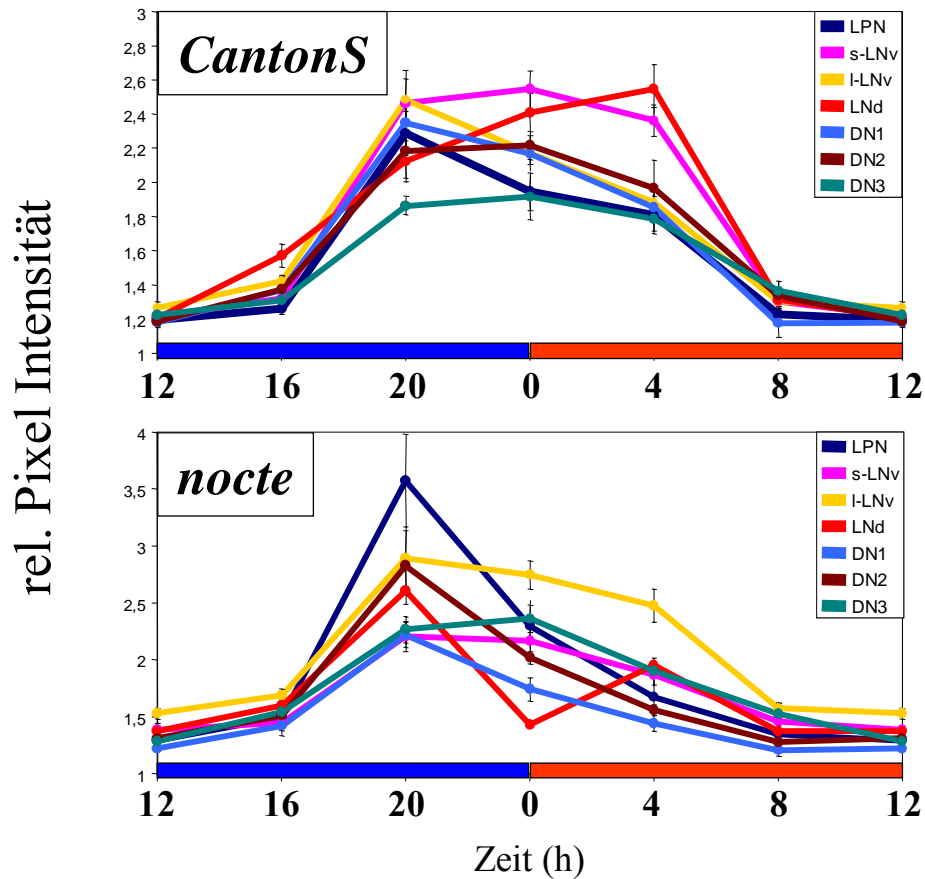
Bei dieser Methode werden hauptsächlich die molekularen Oszillationen in den Photorezeptorzellen gemessen (Stanewsky et al., 1998). Ebenso wie die Biolumineszenzsignale der isolierten Körperteile repräsentieren die Ergebnisse des Westernblots daher die Oszillationen peripherer circadianer Uhren. Doch warum bringen die Westernblots einen Temperatursynchronisationsdefekt der *norpA*- und *nocte*-Mutanten zum Ausdruck, wohingegen in den Gewebekulturen robuste temperaturinduzierte Rhythmen vorherrschen? Der Unterschied zu den isolierten Fliegenköpfen in Kultur besteht darin, dass die Westernblots die Oszillationen peripherer Gewebe in einer intakten Fliege aufzeigen. Demgegenüber entstammen die Biolumineszenzsignale der Gewebekulturen aus isolierten Körperteilen, wodurch eine Analyse der Oszillationen dieser Gewebe *in-vivo* über einen großen Zeitraum hinweg ermöglicht wird.

### 3.2.4 PER-Oszillationen in den Uhrneuronen der *nocte*-Fliegen

Biolumineszenzrhythmen repräsentieren zum Großteil Signale aus dem Körper (Abb. 26). Zudem werden in den Westernblots hauptsächlich die Protein-Oszillationen in den Komplexaugen analysiert. Jedoch beantwortet dies nicht, ob Temperaturzyklen im Dauerlicht gleichermaßen in den Uhrneuronen die PER-Oszillation synchronisieren, und ob diese durch den *nocte* Hintergrund beeinträchtigt werden. Deshalb wurden an Gehirnen temperatursynchronisierter Fliegen (4 Tage 12:12 h 25°C:18°C, LL)  $\alpha$ -PER-Färbungen vorgenommen und die Signale der einzelnen Neuronengruppen quantifiziert.

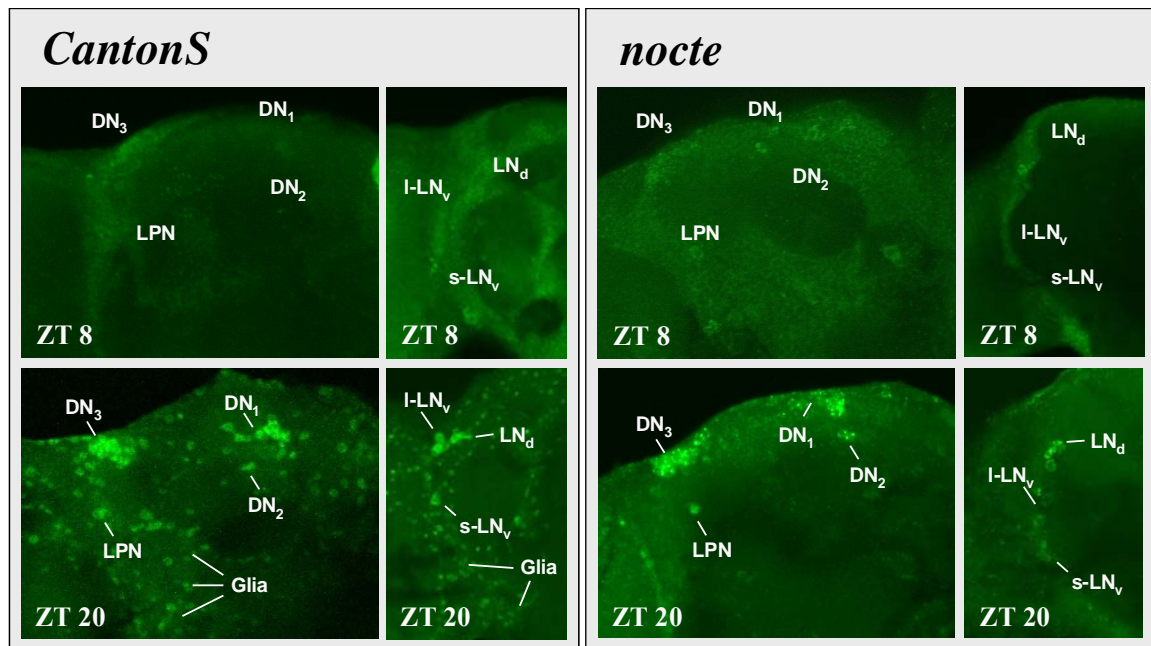
In den Hirnen von *CantonS*-Fliegen konnten robuste temperaturinduzierte Oszillationen des PER-Proteins sowohl in den bekannten Uhrneuronen (LNs, DN<sub>s</sub>), als auch in den LPNs festgestellt werden (Abb. 56). Letztere spielen dem Anschein nach eine wichtige Rolle bei der Temperatursynchronisation der inneren Uhr (Yoshii et al., 2005; A. Busza und P. Emery, persönliche Mitteilung).

Im Laufe der Cryophase akkumuliert das PER-Protein (ZT 16 – ZT 20), woraufhin es in der Thermophase wieder abgebaut wird (ZT 4 – ZT 8). Aufgrund des Maximums der PER-Färbung lassen sich die Neuronen in drei Gruppen einteilen (Abb. 56). Die s-LN<sub>v</sub>, DN<sub>2</sub> und die DN<sub>3</sub> bringen einen breiten Peak von ZT 20 bis ZT 4 hervor, der die Maxima der anderen Neuronengruppen zu umspannen scheint (Abb. 56). In den DN<sub>1</sub>, den LPNs und den l-LN<sub>v</sub>'s liegt das Maximum bei ca. ZT 20 und die LN<sub>d</sub>'s zeigen als einzige Neuronengruppe einen Peak bei ZT 4 in der Warmphase.



**Abb. 56. Quantifizierung der  $\alpha$ -PER-Färbungen in den Uhrneuronen von *CantonS*- und *nocte*-Fliegen in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C=rot:blau, LL).** In den *CantonS*-Fliegen werden durch Temperaturzyklen in allen *per* exprimierenden Neuronen rhythmische Oszillationen induziert (oben). Dabei peaken die l-LNV's, DN<sub>1</sub> und LPNs bei ZT 20, die LNd's als einzige Gruppe bei ZT 4 und die s-LNV's, DN<sub>2</sub> und DN<sub>3</sub> weisen von ZT 20 bis ZT 4 eine konstante PER-Färbung auf. Im *nocte* Hintergrund ist die PER-Färbung, ähnlich *CantonS*, zwischen ZT 20 und ZT 4 am intensivsten (unten). Im Vergleich zum Wildtyp ist aber die Amplitude der Oszillationen in den s-LNV's gedämpft und in den l-LNV's und DN<sub>2</sub> leicht erhöht. Einen großen Unterschied zum Wildtyp stellt aber die höhere Amplitude der LPNs bei ZT 20 und der fehlende Peak der LNd's bei ZT 4 dar. (Quantifizierung an jeweils 5 Hemisphären)

Analog zum Wildtyp ist im *nocte*-Hintergrund zwischen ZT 20 und ZT 4 die PER-Färbung am ausgeprägtesten (Abb. 56). Dies zeigt, dass die PER-Oszillationen in den *nocte* Hirnen mittels Temperaturzyklen in LL synchronisiert werden können. Im Vergleich zu den *CantonS*-Hirnen existieren aber diverse Abweichungen. Die PER-Oszillationen in den DN<sub>1</sub> und DN<sub>3</sub> laufen ähnlich wie im Wildtyp ab. Die *nocte*-Mutation verursacht hingegen eine Amplitudendämpfung in den s-LNV's und eine Amplitudenerhöhung in den l-LNV's und in den DN<sub>2</sub>. Weitere Unterschiede zum Wildtyp stellen zum einem der scharfe Peak der LPNs bei ZT 20 und zum anderen die Phase der *nocte* LNd's bei ZT 20 (im Vergleich zu ZT 4 bei *CantonS*) dar (Abb. 56). Zudem fällt auf, dass die PER-Färbung in den Gliazellen innerhalb der *nocte*-Hirne zu ZT 20 gänzlich ausbleibt (Abb. 57).



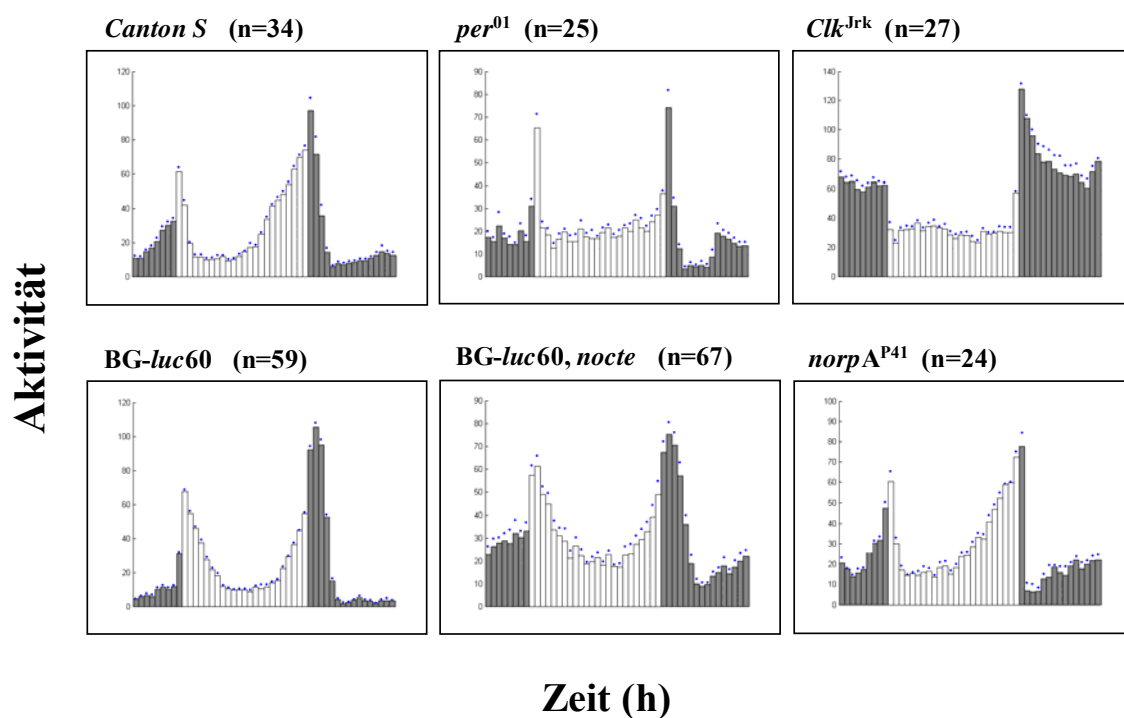
**Abb. 57. Antikörperfärbungen ( $\alpha$ -PER) an *CantonS*- und *nocte*-Fliegenhirnen zu ZT 20 und ZT 8 in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C, LL). In beiden Fliegenlinien (*CantonS*, *nocte*) kann zu ZT 20 in allen Neuronen eine starke  $\alpha$ -PER-Färbung festgestellt werden, während diese bei ZT 8 nur knapp über dem Hintergrund liegt. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen die Gliazellen in den *nocte* Hirnen keine PER-Färbung bei ZT 20. Im Wildtyp konnte nur zu ZT 20 eine Färbung der Gliazellen beobachtet werden.**

Als Fazit kann daher gezogen werden, dass in wildtypischen Fliegen Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C) unter LL rhythmische Oszillationen des PER-Proteins in allen *period* exprimierenden Zellen, inklusive den LPNs, induzieren (Abb. 56; vgl. Yoshii et al., 2005). Im *nocte*-Hintergrund treten in Temperaturzyklen ähnliche rhythmische Oszillationen auf. Jedoch wird durch die Mutation eine Dämpfung der temperaturinduzierten Oszillation in einigen Neuronengruppen verursacht, während in anderen Neuronen im Vergleich zum Wildtyp die Amplitude erhöht oder sogar deren Phase modifiziert wird (Abb. 56). Schließlich induzieren Temperaturzyklen die Oszillationen in den einzelnen Neuronen der *nocte*-Fliegen (Abb. 56). Die Synchronisation dieser Neuronengruppen untereinander scheint aber einer Restriktion zu unterliegen. Ein Indiz dafür liefert auch die fehlende PER-Färbung in den Gliazellen (Abb. 57). In LD-Zyklen trägt diese Zellgruppe zur Robustheit der Rhythmizität bei (Ewer et al., 1992; zusammengefasst bei Helfrich-Förster, 1995), während die auf Gliazellen beschränkte PER Expression in der Lage ist, rudimentäre Rhythmik in DD zu vermitteln (Ewer et al., 1992).

### 3.2.5 Synchronisation der Lokomotorrhythmik von *nocte*- und *norpA*-Mutanten

Um den Bedeutungszusammenhang beider Mutationen in Hinblick auf die Temperatursynchronisation der Uhrneuronen im Hirn zu beleuchten, fand eine Messung des entsprechenden Outputs mit Hilfe des rhythmischen Lokomotorverhaltens statt. Die Lokomotorrhythmik lässt sich gut durch Temperaturzyklen in DD oder LL synchronisieren, wobei bereits ein Unterschied von 3°C ausreichend ist (Wheeler et al., 1993). In LD-Zyklen mit konstanter Temperatur (25°C) weisen *nocte*, *norpA*<sup>P41</sup>, sowie die Kontrollfliegen ein synchronisiertes bimodales Verhaltensmuster auf, während *per*<sup>01</sup> und *Clk*<sup>Jrk</sup>-Fliegen lediglich ein maskiertes Verhalten zeigen (Abb. 58. A; Helfrich-Förster, 2000; Hamblen-Coyle et al., 1992; Wheeler et al., 1993). Der starke Aktivitätsanstieg vor dem Hell-Dunkel-Wechsel verdeutlicht die Antizipation durch eine intakte circadiane Uhr.

#### A LD und 25°C



**Abb. 58 A. Durchschnittstagesaktivität verschiedener Genotypen in LD und konst. 25°C.** Wildtypfliegen (*CantonS*, *BG-luc60*) sowie die Temperatur-Entrainment-Mutanten (*nocte*, *norpA*) synchronisieren gut an LD-Zyklen. Das bimodale Verhaltensmuster mit der langsam ansteigenden Abendaktivität spiegelt die Antizipation der Licht-Dunkel-Wechsel wider. Fliegen mit genetisch zerstörten circadianen Uhren zeigen nur einen direkten Effekt auf den Zeitgeber (Masking): Während *per*<sup>01</sup> Fliegen auf die Lichtwechsel mit erhöhter Aktivität reagieren und am Tag mehr aktiv sind, unterdrückt Licht bei *Clk*<sup>Jrk</sup>-Mutanten die Aktivität. Der Hell-Dunkel-Wechsel löst einen starken Aktivitätsschub aus. Die *Clk*<sup>Jrk</sup>-Tiere scheinen nachtaktiv zu sein. (Licht=weiße Balken, Dunkel=graue Balken)

Das bimodale Verhaltensmuster der mutanten *nocte*- und *norpA*-Tiere in LD Zyklen (mit konst. 25°C) belegt, dass die Mutanten mit Licht synchronisiert werden können. Ein Beweis für eine vollständig funktionierende circadiane Uhr kann aber nur nach Analyse der fortdauernden Rhythmen in konstanten Bedingungen (DD, 25°C) erbracht werden. Dazu wurden Fliegen verschiedener Genotypen 6 Tage mit LD-Zyklen synchronisiert und anschließend 5 Tage in konstanten Bedingungen gehalten. Sowohl *nocte*, als auch die beiden wildtypischen Kontrollstämme bringen in konstanten Bedingungen fortdauernde Rhythmen hervor, was konsekutiv bedeutet, dass *nocte* weder die Lichtsynchronisation, noch die Funktion der circadianen Uhr *per se* betrifft (Tab. 18). Die längere Periode, welche bei den BG-*luc60*, *nocte*- sowie den BG-*luc60*-Fliegen, revers zu dem CantonS-Stamm vorherrscht, korreliert mit der Anwesenheit des *per-luc*-Konstrukts (Stanewsky et al., 1997a). Während die *norpA*-Mutante in LD-Zyklen synchronisiertes Lokomotorverhalten aufweist, reduziert sich unter konstanten Bedingungen sowohl die Anzahl rhythmischer Tiere, als auch die Signifikanz der gemessenen Rhythmen (Abb. 58 A; Tab. 18). Ursächlich dafür ist die maßgebliche Beteiligung der PhospholipaseC an der Lichtaufnahme des circadianen Systems (Stanewsky et al., 1998; Helfrich-Förster et al., 2001), welche in der *norpA*<sup>P41</sup>-Mutante nicht mehr funktionstüchtig ist (Pearn et al., 1996). Da die molekularen Oszillationen in *per*<sup>01</sup>-Mutanten unterbrochen sind, bringen diese Fliegen in LD-Zyklen lediglich maskiertes Verhalten, respektive unter konstanten Bedingungen Arrhythmizität hervor (Abb. 58 A; Tab. 18).

	LD, 25°C				DD, 25°C			
Genotyp	Periode	n (%)	RI	RS	Periode	n (%)	RI	RS
<i>CantonS</i>	23.9 ± 0.1	13(100)	0.47	4.1	23.7 ± 0.1	13(100)	0.44	3.7
<i>per</i> <sup>01</sup>	23.5 ± 0.1	7(87)	0.25	2.4	-	(0)	-	-
<i>norpA</i> <sup>P41</sup>	23.9 ± 0.1	10(91)	0.29	2.0	23.5 ± 0.1	7(64)	0.25	2.4
BG- <i>luc60</i>	24.1 ± 0.1	18(100)	0.42	3.7	24.9 ± 0.1	18(94)	0.43	3.6
BG- <i>luc60</i> , <i>nocte</i>	24.0 ± 0.1	25(96)	0.38	3.3	25.3 ± 0.2	17(88)	0.32	2.7

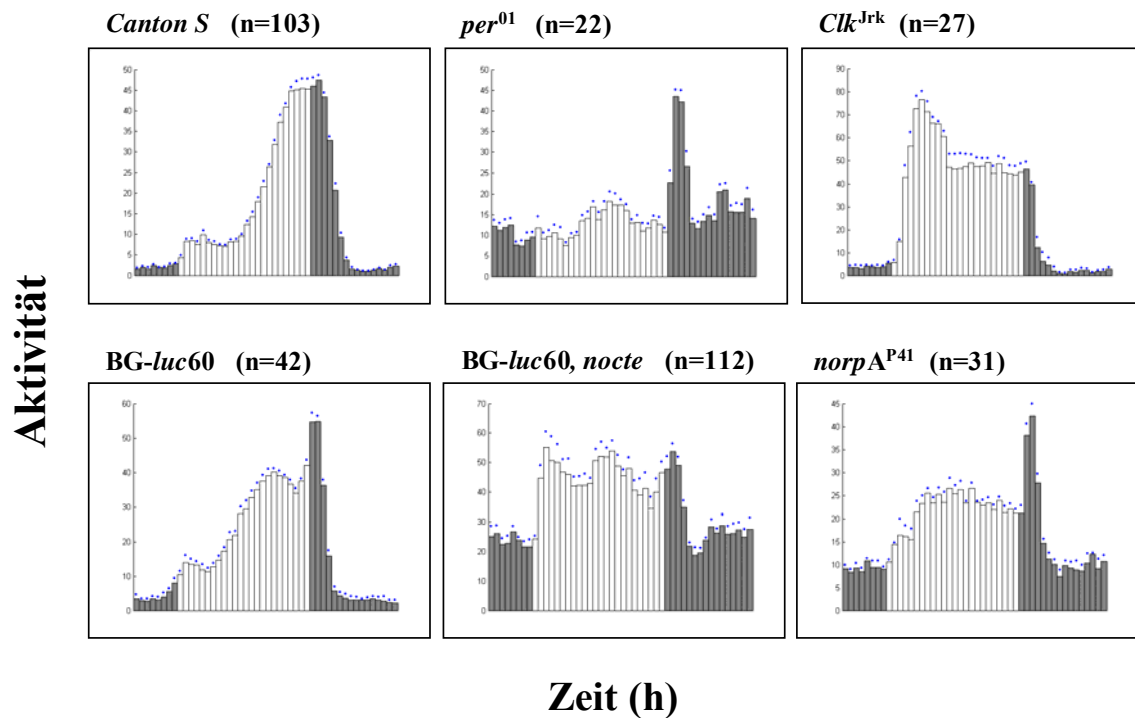
**Tab. 18. Lokomotorverhalten in konstanten Bedingungen (DD, 25°C).** Die Fliegen wurden 6 Tage mit LD-Zyklen (12:12 h, 25°C) synchronisiert und anschließend 5 Tage in konstanten Bedingungen gehalten (DD, 25°C). Die Periodenwerte reflektieren in LD daslichtsynchronisierte Verhalten (vgl. Abb. 58 A) und geben in DD die endogenen Periodenlängen der circadianen Uhr *per se* wieder. RI und RS sind Maße für die Signifikanz der gemessenen Rhythmen (Rhythmusindex, -stärke; siehe 2.5.1), die Werte hinter den Perioden geben den SEM an, n bzw. (%) stellen die getesteten Tiere sowie deren Rhythmizität in Prozent dar.

Betrachtet man die Wildtypfliegen in LL und Temperaturzyklen, bringen diese lediglich eine schwache Morgenaktivität hervor (Abb. 58. B, C). Diametral dazu fällt der Aktivitätspeak am Abend sehr breit aus, wobei dieser entweder in den letzten Stunden der Thermophase (BG-*luc60*), oder am Warm-Kalt-Wechsel auftritt und dabei bis in die



Cryophase hineinreicht (*CantonS*). Desweiteren signalisiert ein Aktivitätsanstieg vor dem Temperaturwechsel, dass auch in Temperaturzyklen der Tag-Nacht-Wechsel (warm-kalt) antizipiert wird. Äquivalent zu LD, liegt diesem Verhalten eine funktionierende circadiane Uhr zugrunde, da bei Fliegen mit einer Nullmutation im *period* Gen (*per*<sup>01</sup>) keine Antizipation beobachtet werden kann. So zeigen diese Tiere eine leicht erhöhte Aktivität in der Warmphase und reagieren stark auf den Wechsel von warm nach kalt. Zudem fehlt in der niedrigen Temperatur (=Nacht) die Repression der Aktivität (Abb. 58. B).

## B LL und 12:12 h 25°C:18°C

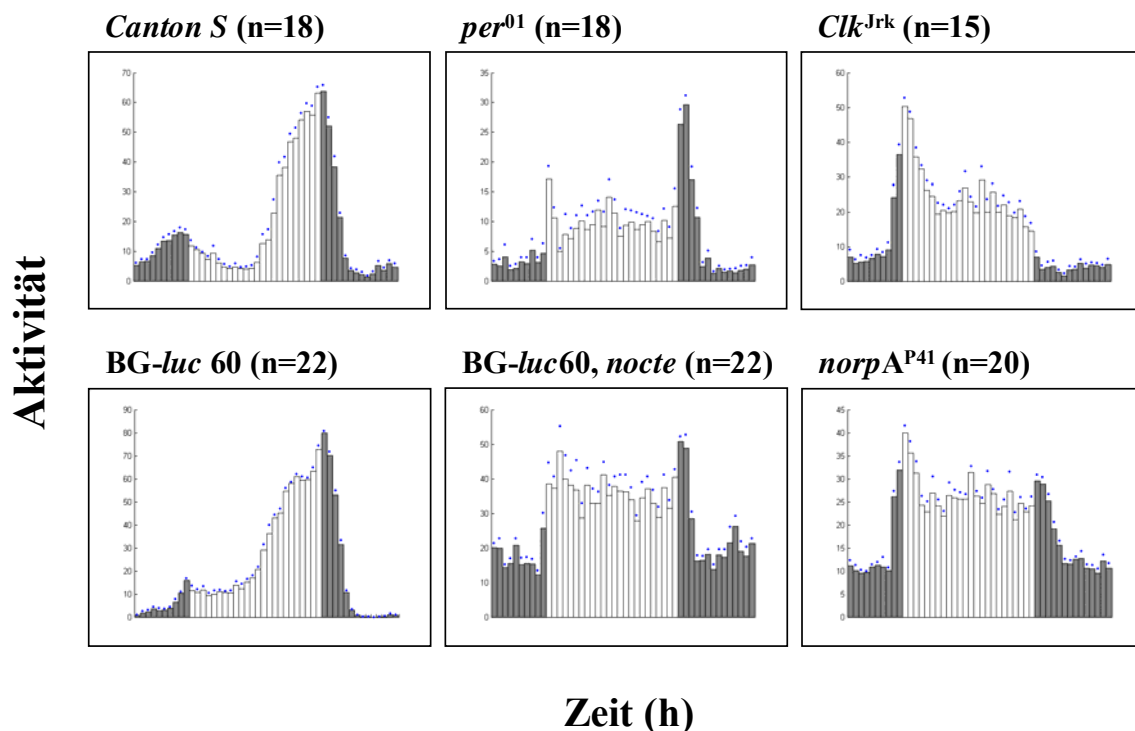


**Abb. 58 B. Tagesaktivität verschiedener Genotypen in LL und Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C).** In LL und Temperatur bringen die Kontrollen (*CantonS*, *BG-luc60*) nur schwache Morgenaktivität hervor, aber eine starke Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels. *per*<sup>01</sup>-Fliegen sind etwas aktiver am Tag, reagieren stark auf die Absenkung der Temperatur und weisen keine Repression der Nachtaktivität auf. *Clk*<sup>Jrk</sup>-Fliegen sind gegenüber LD in der Thermophase (Tag) daueraktiv und reagieren stark auf den Temperaturanstieg. Die Aktivität von *nocte* ähnelt jener von *per*<sup>01</sup>, erreicht jedoch während des Tages ein stark erhöhtes Level. Dagegen werden *norpA*-Fliegen am Anfang des Tages langsam aktiver. Der Warm-Kalt-Wechsel erzeugt einen großen Aktivitätspeak. (weiß=25°C, Thermophase; graue=18°C, Cryophase)

Während die *Clk*<sup>Jrk</sup>-Fliegen in LD-Zyklen in der Nacht deutlich aktiver sind, beschränkt sich die Lokomotoraktivität in Temperturzyklen hauptsächlich auf die Thermophase (warm) und wird durch die kalten Temperaturen stark herabgesenkt. Beide Mutanten (*nocte*, *norpA*) weisen einen Defekt in der Synchronisation von Temperaturzyklen auf: Das Verhalten von *nocte*-Fliegen ist äquivalent zu dem von *per*<sup>01</sup>, so dass ebenfalls ein kleiner

Peak inmitten der Warmphase erzeugt wird, wobei sich die Aktivität jedoch in hohen Temperaturbereichen stark erhöht (Abb. 58 B). Demgegenüber führt der Temperaturanstieg bei der *norpA*-Mutante zu einer langsam ansteigenden Aktivität, die während der Warmphase auf einem konstanten Level bleibt. Hingegen verursacht das Absenken der Temperatur einen starken Aktivitätsschub. Analog zu den *per*<sup>01</sup> und *nocte*-Fliegen sind auch die *norpA*<sup>P41</sup>-Tiere in der Kaltphase aktiv (Abb. 58 B). Interessanterweise ist der Defekt von beiden Mutanten in den „höheren“ Temperaturzyklen (29°C:20°C) stärker ausgeprägt: Sie reagieren auf die Temperaturerhöhung mit einem plötzlichen Anstieg der Laufaktivität, und halten diese bis zum Ende der Warmphase konstant (Abb. 58 C).

### C LL und 12:12 h 29°C:20°C



**Abb. 58 C. Tagesaktivität verschiedener Genotypen in LL und Temperaturzyklen (12:12 h 29°C:20°C).** Ähnlich den Temperaturzyklen mit 25°C und 18°C weisen wildtypische Fliegen eine gut synchronisierte Lokomotoraktivität auf. *ClkJrk*-, sowie *per*<sup>01</sup>-Fliegen zeigen ein ähnliches Verhaltensmuster analog zu den niedrigen Temperaturzyklen. Die Aktivität von *per*<sup>01</sup> ist jedoch während des Tages höher und wird in der Nacht reprimiert. Erstaunlich ist, dass sich sowohl bei *norpA*, als auch bei *nocte* durch eine Erhöhung der Temperaturspanne der Synchronisationsdefekt verstärkt: Die Aktivität steigt in der Thermophase rasch an und bleibt während des Tages konstant. (weiße Balken=29°C, Thermophase; graue Balken=20°C, Cryophase)

Angeichts dieser Ergebnisse wird eine robuste Synchronisation des Lokomotorverhaltens von Wildtyp-Fliegen mittels Temperaturzyklen in Dauerlicht nachgewiesen (cf. Yoshii et

al., 2002; Glaser and Stanewsky, 2005). Im Kontrast zum LD-Entrainment ist aber der Abendpeak, welcher den Warm-Kalt-Wechsel antizipiert, weiter in die Warmphase hineinversetzt (Abb. 58 B; Yoshii et al., 2002). Dies bildet eine Analogie zu den PER-Oszillation in temperatursynchronisierten Fliegenköpfen, die im Vergleich zu LD-Zyklen ebenfalls eine nach vorne verschobene Phase aufweisen (siehe 3.2.3).

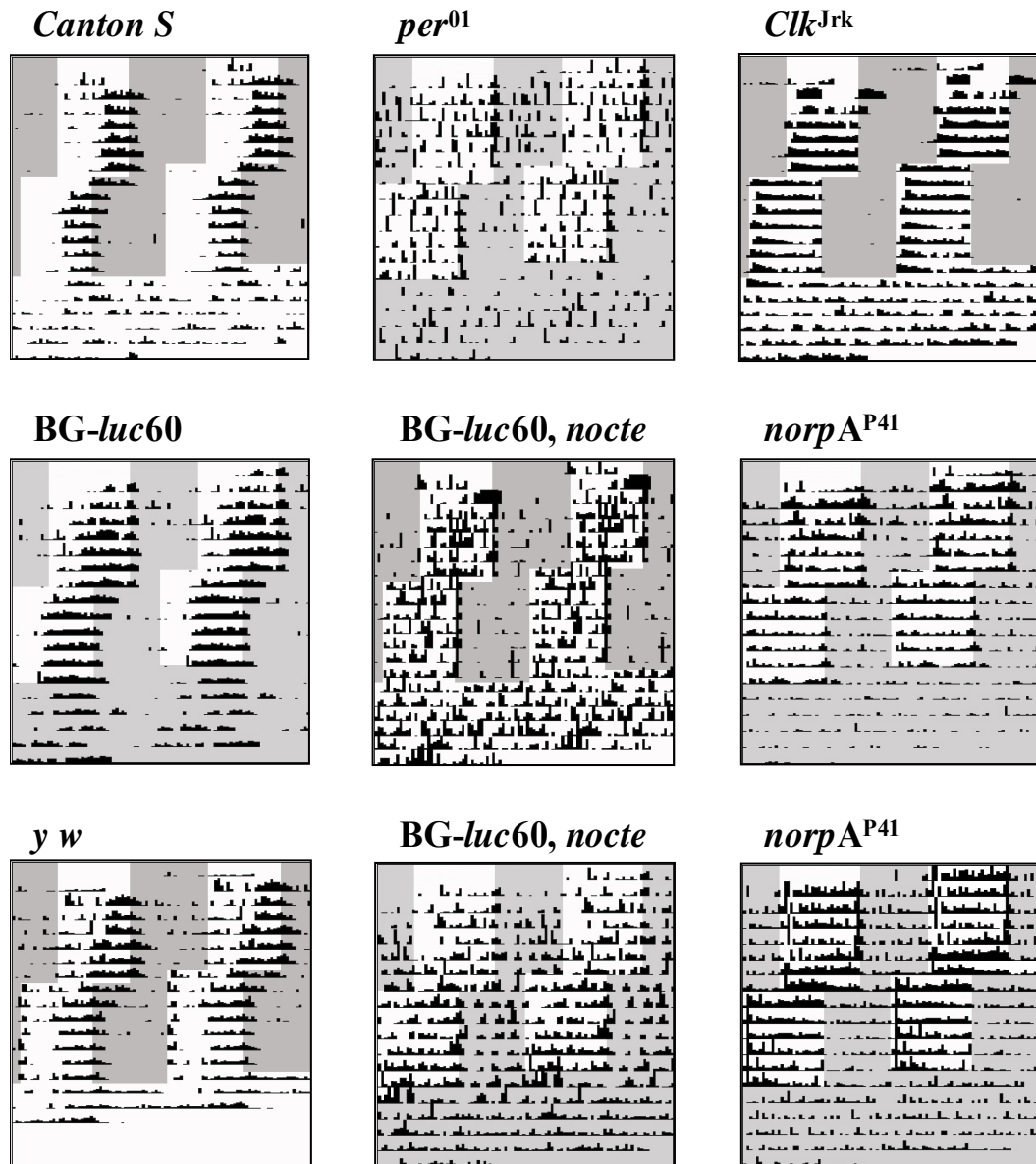
Ferner reagieren die *Clk<sup>Jrk</sup>*-Tiere in Temperaturzyklen direkt auf die Temperaturwechsel, während bei den *per<sup>01</sup>*-Mutanten ein Peak inmitten der Thermophase messbar ist (Abb 58 B, C). In früheren Studien war dieser Peak in *per<sup>01</sup>*- und *tim<sup>01</sup>*-Fliegen stets 6 h nach Beginn der Thermophase zu beobachten und scheint durch rudimentäre, oszillierende Komponenten, die durch den Temperatur-StepUp aufrechterhalten werden, ausgelöst zu werden (Yoshii et al., 2002; Yoshii et al., 2006).

Beide Mutanten, *norpA<sup>P41</sup>* und *nocte*, zeigen einen Synchronisationsdefekt der Lokomotorrhythmik in 25°C:18°C-Temperaturzyklen, der sich durch eine Erhöhung der Temperaturspanne auf 29°C:20°C weiter verstärkt (Abb. 58 B, C). In den 25°C:18°C-Temperaturzyklen erscheint bei dem Verhaltensmuster der *nocte*-Fliegen gleichermaßen ein Peak inmitten der Thermphase. Dieser wiederum ähnelt jenem Peak, der bei *per<sup>01</sup>*-Fliegen aus dem Temperaturanstieg hervorgeht (Abb. 58 B; Yoshii et al., 2002).

### 3.2.6 Synchronisation an phasenversetzte Temperaturzyklen

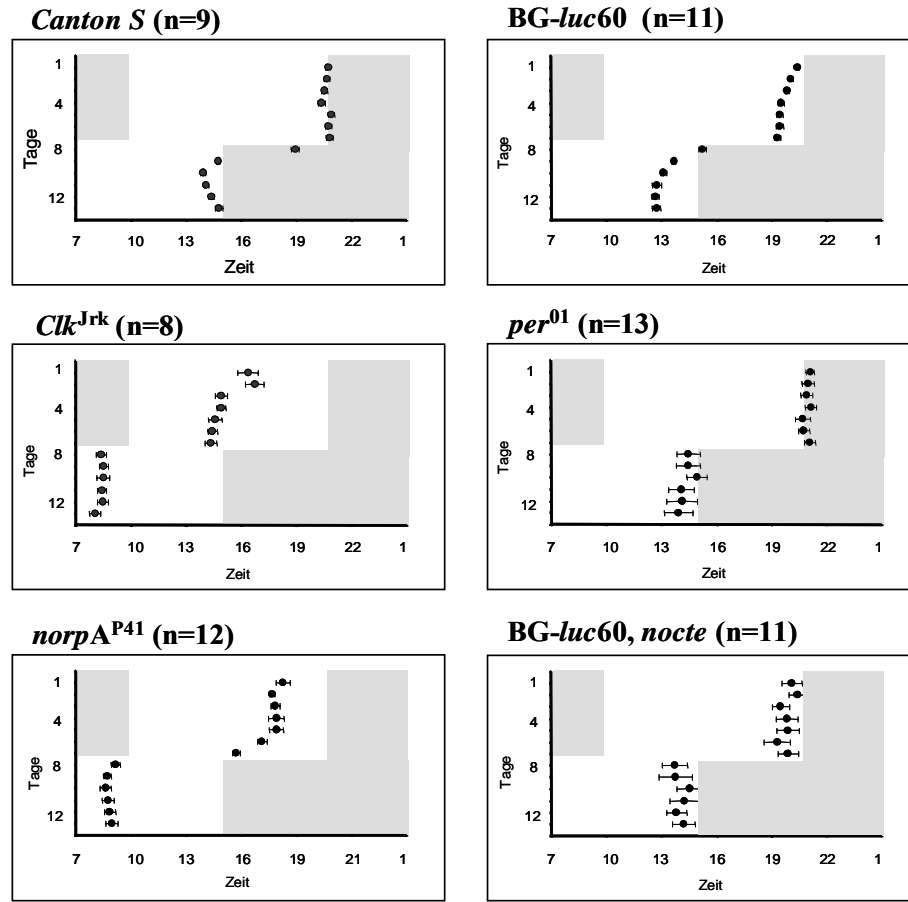
Zur weiteren Charakterisierung des Synchronisationsdefekts von *norpA*- und *nocte*-Mutanten wurde das Lokomotorverhalten in zwei aneinanderfolgenden Temperaturzyklen (LL, 25°C:18°C) gemessen, wobei der zweite um 6 Stunden nach vorne versetzt wurde (Abb. 59). Von den resultierenden Aktivitätspeaks jeder Fliege wurden die Maxima ermittelt, um die Phasenlage des Lokomotorverhaltens relativ zum Zeitgeberrhythmus bestimmen zu können (siehe 2.5.1). Alle Wildtyp-Fliegen (*CantonS*, BG-*luc60*, *y w*) zeigen im ersten Regime eine klare Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels als Indiz für ein robust synchronisiertes Lokomotorverhalten (Abb. 59). Der Wechsel der Zeitgeberphase um 6 h nach vorne verursacht dabei sogenannte Übergangszyklen (=transient cycles), das heißt, die wildtypischen Fliegen benötigen Zwischenschritte, um die Oszillationen ihrer circadianen Uhr in eine stabile Phasenbeziehung zum neuen Temperaturzyklus zu setzen (Abb. 59; Abb. 60). Dabei weisen die *CantonS*-Fliegen eine Überkompensation auf (Abb. 60). Dies ist daran zu erkennen, dass sie die Phase ihres synchronisierten Laufverhaltens in Reaktion auf die versetzten Zyklen zu weit nach vorne verstellen und erst dann an den Zeitgeberrhythmus anpassen.

Bei den Mutanten (*per*<sup>01</sup>; *Clk*<sup>Jrk</sup>, *nocte*, *norpA*<sup>P41</sup>) fehlt das Übergangsverhalten (transient), da sie ausschließlich auf die Temperaturwechsel reagieren (Abb. 59; Abb. 60).



**Abb. 59. Aktogramme von Fliegen in Dauerlicht (LL) und 12:12 h 25°C:18°C.**

Nach 7 Tagen wurden die Temperaturzyklen um 6 h nach vorne verschoben, und die Fliegen in LL und konstanten 18°C (grau) oder 25°C (weiß) gehalten. Alle wildtypischen Fliegen (*CantonS*, *BG-luc60*, *y w*) synchronisieren ihr Laufverhalten gut an das erste Temperaturregime und benötigen Übergangszyklen, um ihr Verhalten an die versetzte Phase des zweiten Zyklus anzupassen (linke Spalte). Bei den Mutanten (*per*<sup>01</sup>; *Clk*<sup>Jrk</sup>; *norpA*<sup>P41</sup>; *nocte*) fehlt dieses Übergangsverhalten, da sie nur eine direkte Reaktion auf die Temperaturzyklen zeigen (mittlere, sowie rechte Spalte). (weiß=25°C, grau=18°C)



**Abb. 60. Phasenanalyse der Lokomotorrhythmik in um 6 h nach vorne versetzten Temperaturzyklen (LL und 12:12h 25°C:18°C).** Zur Analyse der Phase wurden Einzelaktogramme geglättet und der Hauptpeak der Tagesaktivität bestimmt: Wildtyp-Fliegen (*CantonS*, *BG-luc60*) benötigen einen Zwischenschritt, um ihr rhythmisches Verhalten in eine stabile Phasenbeziehung zu dem verschobenen Zeitgeberrhythmus zu bringen. Bei den *CantonS*-Fliegen kann eine Überkompensation beobachtet werden, d.h. die Fliegen versetzen in Reaktion auf den versetzten Zeitgeberrhythmus die Phase ihrer synchronisierten Laufaktivität zu weit nach vorne und etablieren dann langsam eine stabile Phasenbeziehung. Alle Mutanten (*per<sup>01</sup>*, *Clk<sup>Jrk</sup>*, *norpA<sup>P41</sup>*, *nocte*) zeigen kein Übergangsverhalten, sie reagieren nur auf die Temperaturzyklen. Dabei kann entweder zu Anfang (*Clk<sup>Jrk</sup>*, *norpA*), oder gegen Ende (*per<sup>01</sup>*, *nocte*) der Thermophase eine stärkere Aktivität auftreten. (weiß=25°C, grau=18°C)

Somit sind viele Aspekte des Licht-Entrainments gleichermaßen für die Temperatursynchronisation des Lokomotorverhaltens gültig, wie z.B. die Notwendigkeit einer funktionierenden circadianen Uhr, oder deren stabile Phasenlage im Verhältnis zum Zeitgeberrhythmus. Parallel zu anderen Studien belegt dies, dass Temperaturzyklen in Dauerlicht (LL) starke Zeitgeber zur Synchronisation des rhythmischen Lokomotorverhaltens in Wildtyp-Fliegen darstellen (cf. Yoshii et al., 2002).

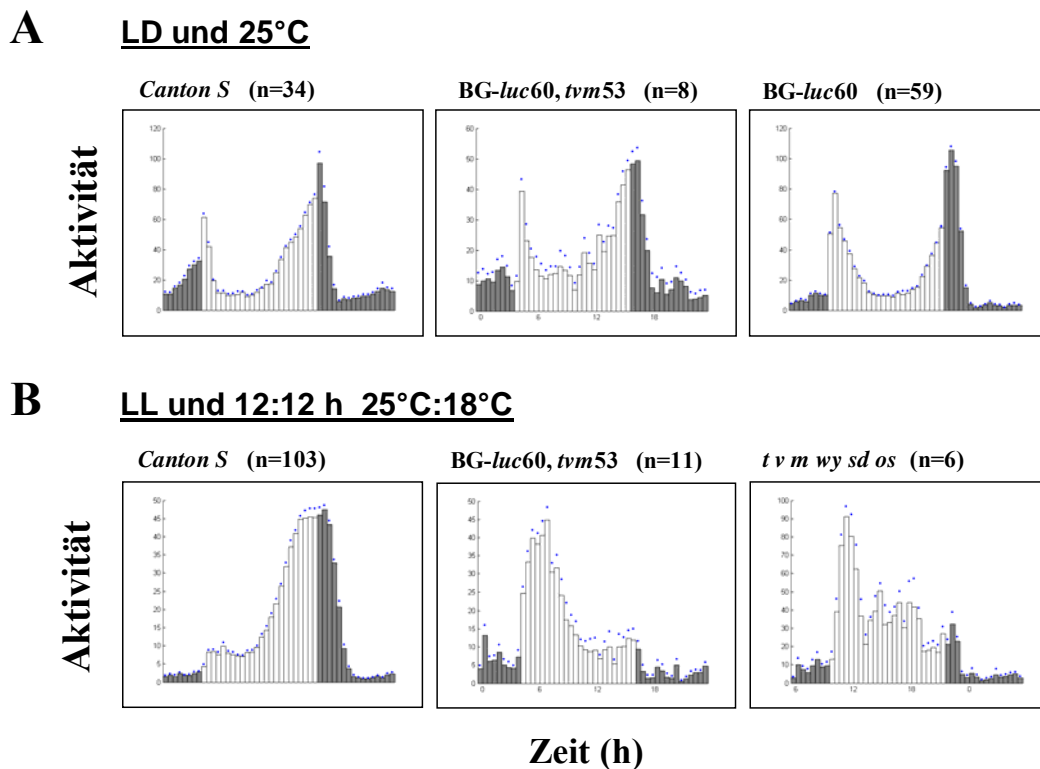
Zudem demonstrieren die Ergebnisse deutlich, dass sowohl *nocte*-, als auch *norpA*-Mutanten einen Defekt in der Temperatursynchronisation der rhythmischen Laufaktivität besitzen und deshalb nur maskiertes Verhalten zeigen, während in synchronisierenden LD-Zyklen beide Fliegenlinien gut synchronisieren.

Grundlage für das rhythmische Lokomotorverhalten sind die Oszillationen in den Uhrneuronen des Fliegenhirns (Zerr et al., 1990; Ewer et al., 1992; Frisch et al., 1999; Helfrich-Förster, 1995; Konopka, 1989; Hall, 2000; Handler and Konopka, 1979). Analog zu dem Lichtentrainment ist dabei ein intaktes kommunikatives Netzwerk zwischen diesen Neuronen für die Temperatursynchronisation essentiell (A. Busza und Emery P., pers. Mitteilung). In der *nocte*-Mutante wurde bereits gezeigt, dass die PER-Oszillationen im Fliegenhirn durch Temperaturzyklen synchronisiert werden, gegenüber dem Wildtyp aber Abweichungen aufweisen (siehe 3.2.4). Zudem können keine Färbungen in den Gliazellen festgestellt werden. Diese tragen in LD-Zyklen zur Robustheit der synchronisierten Lokomotorrhythmik bei und beschreiben somit eine Ursache, warum das Verhalten der *nocte*-Fliegen keine Synchronisation anhand Temperaturzyklen zulässt (Ewer et al., 1992). Demgegenüber scheint die Lichtsynchronisation bei den *nocte*-Fliegen intakt zu sein, was gegen eine generelle Ablation der Gliazellen spricht (Abb. 58 A; Tab. 18).

Diametral zum Licht-Entrainment sind bei der Temperatursynchronisation des Verhaltens neben den lateralen und dorsalen Neuronen auch andere Komponenten involviert. Das rührt daher, dass eine funktionierende Uhr in den klassischen Uhrneuronen (LNs, DNs) allein nicht dazu ausreicht, um vollständig wildtypisches Verhalten hervorzubringen (A. Busza und P. Emery, pers. Mitteilung). Die *period* exprimierenden LPNs repräsentieren dabei einen Kandidaten (Yoshii et al., 2005; A. Busza und P. Emery, pers. Mitteilung). Im *nocte* Hintergrund befindet sich in den LPNs jedoch ebenfalls eine klare temperaturinduzierte PER-Oszillation (siehe 3.2.4). Betrachtet man die Ergebnisse der Biolumineszenzversuche, so ergibt sich ein möglicher Ansatz. Die Adulten von *nocte* und *norpA* weisen einen temperaturspezifischen Synchronisationsdefekt auf, während die einzelnen Gewebe mittels Temperaturzyklen synchronisiert werden können. Dies deutet bei beiden Mutanten auf eine fehlende Kopplung, respektive auf einen Wegfall der Synchronisation der einzelnen Oszillatoren untereinander hin, und könnte somit auch die Ursache für den Synchronisationsdefekt der Lokomotorrhythmik in Temperaturzyklen darstellen. Mithin könnte *nocte* sowohl in der Peripherie, als auch im zentralen Oszillator einen Kopplungsfaktor zwischen den Oszillatoren bilden.

### 3.3 Eine Temperatur-Entrainment-Mutante im Multimarkerstamm *t v m wy sd os*

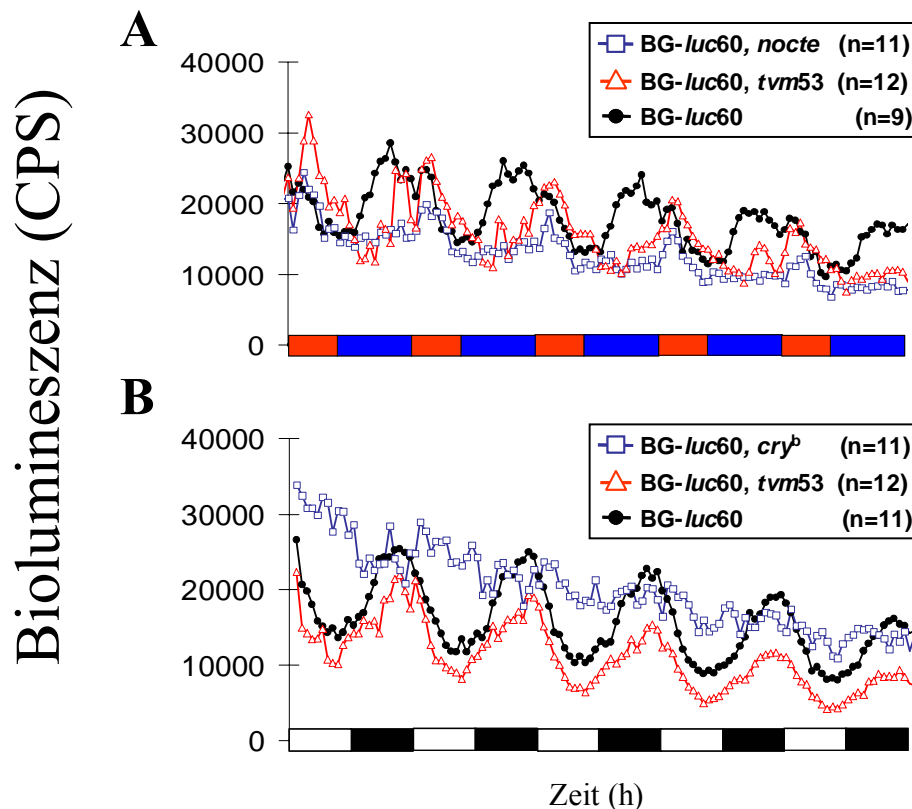
Bemerkenswert bei der Kartierung der *nocte*-Mutation war, dass die Rekombinanten der Multimarkerstämme *y cv v f car* und *t v m wy sd os* die *nocte* Mutation auf unterschiedliche Bereiche des X-Chromosoms kartieren (13F1-20C: Abb 62 und 9A-9D: Abb. 64). Die Analyse der Lokomotoraktivität der Rekombinante *tvm53* (= 53. Rekombinante von *t v m wy sd os* mit dem *nocte* Stamm, Marker: *t v m wy*) brachte zutage, dass die Fliegen zwar einen Defekt in der Temperatursynchronisation besitzen (Abb. 61 B), dieser sich aber von der Daueraktivität der *nocte*-Fliegen unterscheidet (Abb. 58 B). So zeigt die *tvm53*-Mutante in den ersten Stunden der Thermophase einen starken Aktivitätspeak, der durch die steigende Temperatur ausgelöst wird. Während der Thermophase ist die Aktivität hingegen unterdrückt. Nur gegen Ende der Thermophase lässt sich eine sehr geringe Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels beobachten (Abb 61).



**Abb. 61. Lokomotorverhalten von *tvm53*-Fliegen in (A) Licht- und (B) Temperaturzyklen.** Die *tvm53*-Fliegen generieren in LD-Zyklen ein bimodales synchronisiertes Aktivitätsmuster (A) und weisen einen temperaturspezifischen Verhaltensdefekt auf (B). Ähnlich *Clk<sup>Jrk</sup>*-Fliegen (Abb 58 B) reagieren sie auf die Temperaturerhöhung mit einer Aktivitätssteigerung, die im Laufe der Thermophase abnimmt. Der gleiche Defekt kann in dem Multimarkerstamm (*t v m wy sd os*) beobachtet werden. (A: weiß=Licht, grau=Dunkel; B: weiß=25°C, grau=18°C).

Ein identisches Verhaltensmuster ließ sich auch bei Fliegen des originalen Multimarkerstamm nachweisen, was belegt, dass der Effekt auf eine Mutation dieses

Stamms zurückzuführen ist (Abb. 61). Die temperaturinduzierten Biolumineszenzsignale jener Mutante sind kaum von denen des *nocte* Stamms zu differenzieren (Abb. 62). In Temperaturzyklen bringt der *per-luc*-Reporter im *tvm53*-Hintergrund nur einen Teil der wildtypischen Oszillation hervor: Während im Wildtyp ein breiter Peak zwischen den Warm-Kalt-Wechseln zu beobachten ist, fällt der Peak von den *tvm53*-Fliegen nur sehr schmal aus. Sein Maximum erreicht jener zu der Zeit des Warm-Kalt-Übergangs (Abb 62). Dieser Defekt ist temperaturspezifisch, da in LD-Zyklen ein wildtypischer Biolumineszenzrythmus induziert wird (Abb. 60).



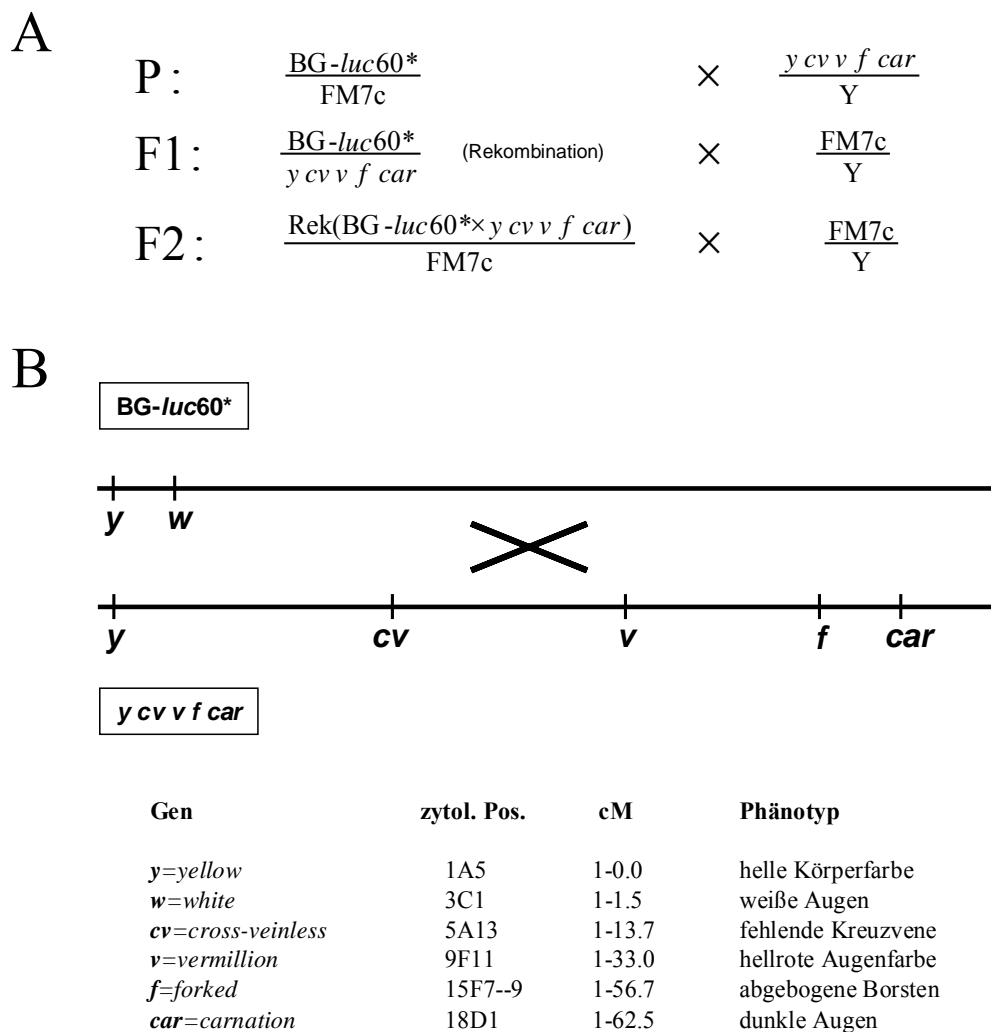
**Abb. 62. Biolumineszenzdaten der spontanen Mutante *tvm53* in (A) LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (rot:blau) sowie (B) LD-Zyklen und konst. 25°C (weiß:schwarz).** Die Mutation im *tvm53*-Stamm weist in Temperaturzyklen nur einen Teilaspekt synchronisierter wildtypischer *per-luc*-Oszillationen auf (A). Im Vergleich zu dem Peak, der bei *nocte* erst durch den Temperaturanstieg ausgelöst wird, lässt *tvm53* jedoch schon vor dem Warm-Kalt-Wechsel eine ansteigende PER-LUC Expression erkennen. Die Biolumineszenz in LD-Zyklen ist nicht betroffen (B). vgl. arhythmische Biolumineszenz der *cry<sup>b</sup>*-Mutante in Licht-Dunkel-Zyklen.

Die genaue Position der Mutation wurde zwar nicht lokalisiert. Jedoch trägt der *tvm53*-Stamm aufgrund der Rekombination die Marker *scalloped* (*sd*) und *outstretched* (*oc*) nicht mehr in sich. Folglich muss sich die Mutation also zwischen 1A1 und 13F1 (*sd*) auf dem X-Chromosom des Multimarkerstamms *t v m s d o s* befinden.



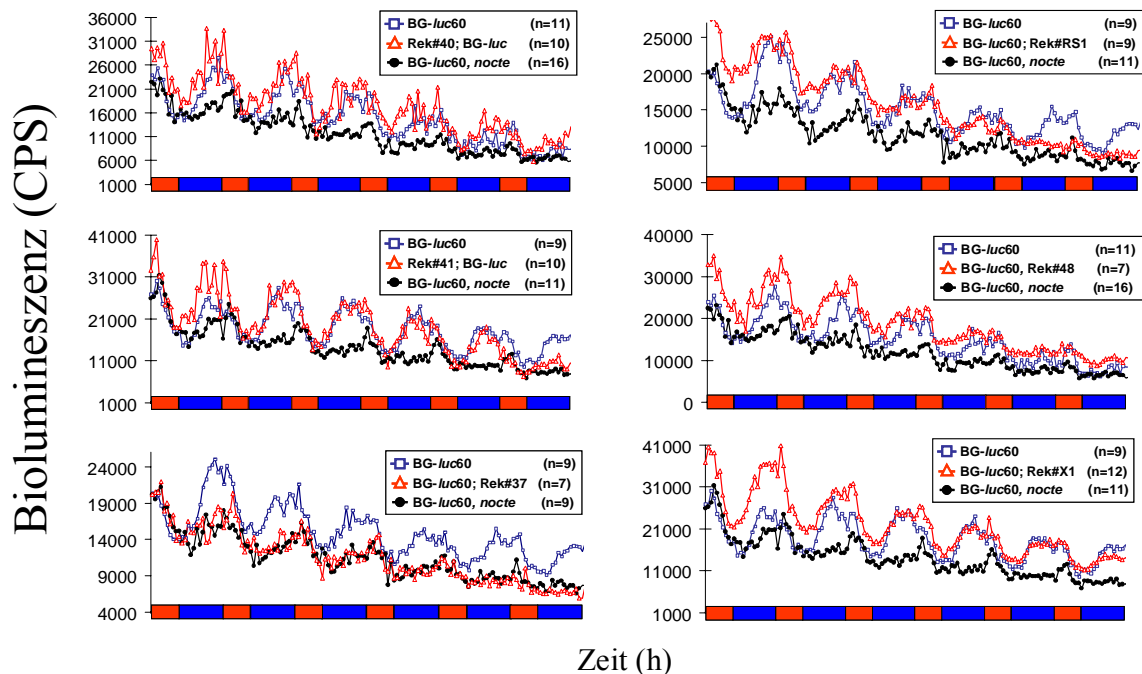
### 3.4 Die Kartierung der *nocte*-Mutation

Die semiletale *nocte*-Mutante entstammt einem Mutagenese-Screen, welcher zur Isolation neuer Faktoren des Temperatur-Entrainments durchgeführt wurde. Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass diese Mutation einen Defekt in der Temperatursynchronisation der circadianen Uhr verursacht. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen wird jedoch die Identität des betroffenen Gens benötigt, weshalb die Kartierung der *nocte*-Mutation einen bedeutenden Teil dieser Dissertation darstellt. Die durchgeführte EMS-Mutagenese lieferte aufgrund der verwendeten Balancer und aufgrund des Kreuzungsschemas (siehe 2.2.1) nur X-chromosomale Mutationen.



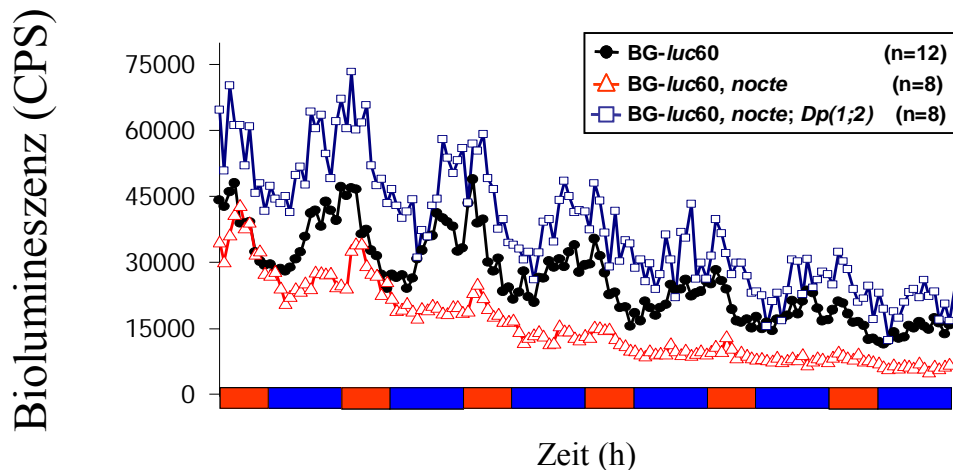
**Abb. 63. Kartierung mittels meiotischer Rekombination: Kreuzungsschema und Marker.** Über das mutagenisierte X-Chromosom (BG-luc60\*) wurde ein Multimarker-Chromosom gekreuzt (A). Durch homologe Rekombination entstanden daraus neue Chromosomen, die sich aus Teilen Beider zusammensetzen. Die einzelnen Abschnitte können aufgrund der verwendeten visuellen Marker identifiziert werden (B). (zytol. Pos.=zytologische Zuordnung zu einzelnen Bändern des Riesenchromosoms; cm=centiMorgan)

Die weitere Lokalisierung erfolgte mittels meiotischer Rekombination zwischen dem mutierten und einem Marker-Chromosom, das rezessive Mutationen mit bekannten Positionen und visuellen Phänotypen trägt (Abb. 63; siehe 2.2.2). Daraus resultieren neue rekombinante X-Chromosomen, die sich aus verschiedenen Teilen beider Chromosomen zusammensetzen (Abb. 66). Die Präsenz dieser visueller Marker in Verbindung mit der *nocte*-Mutation geben Aufschluss über deren ungefähre Position. Aus der Rekombinationskreuzung wurden 118 stabile Stämme etabliert, wovon 12 steril waren. 61 Stämme enthielten den Ausgangsstämmen identische visuelle Marker. Allerdings fallen darunter auch solche Linien, bei welchen entweder nur ein Austausch der *carnation* Mutation auf das *nocte*-Chromosom erfolgte (im *white*-Hintergrund nicht ersichtlich), oder deren Weibchen alle Marker des *nocte*-Chromsoms aufwiesen (*y w BG-luc*), weshalb aufgrund der Semiletalität keine Männchen schlüpften. Daraus resultierten 45 stabile Stämme, wobei nur in 37 Linien Männchen mit dem neuen rekombinanten X-Chromosom schlüpften. Der Rest weist die gleiche Semiletalität hemizygoter Fliegen auf, wie der ursprüngliche *BG-luc60, nocte*-Stamm. Die Analyse der Biolumineszenz bestätigt, dass alle hemizygot vitalen Rekombinanten in LL und Temperaturzyklen wildtypische Rhythmen hervorbringen (Abb. 64; Abb. 66).



**Abb. 64. Biolumineszenz der entscheidenden Rekombinanten in Temperaturzyklen.** Dargestellt sind die 5 wichtigsten wildtypischen Rekombinanten #40, #41, #48, X1 und RS1, die den mutanten Bereich auf 9A2 bis 9D3 eingrenzen. Die Linie #37 besitzt den chromosomalen Abschnitt mit der *nocte* Mutation und zeigt folglich auch den *nocte* Phänotyp. Marker der Rekombinanten: #37 (*y w<sup>+</sup> cv<sup>+</sup> v<sup>+</sup> f<sup>+</sup> car<sup>+</sup>*), #40 (*y w cv<sup>+</sup> v f car*), #41 (*y w cv<sup>+</sup> v f car*), #48 (*y w<sup>+</sup> cv v f<sup>+</sup> car<sup>+</sup>*), #RS1 (*y w<sup>+</sup> cv v<sup>+</sup> f<sup>+</sup> car<sup>+</sup>*), #X1 (*y w<sup>+</sup> cv v<sup>+</sup> f<sup>+</sup> car<sup>+</sup>*)

Die Analyse der Kombinationen zwischen vorhandenen Markern und der *nocte*-Mutation ergab, dass *nocte* zwischen *cross-veinless* (5A13) und *vermillion* (9F11) liegen muss. Aufgrund der großen Abstände der verfügbaren Marker konnten aber mögliche Doppelcrossing-over, bzw. die Lage der Mutation am Chromosomenende nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Bruchpunkte der rekombinanten Chromosomen mittels molekularer Marker (SNPs) bestimmt. Basierend auf Sequenzvergleichen ausgesuchter intronischer und exonischer Abschnitte wurde eine Karte der Polymorphismen zwischen dem X-Chromosom des BG-*luc60*, *nocte*- und des „y cv v f car“-Stammes erstellt (Tab. 19). Abhängig von den verwendeten Genotypen ist theoretisch im Abstand von 150 bp bis 200 bp ein Sequenzpolymorphismus vorhanden (Berger et al., 2001; Hoskins et al., 2001). Zwischen den X-Chromosomen von *nocte* und y cv v f car konnte eine Karte mit einer Auflösung von bis zu einem SNP pro 10-50 kb angefertigt werden, mit deren Hilfe die rekombinanten X-Chromosomen analysiert wurden (Tab. 19; Abb. 66). Der Randbereich des Chromosoms als mögliche Position konnte somit verworfen, und die Mutation auf den Bereich zwischen CG15245 (9A2) und CG2124 (9D3) kartiert werden (Abb. 66). Für diesen Bereich existiert eine Duplikation des X-chromosomalen Abschnitts 9A2;10C2 auf dem II. Chromosom, *Dp(1;2)v<sup>+</sup>75d*, die den *nocte*-Phänotyp rettet (Abb. 65) und somit das Ergebnis der SNP-Kartierung bestätigt.



**Abb. 65. Rettung des *nocte*-Phänotyps mit der *Dp(1;2)v<sup>+</sup>75d* in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau. LL).** Wird eine Duplikation des wildtypischen Chromosomenabschnitts von 9A2;10C2 in den *nocte*-Hintergrund transferriert, kann der Defekt in der Temperatursynchronisation gerettet werden.

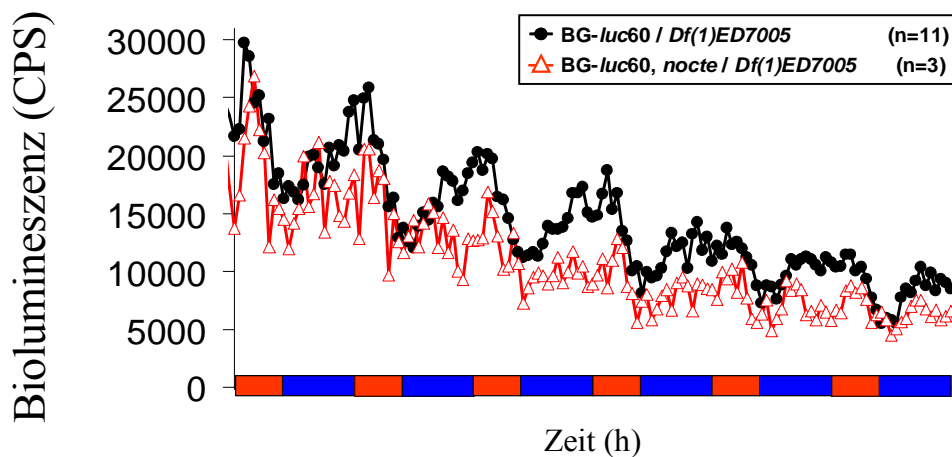
SNP	Map	Flankierende Sequenz – SNP (Position)
CG13758	3A4	CACAAGAAGCTTTATGACTT- C( <i>nocte</i> )/T(MM) -TGCCGGCTTATTAGGAG (201s) AGCTCCGCCAGTTGAA- C( <i>nocte</i> )/A(MM) -AGGGTTTAAACACCAGCCAAT (551s)
dx	6B1	TCAGGAATTTTTTTAT- GGGG( <i>nocte</i> )/CGGT(MM) -AGAATATATAGGGAATC (80s) GATGTGTCCATAGGTG- T( <i>nocte</i> )/G(MM) -TTAAATAGTACATATTAGCCAAA (178s) TCTGCATTTAAATTTTTTA- G( <i>nocte</i> )/A(MM) -CTAAATCAAATTAATTTTTT (302s)
CG12151	7B7	GCTACTTTTAGAAACCACAAATCTAT-A( <i>nocte</i> )/G(MM)-CATTACATCC (178s) AAGAATTAAGTATTAA-A( <i>nocte</i> )/T(MM)-AACT-T( <i>nocte</i> )/A(MM)-TTACCATGGG (485s)
CG15245	9A2	GTAGACCGCAGCAGACAATA- G( <i>nocte</i> ) / A(MM) - GTATAAGTATAGGTATATG (80s)
CG12645	9B2	ATCCTAAGCCCGCAACCCAAA- C( <i>nocte</i> ) / T(MM) -TGGGTAGCCAGGCGATGG (130s) TTTCGATTTACATACCTC- TATCTATCTATC...( <i>nocte</i> ) / GAACCTTGATATACT (MM) (445s)
CG2222	9B14	CAGGGTATAATTACTCAA- AGTT( <i>nocte</i> )/ TGTG(MM)- GTAAATGATGTGGAACATG (350s) ACTCAGCTTAGT- A,DEL ( <i>nocte</i> )/ TCTGTTAGATTGTATT(MM) -ATAGTAATTCGATA (390s)
RabX2	9C1	ATGCGG- g(MM) / DEL ( <i>nocte</i> ) - TGTCTTCTCCATAACTTGGTCAAAAAA (369rev) TTTGAATACAG- T(MM) / G ( <i>nocte</i> )- TCGATAGGGAATTTTATTACGAATTC (580rev)
CG2124	9D3	AAATGAAAACCTTTCTCAT- A( <i>nocte</i> ) / C (MM) - CTTCGAACAGTACGGTCAAG (150s) GTGTATTTCTTCTTAGACTGCG- T( <i>nocte</i> ) / G(MM) - GTTGTATTATTATAA (311s)
Hop	10B5	GTAATCGGTGA- G( <i>nocte</i> )/T(MM) - CTTTAGATCCCAA (28s) GGCTAAATTAAC- A( <i>nocte</i> )/ T(MM) - AGCAAGAAATTTAAAA (430s)
CG15194	10B14	GTAGCGAGGT-G(M7)/T( <i>ycv</i> v)-GGGGGCA-A( <i>nocte</i> )/C(MM)-GTGTGTGCC (18/22s) CCGTTTCGGTGCCCA- G( <i>nocte</i> ) / A(MM) - CAGACCGAACATAACTAGGCAAATAT (51s) CAATCGAGCAGGGGA-T( <i>nocte</i> )/A(MM)-TTAA-CTTGG( <i>nocte</i> )/TTGGG(MM)-CCTAAA (280s) GCCAACAAATTTAAGTCAC- TATAT( <i>nocte</i> ) / TTT(MM)- CCTTCCTTCAAATAAAT (355s)
FucT6	10D6	ATTTTAAATACCGC- C( <i>nocte</i> ) / A(MM) -ATAGCTGTGATAT (185s) TTCCTGAAACATTGTA- C( <i>nocte</i> ) / G (MM) -CATAGCAGTTACAC (300s)
CG15729	11B1	TGCTGATGGACTATTGCT- C ( <i>nocte</i> ) / A (MM) - AATTGGGTCCCTGCTCGGGC (145s)
CG11085	11B4	CGCAGGTGAAAAC- C( <i>nocte</i> )/T(MM)-TGGTACCAGAATCGCCGG (51s) GTCAGAACTGCGGTGGT-Del.( <i>nocte</i> )/AGAGTAT(MM) - TCTTAAAGAATCAAATATCTT (205s)
garnet	12B4	GAGGAAGGCCCAAGGA- C( <i>nocte</i> ) / T(MM) - TCTCGTTAGCATTTAAATC (95s) GATAAAAACCATTT-GGCAT( <i>nocte</i> )/ AGCTT (MM)- ATGCACTAGATTTTACAG (200s) CTTTTGATGG-GCACACCACCACACCCAGCGGT( <i>nocte</i> ) /CATCTTTGGATCGCTTGTTAGTG(MM)-GTGGGC (300s)
CG5321	12F2	GAATCCTGAATCCTG- AATCCTG( <i>nocte</i> )/DEL (MM) - GCATCTTGGCATCCAGCAG (224s)
CG9030	13A1	CGCTGCTTGCG - G( <i>nocte</i> ) / A(MM) - GGGTGGGTAG (15)
CG15029	13B1	ATCGCAGGGTGTCT-T( <i>nocte</i> )/ C(MM) - TAACCCGAGTTTTC (209s)
CG9245	13E8	ATGGATGACGTGGG- A( <i>nocte</i> ) / G(MM) - CTGAAGAATAGAT (300-310rev)
CG32551	17B1	TTTAGGTACATTTCCAA- G( <i>nocte</i> ) / A(MM) -CGGG- TATTT ( <i>nocte</i> ) / CTTTG(MM) - ATAATTATTTT (150s) TTTTTTGAATACTACAAA- A( <i>nocte</i> ) / G(MM) -TGACAATACTAAGT (175s)
CG12531	18E3	GATTGCAAGTTCCTTTC-T( <i>nocte</i> )/C(MM)-TTTA-T( <i>nocte</i> )/G(MM)-TAAGACATTATT (230s)
CG1494	19F3	TCCGTCGAGGTATTCAA- G ( <i>nocte</i> ) / A (MM) - TGCAATAGCATCCCC (107s) GCCGAAACCGGTGCT- T( <i>nocte</i> ) / C (MM) -AGAGATCTGGACTTCAC (530s)
CG17598	20C1	ATCTGTCAGTATGAGCG- TATT( <i>nocte</i> ) / AATG (MM)- AGTCTTAATCTGCCG- T( <i>nocte</i> ) / C(MM) -CTA (550s)

**Tab. 19. Karte der Sequenzpolymorphismen zwischen dem X-Chromosom von *nocte* und des Multimarkerstamms *y cv v f car* (MM). Aufgelistet sind Gene, deren Intron- oder Exonbereiche einen Polymorphismus (SNP) aufweisen. Zusätzlich ist deren zytologische Position (Map), der Sequenzpolymorphismus und dessen ungefähre Basenposition in dem *sense* (s) bzw. *reverse* (rev) Fragment der jeweiligen Sequenzreaktion angegeben.**

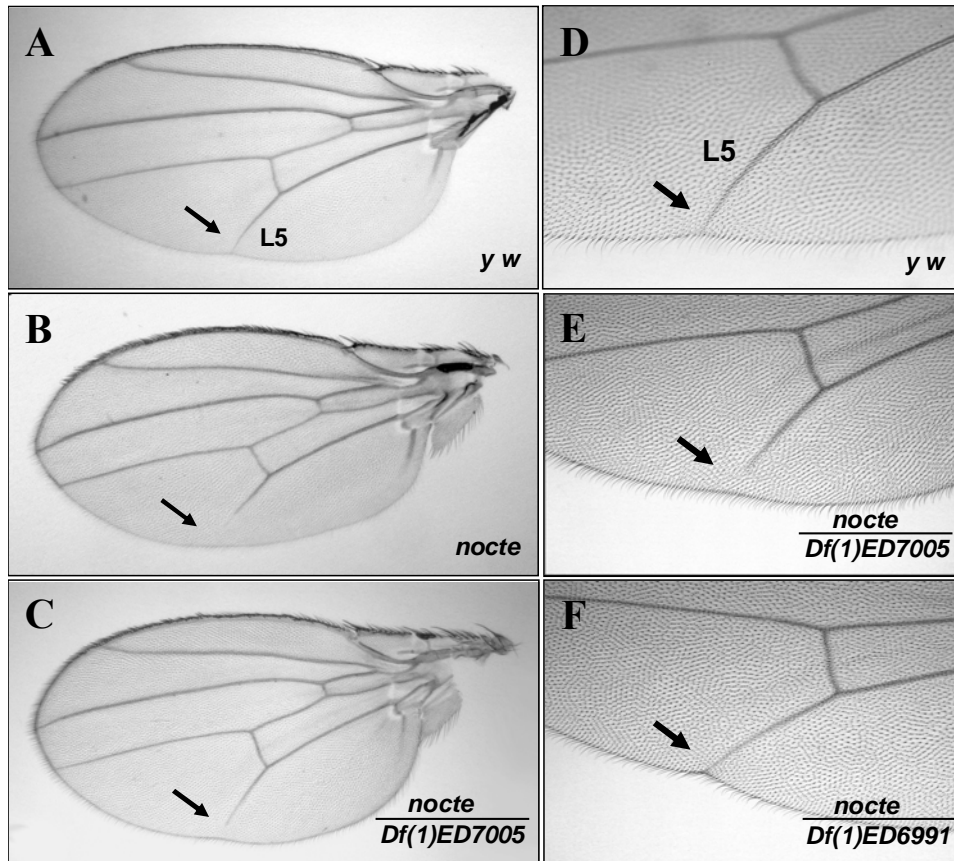
Marker	zytol. Pos.	nocte	y cv v f car	(+) #50	(+) #17	(+) #11	(+) #6	(+) #23	(+) #24	(+) #48	(+) #X1	(+) #RS2	(+) #RS1	(Mut) #37	(+) #40	(+) #2	(+) #41	(+) #25	(+) #29	(+) #7	(+) #10	(+) #15	(+) #27	(+) #13	(+) #16	(+) #35	(+) #1	(+) #19
CG17598	20B1	nocte	car																									
CG1494	19F3																											
CG12531	18E3																											
car	18D1	car <sup>+</sup>	car																									
CG32551	17B1																											
f	15F7	f <sup>+</sup>	f																									
CG9245	13E8																											
CG15029	13B1																											
CG9030	13A1																											
CG5321	12F2																											
CG11085	11B4																											
CG15729	11B4																											
FucT6	10D6																											
CG15194	10B14																											
hop	10B5																											
v	9F11	v <sup>+</sup>	v																									
CG2124	9D3																											
CG2222	9B14																											
CG12645	9B2																											
CG15245	9A2																											
CG12151	7B7																											
cv	5A13	cv <sup>+</sup>	cv																									
w	3C1	w <sup>+</sup>	w																									
CG13758	3A4																											
y	1A5	y	y																									
Marker	zytol. Pos.	nocte	y cv v f car	(+) #50	(+) #17	(+) #11	(+) #6	(+) #23	(+) #24	(+) #48	(+) #X1	(+) #RS2	(+) #RS1	(Mut) #37	(+) #40	(+) #2	(+) #41	(+) #25	(+) #29	(+) #7	(+) #10	(+) #15	(+) #27	(+) #13	(+) #16	(+) #35	(+) #1	(+) #19

**Abb. 66. Analyse der Rekombinanten bzgl. Bruchpunkte mittels visueller und molekularer Marker.** Nahezu alle erzeugten rekombinanten Linien wurden auf den Synchronisationsdefekt der Biolumineszenz getestet (+/Mut), und deren visuelle und molekulare Marker ermittelt. Rote und blaue Felder geben die chromosomale Herkunft des Markers an (rot=nocte; blau=Multimarker), wobei die kräftigen Farben die experimentell bestimmten Marker repräsentieren, und die hellen Farben jene Marker angeben, die aus den umliegenden abgeleitet werden können. Die gelben Felder zeigen an, dass der jeweilige Marker weder bestimmt, noch erschlossen werden kann.

Für die weitere Kartierung wurde auf molekular-definierte Defizienzen (*Df(1)ED6991*, *Df(1)ED7005*, *Df(1)ED7010*, *Df(1)ED429*, *Df(1)ED7042*) in diesem Bereich zurückgegriffen (Tab. 20). Die Transheterozygoten (♀) aus *Df(1)ED7005* über dem „BG-*luc60, nocte*“-Chromosom zeigen den *nocte* Phänotyp (Abb. 67). Zudem sind sie semilethal und weisen einen Defekt in der L5-Flügelvene auf (Abb. 68; Tab. 20). Diese Verkürzung der L5-Flügelvene kann gelegentlich auch in *nocte*-Fliegen beobachtet werden. Das Auftreten scheint abhängig von der Populationsdichte einer Fliegenkultur zu sein, da in den Gläsern, worin nur wenige *nocte*-Männchen schlüpfen, keines diesen Defekt aufweist. Die beiden anderen Defizienzen, die den Rest des Intervalls abdecken (*Df(1)ED6991*, *Df(1)ED7010*), retten den *nocte*-Phänotyp (Abb. 68; Abb 70; Tab. 20), die Semilethalität und den Flügelvenendefekt. Somit konnte *nocte* auf den Bereich zwischen CG15309 (9B4) und CG15296 (9D3) kartiert werden, der 35 Gene beinhaltet (Abb. 69).



**Abb. 67. Biolumineszenzrhythmen von *Df(1)ED7005* über dem *nocte* oder Wildtyp-Chromosom in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Die *Df(1)ED7005* komplementiert die *nocte*-Mutation nicht und zeigt den gleichen Synchronisationsdefekt in Temperaturzyklen, so wie die *nocte*-Männchen. Aufgrund der Semilethalität konnten nur sehr wenig Transheterozygote (♀) getestet werden. Die Messung der Biolumineszenzrhythmen von Weibchen ist allgemein problematisch, da diese in den Ovarien eine arhythmische *period* Expression aufweisen (Hardin et al., 1994).



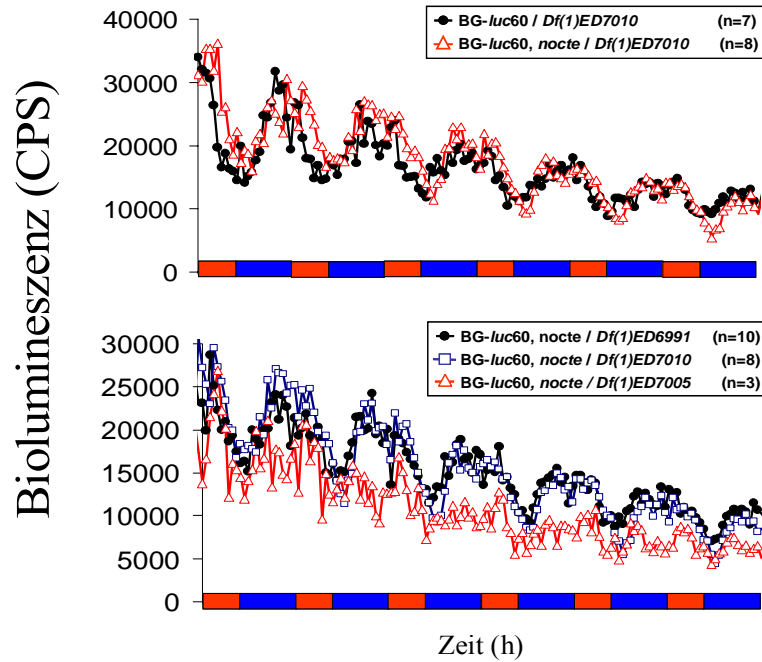
**Abb 68. Verkürzung der L5-Flügelvene bei *nocte* Fliegen.**

Je nach Populationsdichte kann bei 0% bis 20% der *nocte* Fliegen ein teilweise einseitiger Defekt in der Ausbildung der L5 Flügelvene vorkommen. Dieser Defekt tritt auch bei den Transheterozygoten aus *nocte* und *Df(1)ED7005* auf, nicht aber mit *Df(1)ED6991*.

Die Transheterozygoten aus der Defizienz *Df(1)c52,flw<sup>c52</sup>* über *nocte* sind in Bezug auf Semiletalität, Flügeldefekt sowie Lokomotorrhythmik wildtypisch (Tab. 20; Abb. 71). Der deletierte Bereich dieser Defizienz ist mit 8E3-5;9C1 jedoch nur ungenau angegeben. Da diese Defizienz Mutationen im Gen *flw* (9B14-9C1) nicht komplementiert, beschränkt sich das mutante Intervall somit auf den Bereich, der die Gene CG32683 (9C1) bis CG32680 (9D2) umfasst. Parallel zu dem Komplementationstest wurde die kodierende Sequenz ausgewählter Gene im Bereich von *l(1)G0230* (9B4) bis CG32680 (9D2) auf genomischer DNA-Basis im *nocte*- und Kontrollstamm (BG-*luc60*) sequenziert (Tab. 21).

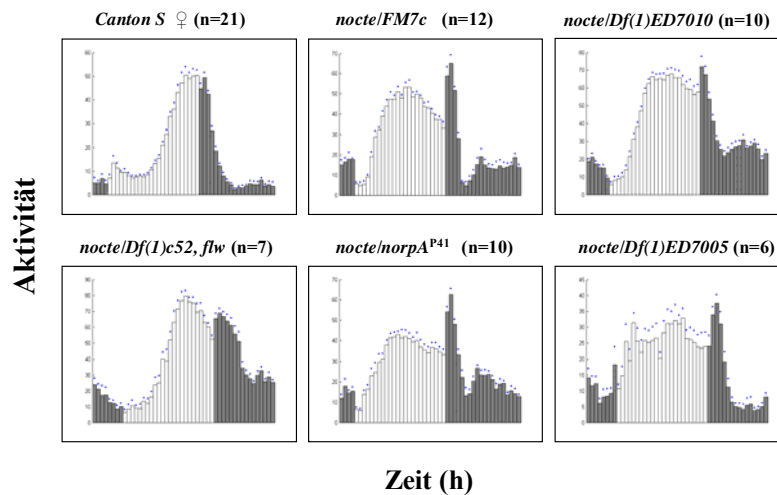
Dargestellt sind die Gene und Defizienzen (rechts daneben) für den Bereich von 8D12 bis 10A6. Mit Ausnahme der *Df(1)ED7005* (rechts komplementieren alle anderen Defizienzen (grün) den *nocte* Phänotyp. Dadurch wird die *nocte*-Mutation auf den Bereich innerhalb von CG15309 (9B4) und CG15296 (9D3) kartiert, was in etwa mit den Ergebnissen der SNPs (CG12645 und CG2124) übereinstimmt. Die Gene in diesem Bereich sind schwarz, ausgeschlossene Gene grau, SNPs, sowie visuelle Marker (*vermillion*) grün dargestellt.





**Abb. 70. Biolumineszenzrhythmen molekularer Defizienzen über dem *nocte*-Chromosom in Temperaturzyklen (10:14h 25°C:17°C=rot:blau, LL).** Von den drei molekularen Defizienzen, die das in Frage kommende Intervall abdecken weist nur die *Df(1)ED7005* über dem *nocte*-Chromosom den Synchronisationsdefekt auf, die beiden anderen Defizienzen, *Df(1)ED6991* und *Df(1)ED7010* komplementieren die *nocte* Mutation.

#### **LL und 12:12 h 25°:18°C**



**Abb. 71. Durchschnittstage der Lokomotorrhythmik verschiedener Fliegenweibchen in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C, LL).** Wildtypische Fliegenweibchen (CantonS) zeigen in Temperaturzyklen ein rhythmisches Lokomotorverhalten, was aus der Antizipation des Warm-Kalt-Wechsels ersichtlich ist (vgl. Abb. 58 B). Ein ähnliches Verhaltensmuster kann auch bei den Fliegen beobachtet werden, die sowohl das *nocte* X- Chromosom, als auch das *FM7c*- bzw das *norpA*<sup>P41</sup>-Chromosom tragen. Die Transheterozygoten aus *nocte* in Verbindung mit einem defizientem X-Chromosom lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Während die *nocte/Df(1)ED7005* Weibchen den *nocte* Phänotyp aufzeigen, komplementieren *Df(1)c52, flw* und *Df(1)ED7010* die Mutation. (hellgrau=25°C, dunkelgrau=18°C).

Defizienz/Dp	Bereich	Vitalität	Flügelvene
<i>Df(1)ED6991</i>	8F9;9B4	+	+
<i>Df(1)ED7005</i>	9B1;9D3	semiletal	L5 kurz
<i>Df(1)ED7010</i>	9D3;9D4	+	+
<i>Df(1)ED429</i>	9D3;9D3	+	+
<i>Df(1)ED7042</i>	9D3;9F2	+	+
<i>Df(1)c52, flw</i>	8E;9C-D	+	+
<i>Df(1)RJ7</i>	9B2;9E3-4	semiletal	L5 kurz
<i>Df(1)v-L15</i>	9B1-2;10A1-2	semiletal	L5 kurz
<i>Dp(1;2)v<sup>+</sup>75d</i>	9A2;10C2	+	+

**Tab. 20. Übersicht von Vitalität und Flügelvenendefekt der Defizienzen und Duplikationen im *nocte*-Hintergrund.** Aufgelistet sind die verwendeten Defizienzen und die Duplikation, deren Bereich, sowie die Präsenz von Semiletalität und Flügeldefekt, sobald diese in den *nocte*-Hintergrund gebracht werden. (+) repräsentiert wildtypisch.

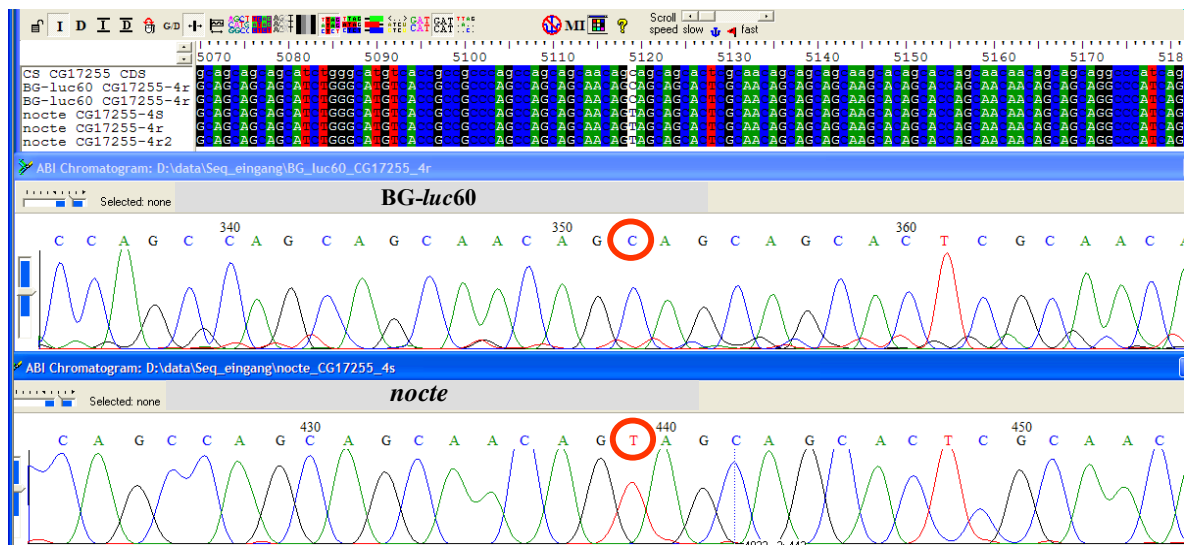
Zusätzlich wurden Defizienzen, Mutanten und *P*-Insertionen, die diese Kandidatengene betreffen, über das *nocte*-Chromosom gekreuzt und die Transheterozygoten auf Semiletalität, Flügeldefekt und Rhythmik hin überprüft. Diese genetischen Varianten waren alle vital über dem *nocte*-Chromosom. Dagegen zeigten 5 % einer semiletalen *P-lacW*-Insertionslinie ( $w^{67c23} P\{lacW\}G0097, l(1)G0097^{G0097}$ ) über *nocte* den L5-Flügelvenendefekt. Dieser Stamm weist aber 3 *P*-Insertionen auf: eine im ersten Intron, 1087 bp vor dem Translationsstart (ATG) des annotierten Gens CG17255 (bestimmt durch die 5' flankierende Sequenz) und jeweils eine in 4D-E und 12F, ermittelt durch *in-situ* Hybridisierung.

Dieses Gen (CG17255) liegt genau inmitten des kartierten Bereichs und stellt somit einen Kandidaten für die Position der *nocte* Mutation dar. Zur Klärung wurde deshalb die Sequenz von CG17255 (9954 bp, 2307 AS) im *nocte*- und dem Ausgangsstamm miteinander verglichen. Dabei konnte in der kodierenden Region eine Transition (C → T) der Base 5119 auf dem *nocte* Chromosom identifiziert werden (Abb. 72), die zudem genau den EMS induzierten Mutationen entspricht (siehe 2.2.1). Dies hat zur Folge, dass die Aminosäure 1707-Glutamin (Gln, Q) in ein Stopp-Codon umgewandelt wird (CAG→TAG) und dem 2307 AS großen Protein 601 Aminosäuren am C-Terminus fehlen (Abb. 73).

Gen	Position	sequenziert	Austausch
<i>l(1)G0230</i>	9B4-9B4	-	
CG2962	9B4-9B4	-	
CG15308	9B4-9B4	ORF	-
CG2967	9B4-9B4	-	
CG32689	9B4-9B4	ORF	-
<i>Ipod</i>	9B4-9B4	-	
<i>Hk</i>	9B5-9B5	-	
CG12643	9B5-9B5	ORF	-
<i>alpha-Man-I</i>	9B5-9B7	-	
CG32682	9B6-9B6	ORF	-
CG2909	9B7-9B7	-	
<i>Gip</i>	9B7-9B7	ORF	-
CG15306	9B7-9B7	-	
CG15307	9B7-9B7	ORF	-
CG12641	9B10-9B10	ORF	-
<i>l(1)G0289</i>	9B11-9B12	-	
CG32679	9B12-9B12	-	
CG17841	9B12-9B14	-	
CG32686	9B12-9B12	-	
CG2898	9B12-9B12	-	
CG32681	9B12-9B13	-	
CG2222	9B14-9B14	ORF	-
<i>flw</i>	9B14-9C1	ORF	-
CG32683	9C1-9C4	ORF	-
<i>RabX2</i>	9C1-9C1	ORF	-
CG12640	9C2-9C2	ORF	-
<i>Or9a</i>	9C4-9C4	ORF	-
<i>Neb-cGP</i>	9C5-9C5	ORF	-
CG17255	9C6-9D1	ORF	C→T
CG2889	9D1-9D1	-	
CG2887	9D1-9D1	ORF	-
PPP4R2r	9D2-9D2	ORF	-
CG32687	9D2-9D2	ORF	-
<i>spri</i>	9D2-9D3	-	
CG32680	9D2-9D2	-	

**Tab. 21. Sequenzierung ausgewählter Gene im Bereich von 9B4 bis 9D2.**

Von ausgewählten Genen im Bereich von 9B4 bis 9D2 fand ein Vergleich der Sequenz im *nocte* Hintergrund mit der des Kontrollstamms und der publizierten Wildtyp-Sequenz statt. Dabei konnte im Gen CG17255 ein Basenaustausch (C→T) identifiziert werden (Abb. 72).



**Abb. 72. Screenshot: Vergleich der CG17255-Sequenz im BG-luc60- und nocte - Hintergrund.** Die Chromatogramme der CG17255 Sequenz von *nocte* (unten) und dem Kontrollstamm (oben) zeigen eindeutig, dass der *nocte*-Stamm einen G/C→A/T-Basenaustausch an der Position 5119 in der kodierenden Sequenz des Gens CG17255 aufweist (Kreis). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgten jeweils zwei unabhängige DNA-Präparationen, die wiederum je zweimal sequenziert wurden.

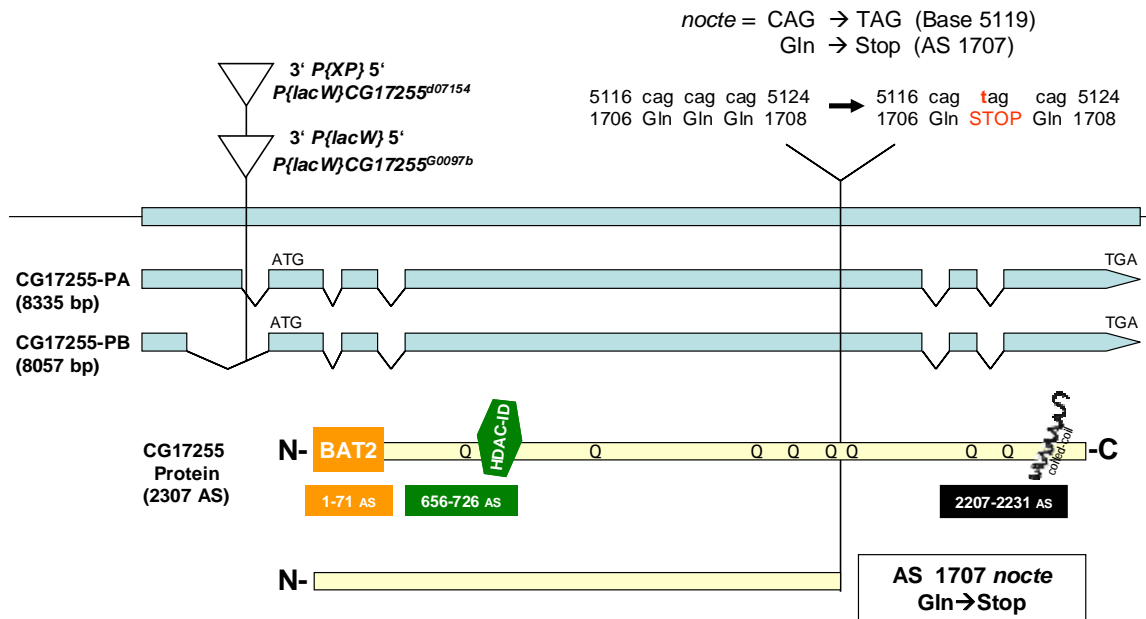
Somit konnte das Gen CG17255 (*nocte*) als Auslöser für den Flügelvenendefekt identifiziert werden, der bei den Transheterozygoten aus *nocte* und der *P-lacW*-Insertionslinie beobachtet werden kann. Es ist nicht bekannt, welche der drei Insertionen des Stammes *l(1)G0097* für die Semiletalität verantwortlich ist. Da die Transheterozygoten aus *nocte* und *l(1)G0097* aber vital sind, lässt dies vermuten, dass das Allel CG17255<sup>G0097b</sup> ein Hypomorph ist.

Von den 35 Kandidatengen wurden neben CG17255 noch 17 weitere in diesem Bereich sequenziert, bei denen jedoch keine Sequenzunterschiede zwischen dem *nocte*- und dem Ausgangsstamm festgestellt werden konnten (Tab. 21).

## Datenbankanalyse des Gens CG17255

Das annotierte Gen CG17255 (X-Chromosom: 9C6-9D1) umfasst 9954 Basen, woran 2 Transkripte (CG17255-PA mit 8335 bp und CG17255-B mit 8057 bp) abgelesen werden. Beide kodieren für das gleiche, 2307 AA große Protein (235 kDa). Aus den öffentlichen *Drosophila*-Stammsammlungen gehen 2 potentielle Mutanten für CG17255 hervor (Abb. 73): eine *P-lacW*-Insertion in Stamm *l(1)G0097*, sowie *P{XP}CG17255<sup>d07154</sup>*. Beide *P*-

Elemente sind im gleichen Ort inseriert, und zwar im ersten Intron, 1087 bp vor dem Translationsstart (ATG).



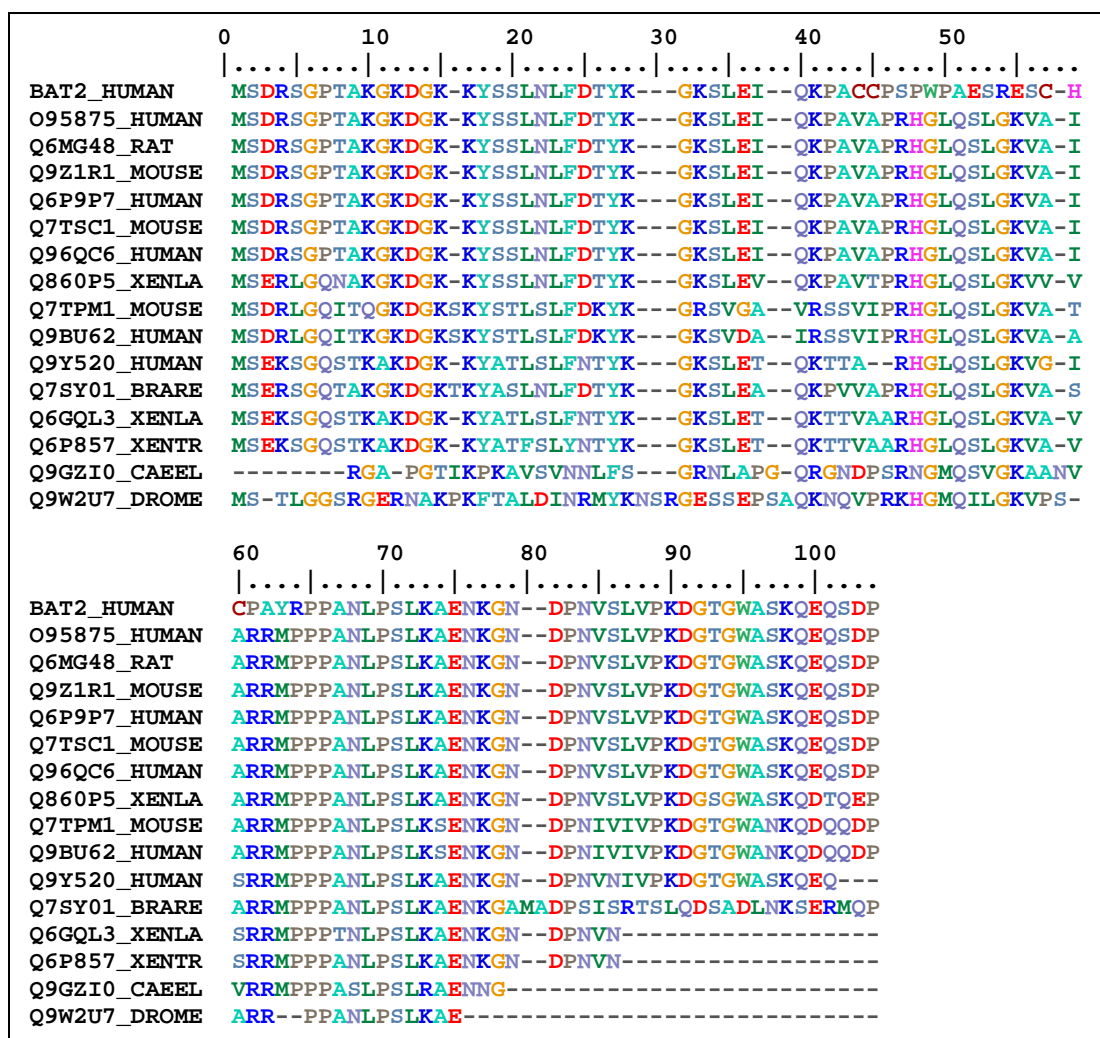
**Abb. 73. Analyse des Gens CG17255: P-Insertionen, Transkripte und Proteindomänen.**

Das Gen CG17255 kodiert für zwei Transkripte (PA und PB), die beide das gleiche Produkt liefern. Dieses Protein (2307 AS) besitzt eine N-terminale BAT2-Domäne, eine Histon-Deacetylase-Interaktionsdomäne und einen kurzen *coiled-coil*-Bereich am C-Terminus. Zudem fällt auf, dass dieses Protein viele Poly-Glutamin-Regionen in sich birgt (Q). Die *nocte*-Mutation (Basenaustausch C→T) fügt ein Stopp-Codon ein, so dass die C-terminalen 601 AS dieses Proteins fehlen. Dieser Abbruch befindet sich genau inmitten des größten Poly-Q-Bereiches. Es sind zwei P-Insertionen erhältlich, die beide im ersten Intron 1087 bp vor dem Translationsstart (ATG) inseriert sind.

Über die molekulare Funktion des Proteins herrscht bis dato Unklarheit. Eine Literaturrecherche brachte ans Licht, dass Orthologe in *Anopheles atroparvus* und *Anopheles gambiae* existieren (Grushko et al., 2004). Zudem lieferte das Protein einen positiven Treffer in Screens, bei denen mittels RNA-Interferenz in Zellkultur nach möglichen Komponente des Wnt-Signalwegs (*wingless*; DasGupta et al., 2005) sowie des Imd-Signalwegs (*immune deficiency*; Kleino et al., 2005) gesucht wurde. In beiden Untersuchungen ist die genaue Funktion jedoch nicht näher untersucht worden.

Mithilfe verschiedener Datenbanken und Algorithmen wurde nach weiteren Verwandtschaften gesucht (siehe 2.7). Ein Abgleich der Proteinsequenz mit der SMART-Datenbank von Proteinen mit ähnlicher Domänenorganisation (<http://Smart.embl-heidelberg.de>) liefert vorwiegend Übereinstimmungen (ca. 24 %) mit hypothetischen Proteinen, was zeigt, dass dieses Protein auch in anderen Organismen existiert: *Anopheles gambia* (Q7Q7U0), *Apis mellifera* (CG17255-ähnliches, hypothetisches Protein), *C. briggsae* (Q614K6) und *C. elegans* (Q9GZI0).

Daneben wurden auch N-terminale Sequenzübereinstimmungen mit dem prolinreichen humanen BAT2-Protein (*HLA-B associated transcript 2*) aufgezeigt. Ein erneuter Datenbankabgleich mit der N-terminalen Sequenz des CG17255-Proteins ergab viele Übereinstimmungen zu BAT2-Proteinen aus verschiedenen Spezies, weshalb diese Bereiche übereinander gelegt wurden. Das Sequenzalignment belegt deutlich die Existenz dieser konservierten BAT2-Domäne in den N-terminalen 71 Aminosäuren (Abb. 74). Die BAT2-Domäne ist aber nicht sehr gut konserviert, was einerseits als Folge einer Umstrukturierung des Gens im Laufe der Evolution angesehen werden kann und andererseits zudem bedeuten kann, dass diese nicht essentiell für die Funktion des Proteins ist.



**Abb. 74. Sequenzalignment des humanen BAT2-Proteins mit verwandten Proteinen aus verschiedenen Organismen.** Die Proteinsequenz von BAT2-Domänen aus verschiedenen Organismen wurde zur Deckung gebracht und zeigt die Verwandtschaft zu dem humanen BAT2-Referenzprotein (*HLA-B associated transcript 2*, erste Zeile) auf. Eingetragen sind jeweils die Protein-Sequenzidentifizierung in der UniProt-Datenbank ([www.expasy.org/uniprot/](http://www.expasy.org/uniprot/)), sowie der organismische Ursprung. Das CG17255-Protein befindet sich in der untersten Zeile (Q9W2U7\_DROME).

Die Identifizierung einer HDAC-Interaktionsdomäne (HDAC-ID) in dem Bereich von 656 bis 726 AS lässt jedoch vermuten, dass das *nocte*-Protein an der Regulation von Histon-Deacetylasen (HDAC) beteiligt ist. Histon-Deacetylasen sind Enzyme, die Acetylgruppen von dem  $\epsilon$ -N-Acetyl-Lysin-Resten eines Histons entfernen, wodurch die positive Ladung der Aminosäure wiederhergestellt wird. Dies erhöht die Affinität des Histons zu dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA, wodurch die Transkription reprimiert wird. Regulatoren der HDAC bewirken dadurch eine Aktivierung oder Hemmung der Transkription (Lewin, 2000). Interessanterweise besitzt das CLOCK-Protein der Säuger eine Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität (HAT), die zudem für die Rhythmizität und die Aktivierung von Uhrgenen benötigt wird (Doi et al., 2006). Dem CLK-Protein von *Drosophila* konnte jedoch bisher keine HAT-Aktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus dem Säuger lassen jedoch vermuten, dass bei der Transkription der molekularen Uhrkomponenten in *Drosophila* höchstwahrscheinlich eine Histon-Acetyl-Transferase beteiligt ist. Ähnlich dem *Drosophila* CLOCK-Protein weist das CG17255-Protein aber Glutamin-reiche Regionen (poly-Q) auf (Allada et al., 1998), die eine Klasse von transkriptionalen Aktivierungsdomänen repräsentieren (Courey and Tjian, 1988). N-terminale poly-Glutamin-Repeats tragen jedoch ebenfalls zur Ausbildung verschiedener neurodegenerativer Krankheiten bei, da sie die Löslichkeit von Proteinen vermindern und somit Proteinablagerungen und neuronalen Zellverlust verursachen (zusammengefasst bei Blien and Bonini, 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass Proteine mittels den Poly-Glutamin-Domänen mit Histon-Deacetylasen interagieren und HDAC-Inhibitoren zur einer Verzögerung polyQ-basierender Neurodegenerationskrankheiten führen (Steffan et al., 2001). Über eine mögliche Beteiligung von CG17255 an neurodegenerativen Krankheiten kann jedoch nichts ausgesagt werden. Dagegen scheinen die HDAC-Interaktionsdomänen und der polyQ-Bereich aber auf eine Funktion in der Transkriptionsregulation hinzudeuten. Eine Analyse durch ELM (<http://elm.eu.org>) konnte mehrere Bindestellen für Klasse-III-PDZ-Domänen identifizieren (Tab. 22). PDZ-Domänen sind ca. 90 AS groß und binden vorwiegend an bestimmte Erkennungssequenzen am C-terminalen Ende, sowie an  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Sie sind wichtig für die Ausbildung von supramolekularen Proteinkomplexen an bestimmten subzellulären Positionen (Sheng and Sala, 2001). So interagieren z.B. die lichtsensitiven TRP-Kanäle (*transient receptor potential*; siehe 1.13) über eine PDZ-III-Domäne mit INAD (Huber et al., 1996; Shieh and Zhu, 1996). Identifiziert wurden auch mehrere SH2- und SH3-Bindestellen, die zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen in der intrazellulären Signalübertragung dienen. Zudem

besitzt das CG17255-Protein auch mehrere Phosphorylierungsstellen von CK1 und CK2. Diese zwei Kinasen sind auch an der Regulation der molekularen Oszillationen der inneren Uhr beteiligt (Akten et al., 2003; Lin et al., 2005; Lin et al., 2002).

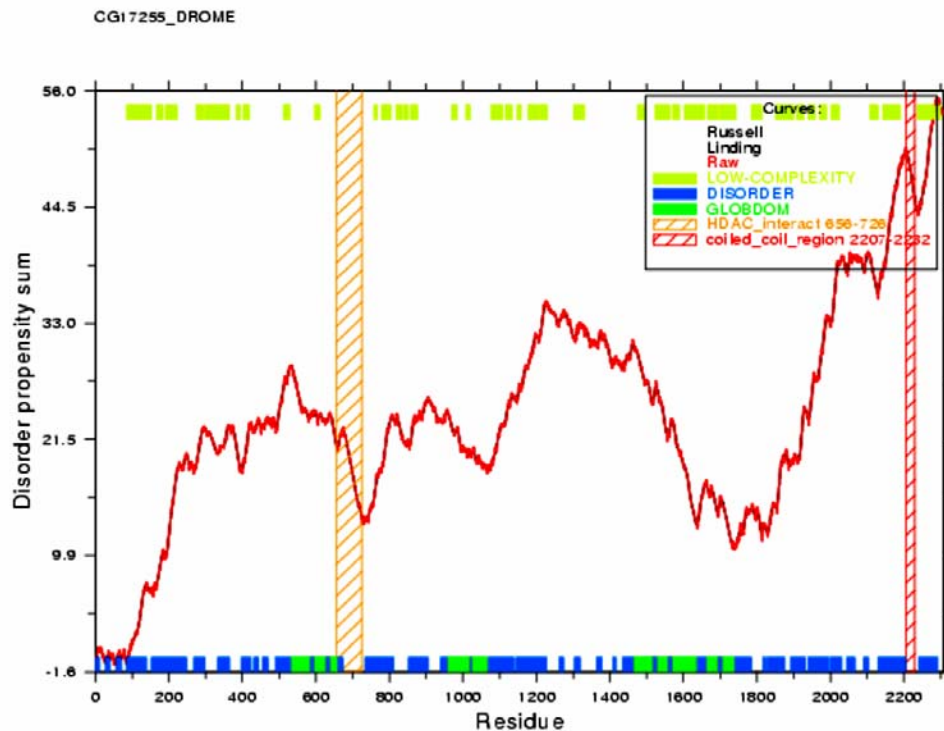
<b>Bindestellen</b>	<b>Position</b>
PDZ-Domänen Klasse-III	354-357, 534-537, 552-555, 555-558, 570-573, 637-640, 948-951, 949-952, 1140-1143, 1296-1299, 1349-1352, 1422-1425, 1467-1470
SH2-Domäne (GRB2-like, Src Homology 2)	26-29, 298-301, 466-469, <u>1799-1802, 1847-1850, 1936-1939, 1966-1969, 2290-2293</u>
SH3-Domäne Klasse-I	1011-1017
SH3-Domäne Klasse-II	1460-1465
SH3-Domäne Klasse-I (nicht kanonisch)	223-229, 419-425, 459-465, 490-496, 510-516, 534-540, 1305-1311, 1327-1333, 1402-1408, 1457-1463, 1553-1559, <u>1747-1753, 1750-1756, 1836-1842, 1942-1948, 1968-1974, 1971-1977, 2013-2019, 2014-2020, 2092-2098, 2200-2206, 2255-2261, 2282-2288</u>
<b>Substratmotive</b>	<b>Position</b>
CK I Phosphorylierung	34-40, 116-122, 118-124, 119-125, 179-185, 193-199, 225-231, 228-234, 233-239, 443-449, 455-461, 608-614, 609-615, 618-624, 620-626, 734-740, 775-781, 778-784, 781-787, 797-803, 798-804, 842-848, 935-941, 943-949, 955-961, 977-983, 980-986, 983-989, 1003-1009, 1076-1082, 1095-1101, 1099-1105, 1102-1108, 1118-1124, 1137-1143, 1170-1176, 1219-1225, 1222-1228, 1371-1377, 1403-1409, 1412-1418, 1416-1422, 1424-1430, 1427-1433, 1430-1436, 1571-1577, 1654-1660, <u>1784-1790, 1848-1854, 1876-1882, 1888-1894, 1890-1896, 1893-1899, 1905-1911, 1916-1922, 1964-1970, 2022-2028, 2077-2083, 2093-2099</u>
CK II Phosphorylierung	4-10, 26-32, 234-240, 579-585, 583-589, 584-590, 752-758, 903-909, 930-936, 955-961, 960-966, 998-1004, 1039-1045, 1048-1054, 1129-1135, 1156-1162, 1238-1244

**Tab. 22. Auflistung verschiedener Bindestellen und Substratmotive innerhalb des CG17255-Proteins.** Die ELM-Analyse hinsichtlich verschiedener Protein-Motive liefert für CG17255 eine Vielzahl von Bindestellen zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen, sowie auch diverse CK1- und CK1- Phosphorylierungsstellen. Angegeben ist jeweils deren Position im Protein. Die unterstrichen Positionsangaben repräsentieren dabei solche Motive, welche durch den Translationsabbruch im *nocte*-Hintergrund nicht mehr vorhanden sind.

Abschließend wurde eine Russel-Linding-Analyse bezüglich geordneter und ungeordneter Bereiche durchgeführt (Linding et al., 2003). Während die geordneten Bereiche kompakte globuläre Sekundärstrukturen besitzen, zeichnen sich ungeordnete Bereiche durch eine große Flexibilität und durch das Fehlen regulärer Sekundärstrukturen aus. In diesen liegen oft kurze Motive, welche für die Funktion des Proteins wichtig sind, wie z.B. SH3-Bindestellen. Die Auswertung zeigt, dass sich ca.  $\frac{1}{4}$  des gesamten Proteins in drei globuläre Domänen befindet, wodurch das Protein in vier ungeordnete Bereiche unterteilt werden kann (Abb. 75).



All diese Ergebnisse liefern nur Hinweise, jedoch keine eindeutigen Beweise für eine Funktion des Proteins. Somit bedarf es weiterführender Studien, um eine funktionale Zuordnung dieses Proteins treffen zu können.



**Abb. 75. GlobPlot-Analyse des CG17255 Proteins (nach Russel, Linding).** Die graphische Darstellung der Proteinanalyse zeigt drei globuläre Proteindomänen, die ca.  $\frac{1}{4}$  des gesamten Proteins in Anspruch nehmen. In den restlichen ungeordneten Bereichen befinden sich oft Motive, die für die Funktion des Proteins notwendig sind, wie z.B. eine HDAC-Interaktions-Domäne. (<http://Globplot.embl.de>)

## 4. DISKUSSION UND AUSBLICK

### 4.1 Synchronisation der molekularen Rhythmen mit Temperaturzyklen in Dauerlicht (LL)

In Wildtyp-Fliegen lassen sich rhythmische *per-luc* Biolumineszenzsignale sowohl im Dauerdunkel (DD), als auch im Dauerlicht (LL) mittels Temperaturzyklen induzieren (Abb. 20). Wird durch eine Mutation (*tim*<sup>01</sup>, *Clk*<sup>Jrk</sup>) die molekulare Uhr unterbrochen (fehlende Hauptkomponente), bleibt die Luziferase-Expression konstant (Abb. 20; Abb. 27). Darin liegt ein Beweis dafür, dass für die Biolumineszenzrhythmen adulter Fliegen eine funktionierende, molekulare Uhr notwendig ist, und auch keine temperaturinduzierte Aktivitätssteigerung des Luziferase-Enzyms stattfindet. Letzteres wird zudem durch die Tatsache bestätigt, dass die PER-LUC Rhythmen der Wildtyp-Fliegen ihr Maximum inmitten der Kaltphase besitzen. Somit reflektieren die *per-luc* Biolumineszenzrhythmen die Expression des *period* Gens, was miteinschließt, dass sich die molekularen Oszillationen in konstantem Licht (LL) mittels rhythmischen Temperaturschwankungen synchronisieren lassen. Ein ähnliches Ergebnis liefern die Westernblots: nach 3 Tagen in LL können in Temperaturzyklen robuste Oszillationen beider zentraler Uhrkomponenten PER und TIM in den Fliegenköpfen beobachtet werden (Abb. 54; Glaser and Stanewsky, 2005).

Dies ist erstaunlich, da Dauerlicht (LL) und konstante Temperaturen normalerweise die Arrhythmizität des Lokomotorverhaltens (Konopka, 1989), und der molekularen Oszillationen in den Fliegenköpfen verursachen (Price et al., 1995; Marrus et al., 1996). Auslöser dafür ist die CRY-vermittelte Degradation des TIMLESS Proteins im Licht, was in einer Unterbrechung der molekularen Oszillation mündet (Emery et al., 2000). Jedoch lassen sich die *per-luc* Rhythmen in LL sowohl im *cry*<sup>b</sup> (Funktionsverlustmutante des *cryptochrom*-Gens: Stanewsky et al., 1998), als auch im *cry*<sup>+</sup> Hintergrund mit Temperaturzyklen induzieren (Abb. 47).

Auf welche Weise können aber Temperaturzyklen unter diesen arrhythmischen Bedingungen robuste molekulare Rhythmen induzieren? Der dafür zugrundeliegende Mechanismus ist noch unbekannt. Es könnte aber sein, dass im Dauerlicht entweder die Funktion von CRY durch Temperatur geblockt wird, oder dass aufgrund der Lichtempfindlichkeit CRY kontinuierlich degradiert wird und nicht mehr vorhanden ist (Busza et al., 2004; Emery et al., 1998). Letzteres geschieht jedoch ebenfalls in konstantem Licht in Verbindung mit konstanter Temperatur, weshalb die Inhibierung der CRY-Funktion anzunehmen ist.

Die Beantwortung der oben gestellten Frage gestaltet sich schwieriger, da zudem bis heute die Rolle von *cryptochrom* in der circadianen Uhr von *Drosophila* noch nicht eindeutig geklärt ist. Eine Funktionsverlust-Mutation (*cry<sup>b</sup>*) stoppt die molekularen Oszillationen von PER und TIM in den Photorezeptorzellen und in den Gliazellen (sowie in anderen peripheren Oszillatoren), während die Oszillationen in den Uhrneuronen weiterlaufen (Stanewsky et al., 1998). Neben der Funktion als circadianer Photorezeptor scheint CRY in den peripheren Oszillatoren zumindest in LD-Zyklen einen Bestandteil des Oszillators zu verkörpern und zusammen mit PER als Repressor zu fungieren (Collins et al., 2006; Levine et al., 2001a; Krishnan et al., 2001). So werden die circadianen Rhythmen der Rezeptorantwort auf den Duftstoff Ethylacetat (gemessen durch Elektroantennogramme) durch die *cry<sup>b</sup>*-Mutation in LD, DD und in Temperaturzyklen stark reduziert oder eliminiert (Krishnan et al., 2001). Somit bedarf die Regulation von CRY bezüglich anderer Komponenten der weiteren Untersuchung, um die Aufklärung mechanistischer Zusammenhänge innerhalb der Temperatursynchronisation voranzutreiben.

## 4.2 Interaktion zwischen Licht- und Temperaturinputweg

In LL und Temperaturzyklen verursacht die genetische Ablation des circadianen Photorezeptors (*cry<sup>b</sup>*) im 8.0-*luc*-Hintergrund eine starke Amplitudenerhöhung der Biolumineszenzrhythmen (Abb. 34). Dieser Effekt lässt sich entweder auf die Repressorfunktion von CRY zurückführen (Collins et al., 2006; Levine et al. 2002a; Ivanchenko et al., 2001), oder auf die Ablation des Lichtinputwegs (Emery et al., 2000; Stanewsky et al., 1998). CRY und PER wirken zusammen, um die Aktivität des CLK/CYC-Heterodimers zu reprimieren, wobei bereits das Entfernen von einer der beiden Komponenten ausreicht, um die Repression aufzuheben (Collins et al., 2006). Analog dazu müsste die *per<sup>01</sup>*-Mutation einen ähnlichen Effekt auf die Biolumineszenzrhythmen der 8.0-*luc*-Fliegen auslösen. Vergleicht man jedoch die 8.0-*luc*-Biolumineszenzrhythmen im Wildtyp- und *per<sup>01</sup>*-Hintergrund (Abb. 34), so kann zwar im *per<sup>01</sup>*-Hintergrund ein höheres Expressionslevel beobachtet werden, aber keine Verstärkung der Amplitude.

Somit scheint die Ablation des Licht-Entrainment-Weges durch die *cryptochrom*-Mutation robustere Rhythmen hervorzubringen, was auf eine mögliche Interaktion von Licht- und Temperatursignalweg hindeutet. Darin läge auch eine Erklärung, weshalb die Synchronisation an Temperatur im Dauerlicht besser funktioniert als im Dauerdunkel (Yoshii et al., 2002). Die genetische Ablation der rhodopsinbasierenden Photorezeption

zeigt keinen Effekt, da die Amplitudenverstärkung spezifisch von dem defekten circadianen Photorezeptor CRY herrührt.

Die Anwesenheit von CRY scheint in den neuronalen Geweben die Sensitivität des circadianen Systems für den Zeitgeber Temperatur zu regulieren, und somit eine Art Schranke darzustellen. Weiterführend wäre hierbei eine Analyse der PER-/TIM-Oszillationen in den Uhrneuronen temperatursynchronisierter *cry<sup>b</sup>*-Fliegen interessant. Dergestalt könnte ein Anhaltspunkt darüber gewonnen werden, auf welche Weise das Temperatursignal in das neuronale Netzwerk der *period* exprimierenden Neuronen integriert wird.

### 4.3 Temperaturspanne der Synchronisation

Die innere Uhr von *Drosophila* kann über einen große Spanne hinweg (16°C-30°C) geringe Temperaturunterschiede wahrnehmen, um das rhythmische Lokomotorverhalten zu synchronisieren (Wheeler et al., 1993; Yoshii et al., 2002; Tomioka et al., 1998). Dies schließt aber nicht automatisch die Synchronisation der molekularen Oszillationen mit ein, weshalb getestet wurde, ob die molekulare Temperatursynchronisation innerhalb des physiologischen Bereich (16°C-30°C) beschränkt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Synchronisierung der PER-LUC Biolumineszenzrhythmen über die ganze Spanne des physiologisch-relevanten Bereiches hinweg erfolgen kann (Abb. 42). Die Biolumineszenzsignale weisen aber im oberen Temperaturspektrum (30°C:25°C) eine niedrigere Amplitude der Oszillationen, sowie einen Phasenunterschied von ca. 4 Stunden auf (Abb. 42). Dies erinnert an saisonale Effekte in LD-Zyklen, welche dazu führen, dass, im Gegensatz zu tiefen Temperaturen, die Oszillationen der *period* m-RNA in hohen Temperaturen eine gedämpfte Amplitude mit versetzter Phase aufweisen (Majercak et al., 1999). Wahrscheinlicher ist hingegen, dass die Dämpfung der Amplitude durch einen schnelleren Zerfall des instabilen Luziferins oder durch Austrocknen des luziferinhaltigen Futters ausgelöst wird. Eine Wiederholung der Experimente mit isolierten Körperteilen könnte diese Unklarheit beseitigen, da einerseits die Biolumineszenzsignale der isolierten Gewebe sehr robuste Rhythmen liefern (Abb. 24) und andererseits die Versiegelung der Microtiterplatten kein Austrocknen des Zellkulturmediums zulässt (siehe 2.3.11).

#### 4.4 Beteiligung bekannter Thermotaxis-Mutanten an der circadianen Thermorezeption

Keine der bekannten Thermotaxis-Verhaltensmutanten (*bizarre*, *ss<sup>a</sup>*, *hdc*) zeigt einen Defekt in der Temperatursynchronisation der molekularen *per-luc* Rhythmen (Abb. 22; Abb. 23), obwohl die räumliche Expression des Histaminrezeptors in den I-LN<sub>v</sub>'s eine Beteiligung dieses Signalwegs an der thermalen Synchronisierung der circadianen Uhr vermuten lässt (Hong et al., 2006). Die getesteten Mutationen nehmen der Fliege zwar die Fähigkeit, die bevorzugte Umgebungstemperatur in einem Wärmegradienten wahrzunehmen (Sayeed and Benzer, 1996; Hong et al., 2006), die innere Uhr bleibt aber dennoch in der Lage, sich präzise an geringe Temperaturschwankungen zu synchronisieren (Abb. 22). Das gilt sowohl für die ablatierten Thermorezeptoren im 3. Antennensegment, als auch für *bizarre*- und *hdc*-Mutanten, welche die Übertragung bzw. die Verarbeitung der Signale unterbinden. Eine weitere Tatsache spricht gegen eine Beteiligung dieser Thermorezeptoren am Temperaturentrainment: Wildtyp Fliegen reagieren im Rahmen von Temperaturpräferenztests nicht auf einen Unterschied von 3°C, sobald sich beide Temperaturen unterhalb 24°C befinden (Zars, 2001). Dies bildet einen Gegensatz zur Temperatureaufnahme der inneren Uhr, da bereits ein Temperaturunterschied von 2°C ausreicht, um das Laufverhalten von Wildtypfliegen zu synchronisieren, und zudem diese Temperaturen weit unter 24°C liegen können (Wheeler et al., 1993; Abb. 42).

Darüber hinaus ist die relative Luftfeuchte bei Temperaturversuchen problematisch, da deren Variation mit wechselnder Temperatur einhergeht (Sayeed and Benzer, 1996). Deshalb können Schwankungen der Temperatur auch über Änderungen der Luftfeuchtigkeit wahrgenommen werden. Da in einem Luftfeuchte-Auswahltest eine Entfernung der Aristae zur wahllosen Verteilung der Fliegen führt, müssen sich die Luftfeuchtesensoren innerhalb dieser Strukturen befinden (Sayeed and Benzer, 1996). Die temperaturinduzierten Rhythmen der *spineless-aristapedia* Mutante, bzw. der Fliegen mit manuell ablatierten Antennen sprechen gegen eine Aufnahme der Temperaturinformation über die Luftfeuchtigkeit, da bei beiden die Aristae fehlen (Abb. 22). Zusammengefasst scheinen somit weder die Antennen mit den Thermosensoren, noch deren Signalwege maßgeblich an der circadianen Thermorezeption beteiligt zu sein. Dieses Ergebnis verhält sich zur Situation beim LD-Entrainment analog, da die circadiane Uhr der Fliege trotz Ablation der Photorezeptoren für die Bildwahrnehmung noch durch Licht synchronisiert werden kann (Helfrich-Förster et al., 2001). Ein Beitrag der antennalen Thermorezeptoren und des Histamin-Signalwegs an der Temperaturkompensation (siehe 1.9) lässt sich jedoch

nicht ausschließen.

#### **4.5 Beitrag von Ionenkanälen bei der Temperatureaufnahme der circadianen Uhr**

Die Synchronisation der circadianen Uhr von *Drosophila* ist über einen großen Temperaturbereich hinweg möglich, wobei bereits ein Temperaturunterschied von ca. 2°C ausreicht, um robuste Lokomotorrhythmen zu generieren (Abb. 42; Wheeler et al., 1993; Yoshii et al., 2002; Tomioka et al., 1998). Das thermale Entrainment setzt daher voraus, dass die Fliege gradierte Abstufungen der Temperatur differenzieren kann und nicht nur das Überschreiten einer bestimmten Temperaturschwelle wahrnimmt. Klassische Thermorezeptoren, wie z.B. die TRP-Ionenkanäle werden ab einer bestimmten Schwelle aktiviert (siehe 1.13; Viswanath et al., 2003; Tominanga and Caterina, 2004), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass bei der circadianen Thermorezeption mehrere verschiedene Rezeptoren zusammenwirken. Die meisten Vertreter thermorezeptiver Kanäle stellen die TRP- und DEG/ENAC-Familie (siehe 1.13) zur Verfügung, weshalb diese mit Blick auf ihren möglichen Beitrag zur circadianen Thermorezeption analysiert wurden.

Bei allen getesteten Vertretern der TRP-Kanal-Familie (*painless*, *TRP*, *nanchung*, *inactive*) konnten Temperaturzyklen robuste Biolumineszenzrhythmen synchronisieren, wobei die *inactive*-Mutation ein abgesenktes *per-luc* Expressionslevel verursacht (Abb. 43). Zusammen mit *nanchung* gehört jener Kanal zur Unterfamilie der vanilloiden TRP-Kanäle, welche im Säuger nahezu alle bekannten thermorezeptiven TRP-Kanäle stellt (Tominanga and Caterina, 2004). Zudem ist *inactive* in die Regulation von Stress involviert und zeichnet sich durch sehr niedrige Level der Neurotransmitter Tyramin und Octopamin aus (Chentsova et al., 2002). Somit ergibt sich ein möglicher Beitrag von *inactive* bei der Temperatureaufnahme der inneren Uhr. Die robusten Rhythmen im *inactive*-Hintergrund ließen sich mit der Existenz weiterer Thermorezeptoren erklären. Aufgrund fehlender LD-Daten kann aber ein genereller Effekt auf die circadiane Uhr nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Ansatz für die Analyse der TRP-Kanäle war die Inhibierung mittels Lanthan-(III)-Ionen in isolierten Körperteilen wildtypischer Fliegen, da Lanthan die TRP-Kanäle von *Drosophila* Nervenzellen in Kultur zuverlässig blockiert (Hochstrate, 1989; Suss-Toby et al., 1991). Es konnte jedoch keine Wirkung des Hemmstoffs auf die Temperatureaufnahme der circadianen Uhr festgestellt werden (Abb. 44). Als fraglich erscheint, wie aussagekräftig dieses Ergebnis ist, da keine Positivkontrolle vorliegt, um die Wirksamkeit dieses Hemmstoffs in dieser Untersuchung zu bestätigen. Zwar wurden die

Experimente sowohl in LD-Zyklen, als auch in Temperaturzyklen durchgeführt, um einen evtl. temperaturspezifischen Defekt aufzuzeigen. Jedoch besitzt diese Analyse aufgrund des fehlenden Effekts in beiden Regimes nur geringe Aussagekraft. Somit kann lediglich ein maßgeblicher Beitrag der Kanäle *painless*, *Trp*, *nanchung* ausgeschlossen werden.

Da von den DEG/ENaC-Kanälen keine Mutanten für Tests zur Verfügung standen, wurde analog zu den TRP-Kanälen versucht, diese in wildtypischen Gewebekulturen (Beine, Flügel) mittels Amilorid zu blockieren. Die Zugabe jenes Hemmstoffs führte zu einer Amplitudendämpfung in den Flügeln, sowie zu einem sehr schwachen linearen Biolumineszenzsignal in den Beinen (Abb. 45).

Jedoch repräsentiert Amilorid keinen spezifischen Inhibitor von DEG/ENaC-Kanälen, da darüber hinaus noch andere Transporter der Zellmembran blockiert werden können. So z.B. die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die  $\text{Na}^+$ -Pumpe, zyklische Nukleotid-abhängige Kanäle sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Frings et al., 1992; Garty and Palmer, 1997; Luciani et al., 1992; Tang et al., 1988). Damit ist unklar, ob die Amplitudendämpfung durch das Absterben einzelner Gewebebereiche, einschließlich deren peripherer Oszillatoren, verursacht wird. Aufgrund der möglichen Sekundäreffekte konnte diese Frage dahingestellt bleiben, weshalb z.B. auf eine Wiederholung in LD-Zyklen verzichtet wurde. Stattdessen wurde ein anderer Lösungsansatz gewählt, der daraus bestand, 10 mM Amilorid-Chlorid an adulte Fliegen zu verfüttern. Diese Methode der Verabreichung bot sich an, da sie erstens nicht toxisch ist und zweitens zuverlässig die Wahrnehmung von Salz und Bitterstoffen (über die DEG/ENaC-Kanäle) unterbindet (Jenkins and Tompkins, 2001; Liu et al., 2003). Dabei zeigte sich, dass Amilorid in adulten Fliegen in einer temperaturspezifischen Dämpfung des Expressionslevels mündet und damit eine mögliche Beteiligung von Vertretern der DEG/ENaC-Kanalfamilie vermuten lässt (Abb. 46).

Die Frage nach den circadianen Thermorezeptoren konnte somit nicht eindeutig geklärt werden, welche erst anhand Kontrollexperimente in LD-Zyklen bestätigt werden müssen. Zur weiteren Differenzierung könnten anschließend spezifische Kanal-Inhibitoren, bzw. das gezielte Ausschalten einzelner Kanäle mittels Antisense-RNA (RNAi) herangezogen werden.

## 4.6 Gewebeautonomie der circadianen Thermorezeption

Temperatursynchronisierte Oszillationen des *per-luc* Reportergens lassen sich in allen separierten Geweben beobachten (Abb. 24). Dieses Ergebnis ähnelt solchen früherer Studien, welche mit Licht-Dunkel-Zyklen die Existenz peripherer Oszillatoren in den verschiedensten Geweben beweisen konnten (Plautz et al., 1997b; Levine et al., 2002a).

Alle getesteten Gewebe sind *per se* in der Lage, die Temperaturwechsel aufzunehmen, wobei die Verarbeitung des Temperatursignals durch das Hirn, bzw. eine Signalkaskade vom Hirn zum entsprechenden Gewebe nicht notwendig ist. Dies bestätigt die Resultate mit den Thermotaxismutanten (*bizarre*, *ss<sup>a</sup>*; Abb. 22), und lässt entweder einen spezialisierten circadianen zellulären Temperaturrezeptor vermuten, analog zu dem lichtvermittelnden CRY, oder eine Temperatursignalkaskade, welche die Information eines Sensors an die peripheren Oszillatoren weiterleitet. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um einen cuticulären oder einen zellulären Sensor handelt, da die Biolumineszenz der Hirne von den anderen Körperteilen differiert. Denkbar wäre aus diesem Grund ein Rezeptor in der Cuticula, da eine starke *period*-Expression in den chemorezeptiven Basalzellen der sensorischen Borsten an Beinen und Flügeln stattfindet (Plautz et al., 1997b). Zudem ergäbe die Positionierung an der Körperraußenseite mehr Sinn, da diese in direktem Kontakt mit der Umgebung steht. Zur Klärung dieser Problematik könnte man z.B. die Malphigischen Gefäße heranziehen, welche einerseits robuste Oszillationen zeigen (Ivanchenko et al., 2001; Giebultowicz et al. 2000a) und andererseits keine cuticulären Strukturen aufweisen.

Um die Natur der Oszillationen näher zu erforschen, wurde auf *Clock*- und *timeless*-Mutationen zurückgegriffen, die aufgrund defekter positiver bzw. negativer Komponente die molekulare Rückkopplungsschleife unterbrechen (*Clk<sup>Jrk</sup>*: Allada et al., 1998; *tim<sup>01</sup>*: Sehgal et al., 1994). Analog zu den veröffentlichten Ergebnissen führen diese Mutationen in adulten Fliegen zum Verlust der temperaturinduzierten *per-luc* Rhythmen (Abb. 27; Abb. 20). In den peripheren Geweben konnten direkte Effekte der beiden Mutanten auf die Temperatursynchronisation beobachtet werden: Die isolierten Hirne beider Mutanten weisen ein stetiges Zu- und Abnehmen des Biolumineszenzsignals in Abhängigkeit von Temperaturhöhe oder Temperaturänderung auf (Abb. 28). Daher ist unklar, ob die Biolumineszenzrhythmen wildtypischer Hirne die Existenz von Thermosensoren sowie deren Signalverarbeitung wiedergeben, oder ob das Fliegenhirn letztendlich die Temperatur nicht wahrnehmen kann (eingehend diskutiert in Punkt 4.7).

Alle anderen getesteten Gewebe beider Mutanten (*Clk<sup>Jrk</sup>*, *tim<sup>01</sup>*) reagieren in Form von



Biolumineszenzvarianzen ebenfalls direkt auf die unterschiedlichen Temperaturen: Während in Beine und Köpfen die Temperatur das lineare Biolumineszenzsignal anhebt bzw. absenkt, kann in den Flügeln ein Signalpeak als Reaktion auf den Temperaturanstieg beobachtet werden (Abb. 28; Abb. 29).

Dieser klare Unterschied zwischen den temperaturinduzierten Biolumineszenzsignalen peripherer Gewebe von Wildtyp-Fliegen und Gewebekulturen beider Mutanten (*Clk<sup>Jrk</sup>*, *tim<sup>01</sup>*) spricht dafür, dass die wildtypischen *per-luc* Signale die Oszillationen der circadianen Uhr widerspiegeln.

Es bleibt offen, ob die PER-LUC Biolumineszenzschwankungen im *Clk<sup>Jrk</sup>*- und *tim<sup>01</sup>*-Hintergrund darauf hinweisen, dass eine konstante Menge an PER-Protein durch einen Temperaturanstieg bzw. -abfall moduliert werden kann, oder ob es sich um direkte Temperatureffekte auf die Luziferaseaktivität handelt.

Für die erste Möglichkeit spricht, dass Temperaturwechsel zwischen 20°C und 30°C zu einer unmittelbaren Zu- bzw. Abnahme der *period* und *timeless* m-RNA im Wildtyp, sowie im *Clk<sup>Jrk</sup>*-Hintergrund führen (Yoshii et al., 2006). In Wildtyp-Fliegen veranlassen diese Temperaturschritte (30°C→20°C; 20°C→30°C) einen Anstieg bzw. einen Abfall der PER- und TIM-Menge, allerdings mit einiger zeitlicher Verzögerung (Yoshii et al., 2006). Eine unmittelbare Degradation von PER und TIM in Wildtyp-Hintergrund konnte bisher nur für Temperaturpulse jenseits der 30°C gezeigt werden (Sidote et al., 1998).

#### 4.7 Fehlende Temperatursynchronisation der isolierten Hirne

Ein Vergleich der Biolumineszenzdaten separierter Körperteile wildtypischer Fliegen deckt auf, dass die Phasenlage der *per-luc* Oszillationen fast aller Gewebe mit den adulten Fliegen übereinstimmt (Abb 24; Glaser and Stanewsky, 2005). Das Fliegenhirn bildet dabei die Ausnahme, da sich dessen Expressionsmaximum in der Thermophase befindet (Abb. 24). Dieser Effekt ist temperaturspezifisch, da in LD-Zyklen das *per-luc*-Expressionsmaximum aller Körperteile, einschließlich der Hirne, in der Dunkelpase lokalisiert ist (Abb. 25, Tab. 9).

Im Gegensatz zu den peripheren Geweben visualisieren sich die temperaturinduzierten Biolumineszenzsignale der Hirne nicht in Form von Sinuskurven, sondern in sägezahnartigen Mustern (Abb. 24 B, C). Ein ähnliches Signal kann auch bei Hirnen von *Clk<sup>Jrk</sup>*- und *tim<sup>01</sup>*-Fliegen beobachtet werden (Abb. 28; Abb. 29). Diese Mutationen unterbrechen die molekulare Oszillation und verursachen damit in adulten Fliegen ein lineares Biolumineszenzsignal (Abb. 27; Abb. 20). Die *per<sup>01</sup>*-Mutation scheint zudem nicht

die Biolumineszenzsignale von isolierten 8.0-*luc*-Hirnen in Temperaturzyklen zu beeinflussen, während die adulten *per*<sup>01</sup>; 8.0-*luc* Tiere gegenüber den wildtypischen Kontrollen einen deutlichen Effekt in der Phase aufweisen (Tab. 12). Ein Vergleich der *per-luc* Expressionsphasen verdeutlicht, dass alle getesteten Hirne, sowohl wildtypisch, als auch mutant, ähnliche Phasen aufweisen, die zudem im gleichen Bereich wie die Phasen adulter *tim*<sup>01</sup>; XLG-*luc* Fliegen liegen (Tab. 11; Tab. 16).

Zusammengefasst lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die temperaturinduzierten Biolumineszenzsignale der Hirne weder von PER, TIM oder CLK abhängig sind. Dies bedeutet wiederum, dass dafür eine funktionstüchtige molekulare Rückkopplungsschleife nicht notwendig ist und die gemessenen Signale der Hirne eventuell nicht die Oszillationen der circadianen Uhr reflektieren. Temperaturzyklen scheinen daher nicht in der Lage zu sein, die isolierten Hirne zu synchronisieren. Die Tatsache, dass LD-Zyklen in Hirnkulturen robuste *per-luc* Rhythmen hervorbringen, zeigt, dass diese Situation temperaturspezifisch ist und weist auf mechanistische Unterschiede zwischen der Licht- und Temperatursynchronisation hin.

Zwar besteht die Möglichkeit, dass das neuronale Gewebe infolge der Präparation zu Schaden kommt. Jedoch sprechen sowohl die synchronisierten Rhythmen der isolierten Hirne in LD-Zyklen (Abb. 24 B; Tab. 8), als auch die große Anzahl der getesteten Hirnkulturen (n=248, Tab. 11) dagegen.

#### **4.8 Beitrag der Peripherie zur Synchronisation des Hirns in Temperaturzyklen**

Scheinbar werden Kulturen von separierten Hirnen nicht durch Temperaturzyklen synchronisiert. Interessanterweise zeigen aber die neuronalen Biolumineszenzsignale der 8.0-*luc* Fliegen, dass die Oszillationen im Hirn einer lebenden Fliege in Temperaturzyklen die gleiche Phasenlage besitzen, wie die separierten peripheren Gewebe (Tab. 8; Tab. 12). Deshalb werden Signale aus der Peripherie benötigt, um die Oszillationen im Fliegenhirn an Temperaturzyklen zu synchronisieren. Unklar bleibt jedoch, ob diese Signale die Übermittlung der Temperaturinformation eines Thermosensors oder die kommunikative Kopplung an die peripheren Oszillatoren bewerkstelligen. Zudem erscheint auch eine funktionierende Uhr in den peripheren Geweben als notwendig, da die temperaturinduzierten Biolumineszenzsignale adulter *per*<sup>01</sup>;8.0-*luc*-Fliegen im Vergleich zu den *per*<sup>+</sup>-Tieren eine Phasenverschiebung von ca. 2-4 Stunden aufweisen (Tab. 12). Ein ähnliches Ergebnis offenbart auch das temperatursynchronisierte Lokomotorverhalten von

*per*<sup>01</sup>-Fliegen, bei denen die *per*<sup>01</sup>-Mutation in bestimmten Geweben durch ein *period* Konstrukt gerettet wird (Abb. 36). Wildtypisches Lokomotorverhalten in Temperaturzyklen konnte nur bei solchen Fliegenlinien beobachtet werden, die in allen Uhrneuronen und zusätzlich in peripheren Geweben eine funktionierende circadiane Uhr besitzen (*per*<sup>01</sup>; *per7.2:9*). Dagegen zeigen Linien, bei denen die funktionierende Uhr auf die s-LN<sub>v</sub> und l-LN<sub>v</sub> (*per*<sup>01</sup>; *per7.2:2a*) bzw. die DN<sub>s</sub> und wenige Oszillatoren der Peripherie (*per*<sup>01</sup>; *per7.2:2a*) beschränkt ist, eine schlechtere Synchronisation auf Temperaturzyklen (Abb. 36). Wird in *per*<sup>01</sup>-Fliegen die Mutation in allen klassischen Uhrneuronen (LN<sub>s</sub>, DN<sub>s</sub>) gerettet (*per*<sup>01</sup>; *cry13*-PER), reicht dies nicht aus, um ein wildtypisches Verhaltensmuster in Temperaturzyklen zu generieren (Busza A. und P. Emery, pers. Mitteilung). Dies verschafft Klarheit darüber, dass neben den klassischen Uhrneuronen noch andere Komponenten, wie z.B. temperatur-spezifische Neurone, oder *cry13*-negative periphere Oszillatoren, zur Steuerung der rhythmischen Laufaktivität in Temperaturzyklen beitragen. Einen solchen Kandidaten repräsentieren die *period*-exprimierenden lateralen posterioren Neuronen (LPN), die in Temperaturzyklen stärkere Oszillationen aufweisen, als in LD-Zyklen (Yoshii et al., 2005; Shafer et al., 2006). Eine ähnliche Situation findet man bei *Leucophaea maderae*, wo trotz der Ablation des Masterszillators in den optischen Loben ein temperatursynchronisierter Lokomotorrhythmus induziert werden kann und somit die Existenz eines weiteren circadianen Oszillators aufgedeckt wurde, der ausschließlich zur Synchronisation an Temperaturzyklen beiträgt (Page, 1985).

In den Hirnen von *nocte* Fliegen konnten aber temperatursynchronisierte PERIOD-Oszillationen in allen *period* exprimierenden Neuronen, inklusive den LPNs, festgestellt werden. Dennoch zeigt diese Mutante einen temperaturspezifischen Synchronisationsdefekt des Laufverhaltens (Abb. 56; Abb. 58 B; Abb. 58 C). Da *nocte*-Fliegen aber keine PER-Färbungen in den Gliazellen aufweisen, scheint zudem ein Defekt in der Kopplung der peripheren und neuronalen (LN<sub>d</sub>-)Oszillatoren zu bestehen. Aufgrund dieser Sachlage ist es daher noch ungewiss, welche Komponenten zur Steuerung des rhythmischen Laufverhaltens in Temperaturzyklen beitragen. Jedoch wurde ausschließlich die Oszillation des PER-Proteins in den Uhrneuronen untersucht. Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob nicht ein Defekt vorliegt, der spezifisch die Oszillationen des TIM-Proteins betrifft. Zudem bleibt auch die Frage offen, wie sich die Rolle der Peripherie im Detail definiert.

#### 4.9 Spleißen der *period* m-RNA ist irrelevant für das tägliche Entrainment durch Temperaturzyklen

Bei der saisonalen Anpassung der inneren Uhr spielt das Spleißen eines nicht-translatierten Introns im 3'-UTR des *period* Gens eine wichtige Rolle (Majercak et al., 1999). Dieses Spleiß-Event regelt die Akkumulation der *period* m-RNA als Reaktion auf Tageslänge und Durchschnittstemperaturen (Majercak et al., 1999; Majercak et al., 2004; Collins et al., 2004), was diesen Mechanismus auch als mögliche Grundlage des täglichen Temperaturentrainments in Frage kommen lässt. So wird z.B. in *Neurospora* durch alternatives Spleissen des *frequency*-Gens die circadiane Uhr mittels Temperaturzyklen synchronisiert (Diernfellner et al., 2005; Colot et al., 2005). In *Drosophila* sprechen aber einige Fakten dagegen: Sowohl in den Kontrolltieren, als auch in den *nocte* Fliegen ist in Dauerlicht und Temperatur eine vergleichbare Menge an gespleißter und ungespleißter RNA vorhanden, was die Inhibition dieses Events durch Dauerlicht widerspiegelt (Abb. 37; Majercak et al., 2004; Majercak et al., 1999). Jedoch funktioniert das Temperaturentrainment von Wildtyp-Fliegen in LL trotz der Hemmung dieses *period* Spleiß-Ereignisses (Abb. 20; Abb. 58 B; Abb. 58 C). Die Synchronisation der Lokomotorrhythmik mittels Temperatur erfolgt in Dauerlicht sogar noch besser als in konstanter Dunkelheit (Yoshii et al., 2002). Zudem können die Biolumineszenzrhythmen von BG-*luc*- und XLG-*luc*-Fliegen mit Hilfe von Temperaturzyklen synchronisiert werden, obwohl in beiden *per-luc* Konstrukten das 8. Intron des *period* Gens fehlt (Abb. 20; Abb. 15).

Darüber hinaus weist die PLC-Mutante (*norpA*<sup>P41</sup>) einen Defekt in der Temperatursynchronisation auf, und ist zudem an der Regulation dieses Spleiß-Ereignisses beteiligt, was wiederum eine Verknüpfung beider Mechanismen nahe legt (Abb. 36; Abb. 37; Abb. 49). Sowohl im *norpA*-, als auch im *nocte*-Hintergrund funktioniert die Thermosynchronisation der isolierten Gewebe einwandfrei, was zeigt, dass die Aufnahme der Temperaturinformation nicht durch die innere Uhr unterbrochen ist (Abb. 51). Diese Fakten belegen, dass das Spleißen des untranslatierten 8. Introns von *period* nicht maßgeblich zur täglichen Synchronisation der inneren Uhr an Temperaturzyklen beiträgt. Eine mögliche Beteiligung am Feintuning der Rhythmen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.10 Temperatursynchronisation involviert transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen

In Licht-Dunkel-Zyklen führt die Expression der Luziferase unter Kontrolle des *period* Promotors, respektive zusätzlicher untranslatierter Bereiche (*p<sub>lo</sub>*, *NOG-luc*) zu rhythmischen Biolumineszenzsignalen. Dies deutet darauf hin, dass die Rhythmen auf transkriptionaler Ebene reguliert werden (Stanewsky et al., 2002b; Stanewsky et al., 1997a). Temperaturzyklen (in LL) induzieren hingegen nur in solchen adulten Fliegen eine rhythmische Biolumineszenz, deren Reporterkonstrukte mindestens  $\frac{2}{3}$  des PER-Proteins beinhalten (Abb. 20; Abb. 39). Die isolierten Gewebekulturen von Fliegen, bei denen die Luziferase unter der Kontrolle des *period*-Promotors und ohne PER kodierende Sequenzen exprimiert wird, zeigen demgegenüber robuste temperaturinduzierte Biolumineszenzrhythmen (Abb. 40). Bei beiden Reporterkonstrukten (*p<sub>lo</sub>*, *NOG-luc*) kann dieser Effekt beobachtet werden, was bedeutet, dass in einer adulten Fliege die transkriptionale Kontrolle nicht ausreicht, um robuste Rhythmen des PER-Proteins zu generieren.

#### 4.11 Die Funktion von *nocte* und *norpA* bei der Thermosynchronisation

Zur Identifikation neuer Komponenten, die in der Temperatursynchronisation der circadianen Uhr involviert sind, wurde in der vorangehenden Diplomarbeit eine EMS-Mutagenese durchgeführt. Dieser Screen ermöglichte die Isolierung der circadianen Temperaturentrainment-Mutante *nocte*, welcher ein spezifischer Defekt in der Synchronisierung molekularer *per-luc* Oszillationen an Temperaturzyklen anhaftet (Abb. 47). Ein ähnlicher Defekt weist auch die PLC Mutante *norpA* auf (Abb. 49; Glaser and Stanewsky, 2005). Bei beiden ist die Licht-Dunkel-Synchronisierung der molekularen Rhythmen nicht betroffen, was die Spezifität dieses Defektes für Temperatur herausstellt. Somit repräsentieren die Mutationen *nocte* und *norpA*<sup>P41</sup> ein Spiegelbild der *cry<sup>b</sup>*-Mutante, worin die circadiane Photorezeption selektiv blockiert ist (Stanewsky et al., 1998). Interessanterweise lassen sich temperaturinduzierte Biolumineszenzrhythmen in den separierten Geweben beider thermorezeptiver Mutanten beobachten, so dass die Aufnahme der Temperatur *per se* nicht bzw. nicht vollständig betroffen zu sein scheint.

Entgegen den isolierten Körperteilen weisen die PER- und TIM-Oszillationen in den Fliegenköpfen einen Temperatursynchronisationsdefekt auf (Abb. 51; Abb. 54). Hierbei werden hauptsächlich die molekularen Oszillationen in den Photorezeptorzellen gemessen,

die ebenfalls periphere Oszillatoren darstellen (Stanewsky et al., 1998). Der Unterschied zu den isolierten Fliegenköpfen in Kultur besteht darin, dass die Westernblots die Oszillationen in den peripheren Oszillatoren *in-vivo* repräsentieren, ähnlich dem Biolumineszenzsignal adulter Fliegen. Zur Klärung könnte jedoch ein Westernblot von temperatursynchronisierten Beinen bzw. Körpern herangezogen werden.

Die Analyse der temperaturinduzierten PER-Oszillationen der einzelnen Uhrneurone im *nocte*-Hirn lässt synchronisierte Rhythmen in allen *period* exprimierenden Neuronen, inklusive den LPNs erkennen. Gegenüber dem Wildtyp lässt sich aber eine Diskrepanz in der Phase und der Amplitude einzelner Neuronengruppen detektieren. Analog zur *cry<sup>b</sup>* Mutante innerhalb LD kann im *nocte*-Hintergrund in Temperaturzyklen keine PER-Färbung in den Gliazellen beobachtet werden (Abb. 56; Abb. 57; Stanewsky et al., 1998).

Während in LD-Zyklen beide Mutanten (*nocte*, *norpA*) unter Entrainment-Bedingungen ein bimodales Verhaltensmuster der Lokomotorrhythmik hervorbringen, weisen sie in Temperaturzyklen nur maskiertes Verhalten auf: die Aktivität wird durch die erhöhte Temperatur in der Thermophase verstärkt und in der Nacht schwächer reprimiert als im Wildtyp (Abb. 58 A, B, C). Eine Verstärkung des Zeitgebers durch Erhöhung der Temperaturspanne führt nicht zur Synchronisation des Laufverhaltens, sondern zu einem ausgeprägteren Synchronisationsdefekt (Abb. 58 C): Nach einem raschen Aktivitätsanstieg im Zuge der Temperaturerhöhung verharren *nocte*- und *norpA*-Mutanten während des Tages auf einem gleichbleibenden Level.

Warum verursachen aber beide Mutanten sowohl im Lokomotorverhalten, als auch in der Biolumineszenz adulter Tiere einen Defekt in der Temperatursynchronisation, während die Temperatureaufnahme in den separierten Körperteilen nicht betroffen ist?

Im Gegensatz zum LD-Entrainment genügt eine funktionierende Uhr in den LNs, bzw. in allen klassischen Uhrneuronen nicht, um das Lokomotorverhalten mittels Temperatur robust zu synchronisieren (Abb. 36; Busza A. and Emery P, pers. Mitteilung). Daher scheinen noch weitere Neuronengruppen bzw. periphere Oszillatoren zur Temperatursynchronisation beizutragen.

Die Biolumineszenzversuche mit den isolierten Hirnen brachten ans Licht, dass diese wahrscheinlich nicht durch Temperaturzyklen synchronisiert werden können und somit auf Signale aus der Peripherie angewiesen sind (siehe Punkt 4.7 und 4.8). In Kultur zeigen die einzelnen isolierten peripheren Gewebe jedoch temperatursynchronisierte Rhythmen. Westernblots offenbarten aber, dass ein peripherer Oszillator *in-vivo* einen Synchronisationsdefekt aufweist (Abb. 51; Abb. 54).

Somit ließe sich der Effekt beider Mutanten (*norpA*, *nocte*) auf das Lokomotorverhalten und die Biolumineszenz adulter Tiere durch eine defekte synchronisierende Kopplung der peripheren Oszillatoren untereinander erklären, die zur Folge hat, dass kein eindeutiges Signal mehr an das Fliegenhirn geleitet werden kann. Daraus ergibt sich die Frage, warum die peripheren Gewebekulturen der *nocte*- und *norpA*-Fliegen eine vergleichbare Phase in Temperatur aufweisen. Dies könnte entweder daran liegen, dass solche Biolumineszenzsignale entweder die Summe weniger synchronisierter Oszillatoren darstellen, oder dass jener Synchronisationsdefekt nur dann auftritt, wenn Gewebe einer intakten Fliege vorliegen, die mit dem zentralen Nervensystem in Kontakt stehen.

Die PhospholipaseC (*norpA*) ist beispielsweise an der Signalübertragung G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCR) beteiligt, was keinen Widerspruch zu dieser These aufwirft. Bezüglich der genauen Ursache des Temperatursynchronisationsdefekts in *norpA*-Mutanten besteht somit noch Unklarheit.

Zudem ist die Funktion des *nocte*-Proteins noch unbekannt. Eine Analyse ergab, dass sich innerhalb der Proteinsequenz neben einer BAT2-Domäne eine HDAC-Interaktionsdomäne, sowie zahlreiche PDZ-, SH2- und SH3-Bindestellen befinden. Jedoch ist die BAT2-Domäne schlecht konserviert, und scheint daher für das Protein keine essentielle Funktion zu übernehmen. Die Identifikation einer HDAC-Interaktionsdomäne lässt vermuten, dass das *nocte*-Protein eine potentielle Rolle bei der Regulation von Histon-Deacetylasen inne hat. Zudem können viele Glutaminreiche Regionen innerhalb des Proteins festgestellt werden, die eine Parallele zu dem CLK-Protein von *Drosophila* aufzeigen (Allada et al., 1998). Interessanterweise fungiert eine Domäne des Säuger-CLK-Protein als Histon-Acetyl-Transferase, wodurch sich eine mögliche regulatorische Interaktion beider Proteine ergibt (Doi et al., 2006).

Die PDZ-, SH2- und SH3-Bindestellen deuten auf eine mögliche Funktion entweder in der Übermittlung intrazellulärer Signale, oder bei der Integration membrangebundener Komponenten hin. In der Photorezeption wird z.B. über die PDZ-Domänen von INAD ein Multiprotein-Komplex gebildet, der unter anderem als Bindeglied zwischen den Trp-Kanälen und der PhospholipaseC (*norpA*) agiert (Shieh and Zhu, 1996; Huber et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit, die den Synchronisationsdefekt der *nocte* Fliegen auslösen könnte, wäre eine fehlerhafte Entwicklung des peripheren Nervensystems, da sich in *nocte*-Fliegen ein Defekt bei der L5-Flügelvene ausgebildet hat.

Abschließend kann jedoch resümiert werden, dass die genaue Funktion beider Mutanten (*nocte*, *norpA*) weiterhin unklar bleibt, und erst durch weiterführende Studien aufgeklärt

werden kann. Ein wichtiger Punkt hierbei wäre die Analyse des Expressionsmusters. Die *P*-Insertion der Fliegenlinie *l(1)G0097*, welche in dem Gen CG17255 inseriert ist, trägt ein  $\beta$ -galactosidase-Gen aus *E. Coli*, mit dessen Hilfe X-Gal-Färbungen durchgeführt werden können. Aufgrund des vergleichbaren Synchronisationsdefekts bedarf es einer Antwort auf die Frage, ob beide Mutationen im gleichen Signalweg agieren, oder verschiedene Aspekte der Temperatursynchronisation betreffen. Dies macht das Generieren der Doppelmutante aus *norpA* und *nocte* essentiell. Darüber hinaus steht die spontane Temperatur-Entrainmentmutante *tvm53* zur Verfügung (siehe 3.3), dessen zugrunde liegendes Gen einen weiteren Faktor der circadianen Temperatursynchronisation repräsentiert.

#### 4.12 Isolierung und Kartierung der *nocte*-Mutation

Ein Ziel dieser Arbeit war, eine Komponente der circadianen Thermorezeption mittels *forward-genetics* zu identifizieren. In der vorangegangenen Diplomarbeit wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt, woraus die Temperatur-Entrainment-Mutante *nocte* resultierte. Bedingt durch das verwendete Kreuzungsschema war zwar schon zu Beginn der Mutagenese bekannt, dass sich die isolierten Mutanten auf dem X-Chromosom befinden (siehe 2.2.1), die weitere Kartierung der erzeugten Mutation gestaltete sich sehr arbeits- und zeitaufwendig. Im Vergleich dazu liefern andere *forward genetic* Screens mit *P*-Elementen (z.B. *gene trap* und *enhancer traps*) Mutanten, deren Kartierung und Verifizierung viel einfacher durchzuführen ist. Die unterschiedlichen Insertionsfrequenzen der *P*-Element-Mutagenese führen aber dazu, dass einerseits nicht alle Gene getroffen werden können, und andererseits die Insertionsstellen in einem Gen immer in ähnlichen Bereichen liegen (Tower et al., 1993; Liao et al., 2000).

Ein großer Vorteil der EMS-Mutagenesen gegenüber den *P*-Element-Screens kann zudem angeführt werden, dass die Angriffsfläche auf dem Chromosom größer ist, was daher in Isolation vieler Allele völlig unbekannter Komponenten mündet, wie z.B. durch die Identifikation von *period* (Konopka and Benzer, 1971), *Clock* (Allada et al., 1998), den Trp-Kanäle (Cosens and Manning, 1969), sowie von vielen weiteren anschaulich demonstriert wird. Dieser Vorteil gewinnt umso mehr an Bedeutung, da mittlerweile auch das Genom von *Drosophila* vollständig sequenziert vorliegt (Adams et al., 2000).

Bei der Kartierung der *nocte*-Mutante kam aber erschwerend hinzu, dass das isolierte X-Chromosom in hemizygoten und homozygoten Tieren Semiletalität verursachte, was dazu führt, dass in einem balanzierten Stamm nur sehr wenig hemizygote Männchen und keine



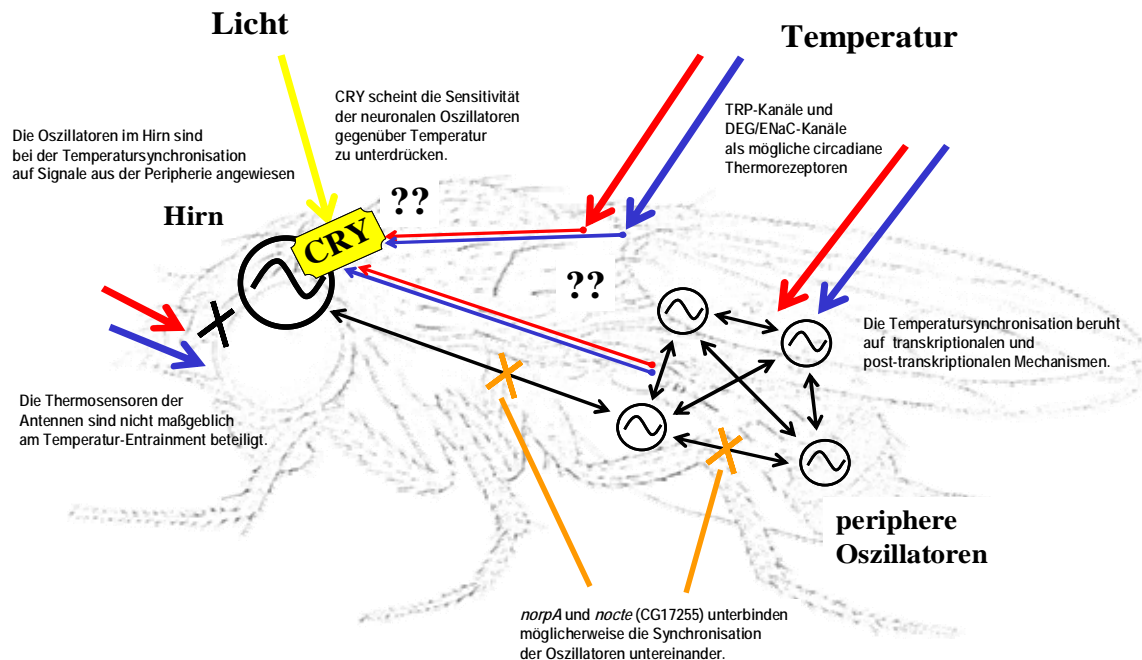
homozygote Weibchen schlüpfen. Deshalb musste ein Stamm etabliert werden, bei dem *nocte*-Männchen einen größeren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation besaßen. Dies gelang mit einem genetischen Trick: Das *nocte* X-Chromosom wurde über *attached-XX* gekreuzt, so dass die einzigen genetisch möglichen, lebensfähigen Männchen dieses Stamms das *nocte* X-Chromosom tragen und die Wahrscheinlichkeit für diesen Genotyp von 25% auf 50% erhöht wird. Interessanterweise konnte bei einigen *nocte*-Männchen dieses Stamms eine Verkürzung der L5 Flügelvene festgestellt werden. Dieser Phänotyp ist aber nur in den *attached-XX* Stämmen zu sehen, und nur dann, wenn viele *nocte*-Männchen geschlüpft sind. Die Penetranz der Mutation ist also abhängig von der Populationsdichte. Das könnte auch erklären, warum sich in den Kulturen des BG-*luc60*, *nocte*/ FM7c Stamms nur Männchen befinden, bei denen die L5-Flügelvene nicht betroffen ist.

Eine Kombination aus meiotischer Rekombination und molekularen SNP-Markern führte letztendlich dazu, dass die *nocte*-Mutante erfolgreich in dem Bereich zwischen CG15245 (9A2) und CG2124 (9D3) kartiert werden konnte. Die Komplementationsversuche mit den Defizienzen und der Duplikation bestätigen dieses Ergebnis: Während die Transheterozygoten aus *Df(1)ED7005* und *nocte* den molekularen Synchronisationsdefekt sowie die Semiletalität und den Flügeldefekt aufzeigen, rettet die *Dp(1;2)v<sup>+</sup>75d* eindeutig sowohl die Semiletalität, den Flügelphänotyp, als auch den Biolumineszenzphänotyp. In dem verbleibenden Intervall konnte in der kodierenden Region des Gens C17255 ein Basenaustausch festgestellt werden, der ein Glutamin in ein Stoppcodon verwandelt. Dadurch fehlen dem 2307 AS großen CG17255-Protein im *nocte*-Hintergrund 601 Aminosäuren des C-Terminus. Es konnte zwar letztendlich nicht vollständig gezeigt werden, dass dieses Gen für den Synchronisationsdefekt der *nocte*-Fliegen verantwortlich ist, die Lage und Natur der erzeugten Mutation legt dies aber sehr nahe.

Für die Verifizierung, ob jener Basenaustausch im Gen CG17255 für den Synchronisationsdefekt verantwortlich ist, stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits die Komplementation mittels eines Expressions-Konstrukts, welches die wildtypische CG17255 cDNA enthält und im mutanten *nocte* Hintergrund exprimiert wird, oder andererseits das gezielte Ausschalten dieses Gens anhand antisense RNA (RNAi) in Wildtyp-Fliegen. Zusätzlich könnten durch unsaubere *jump-outs* von einem der beiden erhältlichen *P*-Elemente kleine Deletionen in der kodierenden Sequenz von CG17255 erzeugt werden, um neue Allele (evtl. Null-Mutanten) dieses Gens zu isolieren (Robertson et al., 1988).

### 4.13 Schematische Darstellung der Ergebnisse

Zusammengefasst lassen sich die erzielten Ergebnisse mit folgender Übersichtsgrafik darstellen:



**Abb. 76. Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.**

Die Temperaturinformation aus der Umgebung scheint über TRP- und DEG/ENaC-Ionenkanäle zur inneren Uhr geleitet zu werden und damit die molekularen Oszillationen zu synchronisieren. Diese Synchronisation involviert sowohl transkriptionelle, als auch post-transkriptionelle Mechanismen.

Alle getesteten, peripheren Gewebe waren in der Lage, Temperatur aufzunehmen und robuste circadiane Rhythmen hervorzubringen. Dagegen können die Oszillatoren im Hirn höchstwahrscheinlich nicht mittels Temperaturzyklen synchronisiert werden und benötigen dazu Signale aus der Peripherie. Die Anwesenheit von CRY scheint dabei die Sensitivität der neuronalen Oszillatoren gegenüber dem Zeitgeber Temperatur zu unterdrücken. Eine maßgebliche Beteiligung der Thermosensoren in den Antennen konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Sowohl *nocte*, als auch *norpA* unterbinden wahrscheinlich die Verschaltung der einzelnen Oszillatoren, was in einem Synchronisationsdefekt der adulten Tiere resultiert.

## Die Proteinsequenz von CG17255

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	5	15	25	35	45	55
CantonS	MSTLGGSERGE	RNAKPKFTAL	DINRMKYNSR	GESSEPSAQK	NQVPRKHGMQ	ILGKVPSARR
BG-luc60	MSTLGGSERGE	RNAKPKFTAL	DINRMKYNSR	GESSEPSAQK	NQVPRKHGMQ	ILGKVPSARR
nocte	MSTLGGSERGE	RNAKPKFTAL	DINRMKYNSR	GESSEPSAQK	NQVPRKHGMQ	ILGKVPSARR
	65	75	85	95	105	115
CantonS	PPANLPSLKA	ETHTSSNNNL	LVSVEGATSG	GAGAGGAAGS	GAAGTNTSHN	NTTAHSGSSG
BG-luc60	PPANLPSLKA	ETHTSSNNNL	LVSVEGATSG	GAGAGGAAGS	GAAGTNTSHN	NTTAHSGSSG
nocte	PPANLPSLKA	ETHTSSNNNL	LVSVEGATSG	GAGAGGAAGS	GAAGTNTSHN	NTTAHSGSSG
	125	135	145	155	165	175
CantonS	TSGGAGSGGG	GTASSSAGGH	LSQQLTHSQH	QHNNNVALGP	NAGKFVNSNN	GSSNNNAGSS
BG-luc60	TSGGAGSGGG	GTASSSAGGH	LSQQLTHSQH	QHNNNVALGP	NAGKFVNSNN	GSSNNNAGSS
nocte	TSGGAGSGGG	GTASSSAGGH	LSQQLTHSQH	QHNNNVALGP	NAGKFVNSNN	GSSNNNAGSS
	185	195	205	215	225	235
CantonS	GSGNKNFKLI	NNSVGSSGGG	GQGGSGGGGS	SGVGGSGSGS	SGGHSVNSPK	TWSAITTGHE
BG-luc60	GSGNKNFKLI	NNSVGSSGGG	GQGGSGGGGS	SGVGGSGSGS	SGGHSVNSPK	TWSAITTGHE
nocte	GSGNKNFKLI	NNSVGSSGGG	GQGGSGGGGS	SGVGGSGSGS	SGGHSVNSPK	TWSAITTGHE
	245	255	265	275	285	295
CantonS	RSGSGQNYGR	QQQQVVPHYQ	SPQFQYEFPT	LDGTVGSGAG	GGSGAGVGS	SGAGKSHYQN
BG-luc60	RSGSGQNYGR	QQQQVVPHYQ	SPQFQYEFPT	LDGTVGSGAG	GGSGAGVGS	SGAGKSHYQN
nocte	RSGSGQNYGR	QQQQVVPHYQ	SPQFQYEFPT	LDGTVGSGAG	GGSGAGVGS	SGAGKSHYQN
	305	315	325	335	345	355
CantonS	QVHHAGHQNH	HQHQQHHQQH	QQHHHQQQQH	HRDYHHGHGR	QYGHHSRDRY	RDGSDDVGGG
BG-luc60	QVHHAGHQNH	HQHQQHHQQH	QQHHHQQQQH	HRDYHHGHGR	QYGHHSRDRY	RDGSDDVGGG
nocte	QVHHAGHQNH	HQHQQHHQQH	QQHHHQQQQH	HRDYHHGHGR	QYGHHSRDRY	RDGSDDVGGG
	365	375	385	395	405	415
CantonS	SADLGELSLR	PQNDTAAWLQ	QQEKAAKVAA	AAAADQGLNL	QGPGHQMGG	NGGAGGSGG
BG-luc60	SADLGELSLR	PQNDTAAWLQ	QQEKAAKVAA	AAAADQGLNL	QGPGHQMGG	NGGAGGSGG
nocte	SADLGELSLR	PQNDTAAWLQ	QQEKAAKVAA	AAAADQGLNL	QGPGHQMGG	NGGAGGSGG
	425	435	445	455	465	475
CantonS	AVPLPILSLM	PSFMRSGAPM	PASGATAASI	LAGGSLDTSA	LPNAPYQNGI	LGARSASPAV
BG-luc60	AVPLPILSLM	PSFMRSGAPM	PASGATAASI	LAGGSLDTSA	LPNAPYQNGI	LGARSASPAV
nocte	AVPLPILSLM	PSFMRSGAPM	PASGATAASI	LAGGSLDTSA	LPNAPYQNGI	LGARSASPAV
	485	495	505	515	525	535
CantonS	VGSGSFRAAT	AIPKRPTSS	SPPQSGLGIG	GSPTPPQSQQ	QANGGAGGAG	RKDKDYVVEP
BG-luc60	VGSGSFRAAT	AIPKRPTSS	SPPQSGLGIG	GSPTPPQSQQ	QANGGAGGAG	RKDKDYVVEP
nocte	VGSGSFRAAT	AIPKRPTSS	SPPQSGLGIG	GSPTPPQSQQ	QANGGAGGAG	RKDKDYVVEP
	545	555	565	575	585	595
CantonS	EVAQMQRPII	REEDLERLNA	IAKDDSWTKQ	DDIDFTKKLA	FSDDESTPEE	HQGQKQHSS
BG-luc60	EVAQMQRPII	REEDLERLNA	IAKDDSWTKQ	DDIDFTKKLA	FSDDESTPEE	HQGQKQHSS
nocte	EVAQMQRPII	REEDLERLNA	IAKDDSWTKQ	DDIDFTKKLA	FSDDESTPEE	HQGQKQHSS
	605	615	625	635	645	655
CantonS	AQLQAQGS	STDQRKLSAS	TTSWQRGKES	TDRDQPSEGI	QDQQQLQQQ	QQQEVRRQN
BG-luc60	AQLQAQGS	STDQRKLSAS	TTSWQRGKES	TDRDQPSEGI	QDQQQLQQQ	QQQEVRRQN
nocte	AQLQAQGS	STDQRKLSAS	TTSWQRGKES	TDRDQPSEGI	QDQQQLQQQ	QQQEVRRQN
	665	675	685	695	705	715
CantonS	GHRGSSGNVG	APVAGGIALD	ASVYERVKQR	KEEEERREME	RKQAAAKKLQ	ELEMKMNSKK
BG-luc60	GHRGSSGNVG	APVAGGIALD	ASVYERVKQR	KEEEERREME	RKQAAAKKLQ	ELEMKMNSKK
nocte	GHRGSSGNVG	APVAGGIALD	ASVYERVKQR	KEEEERREME	RKQAAAKKLQ	ELEMKMNSKK
	725	735	745	755	765	775
CantonS	AAAAALAGAE	GGVSSASVPL	SNEVPPTSAP	LGNASEDEGG	GQGGGGGLNR	RPRGSISSLG
BG-luc60	AAAAALAGAE	GGVSSASVPL	SNEVPPTSAP	LGNASEDEGG	GQGGGGGLNR	RPRGSISSLG
nocte	AAAAALAGAE	GGVSSASVPL	SNEVPPTSAP	LGNASEDEGG	GQGGGGGLNR	RPRGSISSLG
	785	795	805	815	825	835
CantonS	SGVTPTGGAG	GGGGGVSSSS	SAGGDYQGKN	FLTHFQSNLP	PRFQRQQQQQ	QQQLPRLEKS
BG-luc60	SGVTPTGGAG	GGGGGVSSSS	SAGGDYQGKN	FLTHFQSNLP	PRFQRQQQQQ	QQQLPRLEKS
nocte	SGVTPTGGAG	GGGGGVSSSS	SAGGDYQGKN	FLTHFQSNLP	PRFQRQQQQQ	QQQLPRLEKS
	845	855	865	875	885	895
CantonS	ASASSAFDSN	SRYLQKGGVS	GGGGGVSSGA	QANAGQGRSI	SGGYVQRGAS	VGGSSGYGRN
BG-luc60	ASASSAFDSN	SRYLQKGGVS	GGGGGVSSGA	QANAGQGRSI	SGGYVQRGAS	VGGSSGYGRN
nocte	ASASSAFDSN	SRYLQKGGVS	GGGGGVSSGA	QANAGQGRSI	SGGYVQRGAS	VGGSSGYGRN
	905	915	925	935	945	955
CantonS	RHDSSSARED	QDLDDQRFTR	GQDYRQAQAL	PRSISENSHR	KTSVSSAGDD	VLGGSCSSWA
BG-luc60	RHDSSSARED	QDLDDQRFTR	GQDYRQAQAL	PRSISENSHR	KTSVSSAGDD	VLGGSCSSWA
nocte	RHDSSSARED	QDLDDQRFTR	GQDYRQAQAL	PRSISENSHR	KTSVSSAGDD	VLGGSCSSWA

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	965	975	985	995	1005	1015
CantonS	EQTDAEQKVH	HRHREESFSS	SHSHDSAVQI	KILQRPAPQP	SLSEESSTQQ	KQLPASPPQQ
BG-luc60	EQTDAEQKVH	HRHREESFSS	SHSHDSAVQI	KILQRPAPQP	SLSEESSTQQ	KQLPASPPQQ
nocte	EQTDAEQKVH	HRHREESFSS	SHSHDSAVQI	KILQRPAPQP	SLSEESSTQQ	KQLPASPPQQ
	1025	1035	1045	1055	1065	1075
CantonS	KTLTTDPMP	QILRRSVDID	KSGDERAEDK	SALESDDKAK	SAGKVEEDKS	GNKRVSPRSG
BG-luc60	KTLTTDPMP	QILRRSVDID	KSGDERAEDK	SALESDDKAK	SAGKVEEDKS	GNKRVSPRSG
nocte	KTLTTDPMP	QILRRSVDID	KSGDERAEDK	SALESDDKAK	SAGKVEEDKS	GNKRVSPRSG
	1085	1095	1105	1115	1125	1135
CantonS	AACGGRGGRG	YAGSSGGSSV	SGSSSYRGQR	NASDWGSSRG	SGGAGGRRYY	SGSGEQSEHS
BG-luc60	AACGGRGGRG	YAGSSGGSSV	SGSSSYRGQR	NASDWGSSRG	SGGAGGRRYY	SGSGEQSEHS
nocte	AACGGRGGRG	YAGSSGGSSV	SGSSSYRGQR	NASDWGSSRG	SGGAGGRRYY	SGSGEQSEHS
	1145	1155	1165	1175	1185	1195
CantonS	EDVDEECYSS	GGGGAARRSP	KESGNGAPNS	GASANKAGFS	PRGEPSRRGR	GGLSSGGGAS
BG-luc60	EDVDEECYSS	GGGGAARRSP	KESGNGAPNS	GASANKAGFS	PRGEPSRRGR	GGLSSGGGAS
nocte	EDVDEECYSS	GGGGAARRSP	KESGNGAPNS	GASANKAGFS	PRGEPSRRGR	GGLSSGGGAS
	1205	1215	1225	1235	1245	1255
CantonS	ASCYRRQPVG	TGSAGGSGSG	SGRSYGRGLG	YEEYKGQORT	SESETDLDKT	KQNLALSAG
BG-luc60	ASCYRRQPVG	TGSAGGSGSG	SGRSYGRGLG	YEEYKGQORT	SESETDLDKT	KQNLALSAG
nocte	ASCYRRQPVG	TGSAGGSGSG	SGRSYGRGLG	YEEYKGQORT	SESETDLDKT	KQNLALSAG
	1265	1275	1285	1295	1305	1315
CantonS	LHKPSKDDKD	LPALGGEEDK	KTAALAPAHN	TALLAKDELQ	KDAAGRLPLP	PGLAAPGSAV
BG-luc60	LHKPSKDDKD	LPALGGEEDK	KTAALAPAHN	TALLAKDELQ	KDAAGRLPLP	PGLAAPGSAV
nocte	LHKPSKDDKD	LPALGGEEDK	KTAALAPAHN	TALLAKDELQ	KDAAGRLPLP	PGLAAPGSAV
	1325	1335	1345	1355	1365	1375
CantonS	GSVTATSSSV	VVPGAADKKK	IESCAVVGGE	KVTGSKLPAI	GEKTSLGAVG	SGPSTSLLLD
BG-luc60	GSVTATSSSV	VVPGAADKKK	IESCAVVGGE	KVTGSKLPAI	GEKTSLGAVG	SGPSTSLLLD
nocte	GSVTATSSSV	VVPGAADKKK	IESCAVVGGE	KVTGSKLPAI	GEKTSLGAVG	SGPSTSLLLD
	1385	1395	1405	1415	1425	1435
CantonS	AGAPVNTIIF	ENSTYKQQA	AASVVTKPGT	LSVSSSGATM	TVDSLSSALS	QMSFGGKATA
BG-luc60	AGAPVNTIIF	ENSTYKQQA	AASVVTKPGT	LSVSSSGATM	TVDSLSSALS	QMSFGGKATA
nocte	AGAPVNTIIF	ENSTYKQQA	AASVVTKPGT	LSVSSSGATM	TVDSLSSALS	QMSFGGKATA
	1445	1455	1465	1475	1485	1495
CantonS	AGSGDDSQDM	KLGFSGDDP	TTPLKVVNDI	DKTASQQQQQ	QQQQHQQQQ	QQQQQQNNST
BG-luc60	AGSGDDSQDM	KLGFSGDDP	TTPLKVVNDI	DKTASQQQQQ	QQQQHQQQQ	QQQQQQNNST
nocte	AGSGDDSQDM	KLGFSGDDP	TTPLKVVNDI	DKTASQQQQQ	QQQQHQQQQ	QQQQQQNNST
	1505	1515	1525	1535	1545	1555
CantonS	ADLNMKIASV	KKVWESATPM	SDGPSPAQQV	QQQQQQPQQQ	QQSQVQVAAQ	QQQQQVVGPO
BG-luc60	ADLNMKIASV	KKVWESATPM	SDGPSPAQQV	QQQQQQPQQQ	QQSQVQVAAQ	QQQQQVVGPO
nocte	ADLNMKIASV	KKVWESATPM	SDGPSPAQQV	QQQQQQPQQQ	QQSQVQVAAQ	QQQQQVVGPO
	1565	1575	1585	1595	1605	1615
CantonS	QAGDDGSGHM	SAASFVAAVA	ASQHQQQHQ	MPHYAVSAVH	MQSHHHQQQQ	QQQQAAVAAA
BG-luc60	QAGDDGSGHM	SAASFVAAVA	ASQHQQQHQ	MPHYAVSAVH	MQSHHHQQQQ	QQQQAAVAAA
nocte	QAGDDGSGHM	SAASFVAAVA	ASQHQQQHQ	MPHYAVSAVH	MQSHHHQQQQ	QQQQAAVAAA
	1625	1635	1645	1655	1665	1675
CantonS	QAQHHQQQQA	QAHHQHHAHS	SPGPVPGSHG	HGYSHGSPFD	AGSLEQQFQQ	EDYPSPPQQQ
BG-luc60	QAQHHQQQQA	QAHHQHHAHS	SPGPVPGSHG	HGYSHGSPFD	AGSLEQQFQQ	EDYPSPPQQQ
nocte	QAQHHQQQQA	QAHHQHHAHS	SPGPVPGSHG	HGYSHGSPFD	AGSLEQQFQQ	EDYPSPPQQQ
	1685	1695	1705	1715	1725	1735
CantonS	QAHQKTKQLQ	QQQHLGMSPP	PSQQQQQHS	QQQQQAQHQ	QQQQAQHQ	QQQQPSFYQA
BG-luc60	QAHQKTKQLQ	QQQHLGMSPP	PSQQQQQHS	QQQQQAQHQ	QQQQAQHQ	QQQQPSFYQA
nocte	QAHQKTKQLQ	QQQHLGMSPP	PSQQQQ*...	.....	.....	.....
	1745	1755	1765	1775	1785	1795
CantonS	SPQFGVGIP	TIPSPPAVVY	NSSQMPPPSQ	GGNLYAPFHS	LDHSSRSPAY	SAAAAAHSYP
BG-luc60	SPQFGVGIP	TIPSPPAVVY	NSSQMPPPSQ	GGNLYAPFHS	LDHSSRSPAY	SAAAAAHSYP
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1805	1815	1825	1835	1845	1855
CantonS	NPYAAAAAAA	AAAAAGGGPF	NVNVNAYAMQ	TPHGGSLPPT	APTDPMYSNL	SSQFRLGGGP
BG-luc60	NPYAAAAAAA	AAAAAGGGPF	NVNVNAYAMQ	TPHGGSLPPT	APTDPMYSNL	SSQFRLGGGP
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1865	1875	1885	1895	1905	1915
CantonS	GPGPGPFQGP	SSQQLSNPSN	HAAVAISSS	SNSMMSSGAA	KPPQSQQTIG	AIGSKSAGSG
BG-luc60	GPGPGPFQGP	SSQQLSNPSN	HAAVAISSS	SNSMMSSGAA	KPPQSQQTIG	AIGSKSAGSG
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	1925	1935	1945	1955	1965	1975
CantonS	GGPGPGPGPY	ATTQTYMNL	AAPPPQHHPGQ	GGPPPGAHQL	QSNSFYNSA	PGGPSGPQFY
BG-luc60	GGPGPGPGPY	ATTQTYMNL	AAPPPQHHPGQ	GGPPPGAHQL	QSNSFYNSA	PGGPSGPQFY
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1985	1995	2005	2015	2025	2035
CantonS	GGPPPGQNGG	AQSYGLATAA	GMYGHHQGGP	PGSNGPPGPP	QSQHTMGTFN	TPFMNSQLLT
BG-luc60	GGPPPGQNGG	AQSYGLATAA	GMYGHHQGGP	PGSNGPPGPP	QSQHTMGTFN	TPFMNSQLLT
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2045	2055	2065	2075	2085	2095
CantonS	AASINQYRGG	PTPGAAYLKG	NQGQTHMQDS	MGRQLKSPLS	ADMSLGLAKQ	VQSQSPPHH
BG-luc60	AASINQYRGG	PTPGAAYLKG	NQGQTHMQDS	MGRQLKSPLS	ADMSLGLAKQ	VQSQSPPHH
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2105	2115	2125	2135	2145	2155
CantonS	KNYGAWDLQN	QVLQQQQQQS	QQQQQQQQRQ	VGGGNGPSMN	ALGGRGSGAV	SGSGNGGGG
BG-luc60	KNYGAWDLQN	QVLQQQQQQS	QQQQQQQQRQ	VGGGNGPSMN	ALGGRGSGAV	SGSGNGGGG
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2165	2175	2185	2195	2205	2215
CantonS	GGGAGGSQVG	GNGGGNGVGS	VGQSGGGGQG	RYPTPIQRPN	NYPQHPQQQQ	QQQQQ..QQR
BG-luc60	GGGAGGSQVG	GNGGGNGVGS	VGQSGGGGQG	RYPTPIQRPN	NYPQHPQQQQ	QQQQQ..QQR
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2225	2235	2245	2255	2265	2275
CantonS	EQAAAAAVAA	QRAQNMRQVT	GAGGGVAGSA	GGGGSQTPVG	PAGGNGGPGG	AGGGGGAGGA
BG-luc60	EQAAAAAVAA	QRAQNMRQVT	GAGGGVAGSA	GGGGSQTPVG	PAGGNGGPGG	AGGGGGAGGA
nocte	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2285	2295	2305			
CantonS	AGSGPGKPYY	ANNASGAAVA	ANRGEWHAN*			
BG-luc60	AGSGPGKPYY	ANNASGAAVA	ANRGEWHAN*			
nocte	.....	.....	.....			

Dargestellt ist ein Alignment von CG17255-Proteinsequenzen der Stämme *CantonS*, BG-*luc60* und *nocte*. Im *nocte* Stamm befindet sich an Stelle der 1707. Aminosäure ein Translationsstopp. Dieser führt zum Verlust von 601 Aminosäuren am C-terminalen Ende. Sowohl der *nocte*-Stamm, als auch der Kontrollstamm BG-*luc60* weisen gegenüber dem *CantonS*-Stamm bei der 2216. Aminosäure eine Deletion von zwei Glutaminen auf. Besonderes Augenmerk verdienen zudem die poly-Gutamin-Repeats im Bereich der Aminosäuren 1480, 1530, 1700 sowie 2110.

## Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1. Schematisierte Darstellung eines circadianen Systems.
- Abb. 2. Die grundlegende Organisation des circadianen Systems von *Drosophila*.
- Abb. 3. Schema einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife (nach Goodwin):
- Abb. 4. Schema der miteinander vernetzten Rückkopplungsschleifen.
- Abb. 5. Die molekulare Rückkopplungsschleife von PER und TIM.
- Abb. 6. Die Regulation der rhythmischen *Clk*-Transkription in der Nebenschleife.
- Abb. 7. Synchronisation der molekularen Rhythmen durch Licht.
- Abb. 8. Organisation der Uhrneuronen im Fliegenhirn (aus Helfrich-Förster, 2005)
- Abb. 9. Elektroretinogramme von Wildtyp-Fliegen, sowie *norpA*- und *trp*-Mutanten.
- Abb. 10. Aktivierungstemperaturen der thermorezeptiver Trp-Kanäle bei Säugern.
- Abb. 11. Kreuzungsschema der EMS-Mutagenese.
- Abb. 12. Quantitative Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge mit dem LightCycler
- Abb. 13. Detektion der Spleißformen von des 8. Introns im UTR der *period* m-RNA.
- Abb. 14. Die Umsetzung von Luziferin durch Luziferase.
- Abb. 15. Übersicht verwendeter *per-luc* Konstrukte.
- Abb. 16. Die Entstehung eines rhythmischen *per-luc* Biolumineszenz-Summensignals.
- Abb. 17. Perkin-Elmer TopCount NXT und 96-well Microtiterplatte.
- Abb. 18A. Monitor (oben) und Glasröhrchen (unten) für die Analyse der Laufaktivität.
- Abb. 18B. Aktogramm
- Abb. 18C. Daily Average
- Abb. 18D. Periodogram
- Abb. 18E. Autokorrelation
- Abb. 18F. 3-fach geglättetes Aktogramm
- Abb. 19. Formel zur Berechnung des Vertrauensbereichs des Mittelwertes (*standard error of the mean*).
- Abb. 20. Biolumineszenzrhythmen transgener *per-luc* Fliegen in Temperaturzyklen und konstanter Beleuchtung.
- Abb. 21. Summen und Einzelgraphen von XLG-*luc* Tieren im Wildtyp- und *tim*<sup>01</sup>-Hintergrund (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 22. Biolumineszenzrhythmen von *per-luc* Fliegen mit defekter Thermotaxis in Dauerlicht und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C.
- Abb. 23. BG-*luc60* Fliegen im Wildtyp- und *hdc*<sup>JK910</sup>-Hintergrund in LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau)
- Abb. 24. *per-luc* Oszillationen von Kulturen isolierter Fliegengewebe in LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (rot:blau) bzw. in 12:12 h LD-Zyklen (weiß:schwarz) und 25°C.
- Abb. 25. Phasenlage der Biolumineszenz isolierter Fliegengewebe in LD- und Temperaturzyklen.
- Abb. 26. Prozentualer Anteil der einzelnen Gewebe am XLG-*luc* Biolumineszenz-Summensignal in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C; LL).
- Abb. 27. Biolumineszenzrhythmen von BG-*luc60* Fliegen im Wildtyp- und *Clk*<sup>Jrk</sup>-Hintergrund in LL und 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau)

- Abb. 28. Biolumineszenzrhythmen isolierter Gewebe von BG-*luc60*; *Clk<sup>Jrk</sup>*-Fliegen in LL und 10:14 h 25°C:17°C (=rot:blau).
- Abb. 29. Biolumineszenzsignale von isolierten XLG-*luc* Geweben im *tim<sup>01</sup>*-Hintergrund (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 30. Temperaturinduzierte (LL und 10:14 h 25°C:18°C=rot:blau) Biolumineszenzsignale von 8.0-*luc*:9 Adulten und Gewebekulturen.
- Abb. 31. Westernblot mit  $\alpha$ -PER Färbung von Fliegenköpfen und Körpern (LD-Synchronisation, ZT18).
- Abb. 32. Phasenunterschied zwischen separierten 8.0-*luc* Hirnen und Adulten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).
- Abb. 33. Effekt von *per<sup>01</sup>* auf das 8.0-*luc* Biolumineszenzsignal (LL, 10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).
- Abb. 34. 8.0-*luc* Expression im *cry<sup>b</sup>*- und *norpA<sup>P41</sup>*; *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 35. Summen- und Einzelgraphen von 8.0-*luc*:9-Tieren im Wildtyp und *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C, LL).
- Abb. 36. Temperatursynchronisation der Lokomotorrhythmik von *per<sup>01</sup>* Fliegen mit verschiedenen *period*-Konstrukten.
- Abb. 37. Spleißen des 8. Introns im 3'-UTR der *period* m-RNA (in LL und 12:12 h 25°C:18°C=rot:blau).
- Abb. 38. Gelphotographie der verschiedenen *period* Spleißformen im Wildtyp und in *norpA*-Mutanten während Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C=rot:blau, LL).
- Abb. 39. Temperaturinduzierte Biolumineszenz von XLG-*luc* und *plo* (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).
- Abb. 40. Biolumineszenzrhythmen von *plo*-Gewebekulturen in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 41. Temperaturinduzierte RNA-Oszillationen in den Köpfen von Wildtyp-Fliegen.
- Abb. 42. Biolumineszenzrhythmen von XLG-*luc* Fliegen in LL und verschiedenen Temperaturintervallen: A) 20°C:16°C B) 25°C:17°C C) 30°C:25°C.
- Abb. 43. Biolumineszenz verschiedener Trp-Kanal-Mutanten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau).
- Abb. 44. Inhibierung der TRP-Kanäle in isolierten Beinen und Köpfen in (A) 12:12 h LD-Zyklen (=weiß:schwarz), oder (B) Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 45. Inhibition von DEG/ENAC-Kanälen in Kulturen isolierter Flügel und Beine in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 46. Inhibition amiloridsensitiver Ionenkanäle in adulten XLG-*luc*-Fliegen in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL; oben) und 12:12 h LD-Zyklen (unten; weiß:schwarz).
- Abb. 47. Biolumineszenzdaten von BG-*luc60*-Fliegen im *nocte*- und *cry<sup>b</sup>*-Hintergrund.
- Abb. 48. Temperaturinduzierte Summen- und Einzelgraphen von BG-*luc60*-Fliegen mit Wildtyp- oder *nocte*-Hintergrund.
- Abb. 49. Biolumineszenzrhythmen der *norpA*-Mutante in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL) und LD-Zyklen (weiß:schwarz).
- Abb. 50. Temperaturinduzierte Summengraphen und Einzelgraphen von XLG-*luc* Fliegen im Wildtyp- und *norpA<sup>P41</sup>*-Hintergrund.
- Abb. 51. Temperaturinduzierte Biolumineszenzrhythmen in Gewebekulturen von *norpA<sup>P41</sup>*; XLG-*luc* und BG-*luc60*, *nocte*-Fliegen.
- Abb. 52. Phasenplot der Biolumineszenzdaten isolierter Gewebe von (A) *norpA<sup>P41</sup>* und

- (B) *nocte* in Temperaturzyklen (10:14h 25°C:17°C, LL).
- Abb. 53. Temperaturinduzierte Biolumineszenzsignale isolierter Hirne von *norpA*<sup>P41</sup>; *XLG-luc* und *BG-luc60*, *nocte*-Fliegen.
- Abb. 54. Oszillationen der Proteine PER und TIM in den Köpfen wildtypischer und mutanter Fliegen während Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C, LL).
- Abb. 55. Lichtsynchronisierte PER-/TIM-Oszillationen in *nocte* und Wildtyp-Fliegen.
- Abb. 56. Quantifizierung der  $\alpha$ -PER-Färbungen in den Uhrneuronen von *CantonS*- und *nocte*-Fliegen in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C=rot:blau, LL).
- Abb. 57. Antikörperfärbungen ( $\alpha$ -PER) an *CantonS*- und *nocte*-Fliegenhirnen zu ZT 20 und ZT 8 in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C, LL).
- Abb. 58A. Durchschnittstagesaktivität verschiedener Genotypen in LD und konst. 25°C.
- Abb. 58B. Tagesaktivität verschiedener Genotypen in LL und Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C).
- Abb. 58C. Tagesaktivität verschiedener Genotypen in LL und Temperaturzyklen (12:12 h 29°C:20°C).
- Abb. 59. Aktogramme von Fliegen in Dauerlicht (LL) und 12:12 h 25°C:18°C.
- Abb. 60. Phasenanalyse der Lokomotorrhythmik in um 6 h nach vorne versetzten Temperaturzyklen (LL und 12:12h 25°C:18°C).
- Abb. 61. Lokomotorverhalten von *tvm53*-Fliegen in (A) Licht- und (B) Temperaturzyklen
- Abb. 62. Biolumineszenzdaten der spontanen Mutante *tvm53* in (A) LL und Temperaturzyklen 10:14 h 25°C:17°C (rot:blau) sowie (B) LD-Zyklen und konst. 25°C (weiß:schwarz).
- Abb. 63. Kartierung mittels meiotischer Rekombination: Kreuzungsschema und Marker.
- Abb. 64. Biolumineszenz der entscheidenden Rekombinanten in Temperaturzyklen.
- Abb. 65. Rettung des *nocte*-Phänotyps mit der *Dp(1;2)v<sup>+</sup>75d* in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 66. Analyse der Rekombinanten bzgl. Bruchpunkte mittels visueller und molekularer Marker.
- Abb. 67. Biolumineszenzrhythmen von *Df(1)ED7005* über dem *nocte* oder Wildtyp-Chromosom in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 68. Verkürzung der L5-Flügelvene bei *nocte* Fliegen.
- Abb. 69. Gene und Defizienzen im Bereich von 8D12 bis 10A6.
- Abb. 70. Biolumineszenzrhythmen molekularer Defizienzen über dem *nocte*-Chromosom in Temperaturzyklen (10:14h 25°C:17°C=rot:blau, LL).
- Abb. 71. Durchschnittstage der Lokomotorrhythmik verschiedener Fliegenweibchen in Temperaturzyklen (12:12 h 25°C:18°C, LL).
- Abb. 72. Screenshot: Vergleich der CG17255-Sequenz im *BG-luc60*- und *nocte* -Hintergrund.
- Abb. 73. Analyse des Gens CG17255: P-Insertionen, Transkripte und Proteindomänen.
- Abb. 74. Sequenzalignment des humanen BAT2-Proteins mit verwandten Proteinen aus verschiedenen Organismen.
- Abb. 75. GlobPlot-Analyse des CG17255 Proteins (nach Russel, Linding).
- Abb. 76. Abb. 76. Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.



## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.	Übersicht der identifizierten Trp-Kanäle in <i>Drosophila</i> .
Tab. 2.	Übersicht der DEG /ENaC-Kanäle in <i>Drosophila</i> .
Tab. 3.	Oligonukleotide für den Spleissassay und die quantitative RT-PCR der <i>period</i> und <i>timeless</i> m-RNA.
Tab. 4.1	Oligonukleotide zur Bestimmung der Sequenzpolymorphismen.
Tab. 4.2	Oligonukleotide zur Bestimmung der Sequenzpolymorphismen.
Tab. 5.1	Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.
Tab. 5.2	Auflistung der verwendeten Fliegenstämme.
Tab. 6.	Auflistung der verwendeten Antikörper.
Tab. 7.	Auflistung der verwendeten NCBI-Suchalgorithmen.
Tab. 8.	FFT-NLLS Analyse der Biolumineszenzdaten isolierter Körperteile von XLG- <i>luc</i> -Fliegen.
Tab. 9.	Die Signalstärken einzelner isolierten XLG- <i>luc</i> Körperteile in Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C; LL).
Tab. 10.	FFT-NLLS-Analyse der Biolumineszenz isolierter Körperteile von BG- <i>luc60</i> -Fliegen im <i>Clk<sup>Jrk</sup></i> - und Wildtyp-Hintergrund in Temperaturzyklen und LL.
Tab. 11.	FFT-Analyse der Biolumineszenz isolierte Hirne von <i>per-luc</i> Fliegen in verschiedenen genetischen Hintergründen (in LL und Temperaturzyklen bzw. LD und konst. 25°C).
Tab. 12.	FFT-Analyse der 8.0- <i>luc</i> Biolumineszenzdaten in LL und Temperaturzyklen (10:14 h 25°C:17°C).
Tab. 13.	FFT-Analyse der Biolumineszenz verschiedener <i>per-luc</i> Reporterkonstrukte.
Tab. 14.	FFT-Analyse der Biolumineszenzrhythmen separierter Körperteile von <i>plo</i> - und <i>NOG-luc</i> Fliegen in Temperaturzyklen.
Tab. 15.	FFT-Analyse der Biolumineszenzrhythmen in verschiedenen Temperaturbereichen.
Tab. 16.	FFT-Analyse der Biolumineszenzdaten transgener <i>per-luc</i> Fliegen verschiedener genetischer Hintergründe in LD und 25°C, oder 10:14 h 25°C:17°C und Dauerlicht (LL) oder Dauerdunkel (DD).
Tab. 17.	Biolumineszenz-FFT-Analyse der <i>norpA</i> und <i>nocte</i> Gewebekulturen.
Tab. 18.	Lokomotorverhalten in konstanten Bedingungen (DD, 25°C).
Tab. 19.	Karte der Sequenzpolymorphismen zwischen dem X-Chromosom von <i>nocte</i> und des Multimarkerstamms <i>y cv v f car</i> (MM).
Tab. 20.	Übersicht von Vitalität und Flügelvenendefekt der Defizienzen und Duplikationen im <i>nocte</i> -Hintergrund.
Tab. 21.	Sequenzierung ausgewählter Gene im Bereich von 9B4 bis 9D2.
Tab. 22.	Auflistung verschiedener Bindestellen und Substratmotive innerhalb des CG17255-Proteins.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation zielte primär darauf ab, Einblicke in die molekularen Grundlagen der circadianen Temperatursynchronisation von *Drosophila*, einschließlich der involvierten Mechanismen und Rezeptoren zu gewähren. Weiteres Hauptaugenmerk lag dabei auf der Kartierung einer EMS-induzierten Mutante, welche einen spezifischen Defekt in der Temperaturaufnahme durch die innere Uhr aufweist, und somit einen essentiellen Faktor innerhalb der Temperatursynchronisation darstellt.

Im Rahmen der ersten Zielsetzung konnten viele Aspekte aufgedeckt werden, die eine breite Basis für weiterführende Untersuchungen dieses Themas bilden. Analog zum Lokomotorverhalten können Temperaturzyklen die Oszillationen der molekularen Uhrkomponenten in Dauerlicht (LL) induzieren, obwohl LL üblicherweise Arrhythmizität verursacht. Somit muss die zugrunde liegende Degradierung des TIMELESS-Proteins, die durch den circadianen Photorezeptor CRYPTOCHROM vermittelt wird, blockiert werden. Darüber hinaus führt die genetische Ablation von CRY in Temperaturzyklen zu einer Verstärkung der molekularen Oszillationen im neuronalen Gewebe, was einerseits eine Interaktion zwischen dem Licht- und Temperaturinputweg enthüllt und andererseits demonstriert, dass CRY die Sensitivität des circadianen Systems reguliert. Dies kann auch als mögliche Erklärung herangezogen werden, weshalb die Temperatursynchronisation des Verhaltens in konstantem Licht besser funktioniert, als in konstanter Dunkelheit (Yoshii et al., 2002).

Keinem der bekannten Temperaturrezeptoren, die für die Thermotaxis verantwortlich sind, konnte eine Beteiligung an der circadianen Perzeption der Temperatur nachgewiesen werden. Hingegen lassen die Ergebnisse eine mögliche Involvierung der TRP- und DEG/ENaC-Kanäle bei der Übermittlung der Temperaturinformation an die innere Uhr vermuten. Zudem wurde demonstriert, dass die circadiane Thermorezeption gewebeunabhängig erfolgt, was auf einen zellautonomen Rezeptor bzw. Signalweg hinweist. Die temperaturinduzierte Biolumineszenz von *Clk*- und *timeless*-Mutanten brachte ans Licht, dass zum einen die Rhythmen der Peripherie die Oszillationen der inneren Uhr widerspiegeln, und zum anderen separierte Hirne höchstwahrscheinlich nicht mittels Temperaturzyklen synchronisiert werden können. Weiterführende Experimente bestätigten zudem, dass das Fliegenhirn zur Temperatursynchronisation auf Signale aus der Peripherie angewiesen ist.

Im Gegensatz zur Lichtsynchronisation setzt das Temperatur-Entrainment sowohl transkriptionale, als auch post-transkriptionale Mechanismen voraus. Jedoch nicht daran

involviert ist ein temperaturabhängiges, alternatives Spleiß-Ereignis, welches der circadianen Uhr zur Anpassung an saisonale Schwankungen dient.

Darüber hinaus gelang es, mit *norpA* eine weitere Temperatur-Entrainment-Mutante zu identifizieren, die zusammen mit der *nocte*-Mutante charakterisiert wurde. Beide zeigen einen Defekt in der Temperatursynchronisation, der nicht die Aufnahme der Temperatur in den einzelnen Geweben betrifft, sondern möglicherweise einen Defekt in der Kopplung zwischen peripheren und neuronalen Oszillatoren zur Ursache hat. Dies resultiert darin, dass in Temperaturzyklen die adulten Fliegen beider Mutanten einerseits keine rhythmischen Biolumineszenzsignale hervorbringen, und andererseits die Lokomotorrhythmik lediglich direkte Effekte der Temperatur reflektiert.

Letztendlich enttarnte eine Kartierung die *nocte*-Mutation als Basenaustausch in der kodierenden Sequenz des Gens CG17255. Dieser Austausch fügt einen frühzeitigen Translations-Stopp ein, wodurch dem 2307 AS großen Protein die C-terminalen 601 AS fehlen. Als Nebeneffekt der Kartierung konnte zudem eine spontane Temperatur-Entrainment-Mutante aufgespürt werden, die einen weiteren Ansatzpunkt für die Analyse des Mechanismus der Temperatursynchronisation bereitstellt.

## 7. Glossar

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
abl.	ablatiert
bp	Basenpaare (Längenangabe für DNA)
biz	bizarre
BSA	Rinderserumalbumin (Protein)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	zur m-RNA komplementäre DNA („ <i>copy</i> “ oder „ <i>complementary</i> “)
ca.	circa
CG	„ <i>computed gene</i> “ annotiertes Gen
CLK	Clock
cM	centiMorgan (Einheit der Rekombinationshäufigkeit)
CPS	Signale pro Sekunde (counts per second)
CYC	Cycle
CRY	Cytochrom
D(a)	Dalton (Atom-/Molekulargewicht)
DD	Dauerdunkel, konstante Dunkelheit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DN	dorsale Neuronen
DNA	„ <i>desoxyribonucleinacid</i> “ Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	" <i>expressed sequence tag</i> "
et al.	„ <i>et altera</i> “ = und andere
EtOH	Ethanol
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
FFT-NLLS	„ <i>fast fourier transformation non-linear least square</i> “
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase

hdc	Histidindecaboxylase
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
kb	kilo-Basen-Paare (Längenangabe für DNA)
kD	kilo-Dalton (Massenangabe bei großen Molekülen)
LL	Dauerlicht
LD	Licht-Dunkel
LN	laterale Neuronen
LNd	dorsale laterale Neuronen
Log	Logarithmus
LPN	laterale posteriore Neuronen
Lsg.	Lösung
luc	Luziferase
Mbp	Megabasenpaare = 1000000 Basen
Min.	Minute(n)
mM	millimolar
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “, Boten-RNA
n	„numera“=Anzahl
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen eines Gens („ <i>open reading frame</i> “)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per-Arndt_SIM- Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER	PERIOD
pers.	persönlich
PLC	PhospholipaseC
Pos.	Position
rel.	relativ
Rel.Amp.F.	relativer Amplitudenfehler
RI	Rhythmizitätsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rhy.	rhythmisch
RS	Rhythmusstärke
s.o.	siehe oben
Sek.	Sekunde(n)

SEM	„ <i>standard error of the mean</i> “ = Vertrauensbereich des Mittelwertes
SNP	„single nucleotide polymorphism“ (Einzelnukleotidpolymorphismus)
ss	spineless
SW	schwarz-weiss
T	Periode des Zeigebers
$\tau$	Freilaufperiode eines circadianen Systems
Tab.	Tabelle
TIM	TIMELESS
UTR	nicht-translatierte Region einer RNA
UV	ultraviolettes Licht
u.a.	unter anderem
WT	Wildtyp
$^w/v$	Gewicht pro Volumen (Volumenprozent)
ZT	„ <i>zeitgeber time</i> “= Zeitgeberzeit
zytol.	zytologisch

## 8. LITERATURVERZEICHNIS (alphabetisch)

Adams M. D. et al., (2000) The genome of *Drosophila melanogaster*. *Science* 24, 287(5461): 2185-95.

Akten B.E. Jauch G K. Genova E.Y., Kim I., Edery I., Raabe T. and Jackson F.R. (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.* 6: 251-257.

Allada R., White N.E., So W.V., Hall J.C., and Rosbash, M. (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93: 791-804.

Alsulaib W.A., and Mathew M.V. (2005) Transient K<sup>+</sup> Current is blocked by Lanthanum in *Drosophila* Neurons. *Neurochem. Res.* 30(9): 1087-1092.

Andretic R., and Hirsh J. (2000) Circadian modulation of dopamine receptor responsiveness in *Drosophila melanoaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(4): 1873-1878.

Aronson B.D., Johnson K.A., and Dunlap J.C. (1994). Circadian clock locus *frequency*: a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7683–7687.

Ashburner M. (1989) *Drosophila* – a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)

Askwith C.C., Benson C.J., Welsh M.J., and Snyder P.M. (2001) DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(11):6459-6463.

Bae K., Lee C., Hardin P. E., and Edery I. (2000) dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex. *J. Neurosci.* 20: 1746-1753.

Bao S., Rihel J., Bjes E., Fan J.Y., and Price J.L. (2001) The *Drosophila* *doubletime* mutation delays the nuclear accumulation of *period* protein and affects the feedback regulation of *period* mRNA. *J. Neurosci.* 21: 7117-7126.

Baylies M.K., Bargiello T.A., Jackson F.R. and Young M.W. (1987) Changes in abundance or structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature* 326: 390-392.

Beaver L.M., Rush B.L., Gvakharia B.O., and Giebultowicz J.M. (2003) Non-circadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms* 18:463-472.

- Bell-Pedersen D., Cassone V.M., Earnest D.J., Golden S.S., Hardin P., Thomas T.L., and Zordan M.J. (2005) Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms. *Nature Rev. Genet.* 6: 544-556.
- Belvin M.P., Zhou H., Yin J.C.P. (1999) The *Drosophila* dCREB2 gene affects the circadian clock. *Neuron* 22:777-787.
- Benzer S. (1967) Behavioral Mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1112-1119.
- Berger J., Suzuki T., Senti K., Stubbs J., Schaffner G., and Dickson B. (2001) Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. *Nature* 29: 475-481.
- Berson D.M., Dunn F.A., and Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073.
- Blau J and Young M.W. (1999) Cycling *vriple* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99: 661-671.
- Blau J. (2003) A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nat Neurosci.* 6(3):208-10.
- Blázquez M.A., Ahn J.H., and Weigel D. (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 33: 168-171.
- Bloomquist B.T., Shortridge R. D., Schneuwly S., Perdew M., Montell C., Stellar H., Rubin G., and Pak W. L. (1988) Isolation of putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA* and its role in phototransduction. *Cell* 54, 723-733.
- Brandes C., Plautz J.D., Stanewsky R., Jamison C.F., Straume M., Wood K.V., Kay S.A., and Hall J.C. (1996) Novel features of *Drosophila period* transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 16, 687-692.
- Bretzl H. (1903) Botanische Forschung des Alexanderzuges, Leipzig: B.G. Teubner Vlg.
- Brown S.A., Zimbrunn G., Fleury-Olela F., Preitner N., and Schiebeler U. (2002) Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Curr. Biol.* 12: 1574-1583
- Brown B.R. (2003) Sensing temperature without ion channels. *Nature* 421: 495.
- Busza A., Emery-Le, M., Rosbash M., and Emery P. (2004) Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304, 1503-1506.
- Bullock T.H., and Diecke F.P.J. (1956) Properties of an infrared receptor. *J. Physiol.* 134: 47-87.



Bünning E. (1932) *Jahrb. Wiss. Bot.* 77:283-320.

Bünning E. (1958) Tagesperiodische Bewegungen. *Encyclopedia Plant Physiol.* XVII, 1, 579-656.

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

Ceriani M.F., Darlington T.K., Staknis D., Mas P., Petti A.A., (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285: 553-556.

Ceriani M.F., Hogenesch J.B., Yanovsky M., Panda S., Straume M., and Kay S.A. (2002) Genome-Wide Expression Analysis in *Drosophila* reveals Genes controlling Circadian Behavior. *J. Neurosci.* 22(21): 9305-9319.

Chentsova N.A., Gruntenko N.E., Bogomolova E.V., Adonyeva N.V., Karpova E.K., and Rauschenbach I.Y. (2002) Stress response in *Drosophila melanogaster* strain *inactive* with decreased tyramine and octopamine contents. *J. Comp. Physiol B.* 172: 643-650.

Clapham D.E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.

Claridge-Chang A., Wijnen H., Naef F., Boothroyd C., Nikolaus Rajewsky N., and Young M.W. (2001) Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32, 657–671.

Collins B., Mazzoni E.O., Stanewsky R., Blau J. (2006) *Drosophila* cryptochrome is a transcriptional repressor. *Curr. Biol.* 16: 441-449.

Collins B.H., Dissel S., gaten E., Rosato E., Kyriacou C.P. (2005) Disruption of cryptochrome partially restores circadian rhythmicity to the arrhythmic *period* mutant of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(52):19021-19026.

Collins B.H., Rosato E., and Kyriacou C.P. (2004) Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 1945-1950.

Colot H.V., Loros J.V., and Dunlap J.C. (2006) Temperature-modulated Alternative Splicing and Promoter Use in the Circadian Clock Gene *frequency*. *Mol. Biol. Cell* 16:5563-5571.

Cosens D.J., and Manning A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 285-287.

Courey A. J., and Tjian R. (1988) Analysis of SP1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine rich activation motif. *Cell* 55: 887–898.

- Crowley S.J., Lee C., Tseng C.Y., Fogg L.F., and Eastman C.I. (2003) Combinations of bright light, scheduled dark, sunglasses, and melatonin to facilitate circadian entrainment to night shift work. *J. Biol. Rhythms* 18: 513-523.
- Curtin K.D., Huang Z.J., Rosbash M. (1995) Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron* 14: 363-372.
- Cyran S.A., Buchsbaum A.M., Reddy K.L., Lin M.C., Glossop N.R., Hardin P.E., Young M.W., Storti R.V., and Blau J. (2003) *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112, 329-41.
- Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., and Schiebler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.
- Darlington T., Wager-Smith K., Ceriani M.F., Staknis D., Gekakis N., Steeves T., Weitz C., Takahashi J., Kay S.A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors, *per* and *tim*. *Science* 280: 1599-1603.
- DasGupta R., Kaykas A., Moon R.T., and Perrimon N. (2005) Functional Genomic Analysis of the Wnt-Wingless Signaling Pathway. *Science* 308: 826-833.
- deCandolle A.P. (1832) Du sommeil des feuilles. pp. 854-862 in *Physiologie Vegetate, Exposition des Forces et des Fonctions Vitales des Vegetaux*. Paris, Bechet Jeune: Libraire de la Faculte de Medicine.
- DeCoursey P.J. (1960) Daily light sensitivity rhythm in a rodent. *Science* 131:33-35.
- deMairan J.J. (1729) Observation botanique. *Histoire de L'Academie royale des sciences*, Paris, p.35-36.
- Diernfellner A.C.R., Schafmeier T., Merrow M.W., and Brunner M. (2005) Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 19: 1968-1973.
- Dockendorff T.C., Su H.S., McBride S.M.J., Yang Z., Choi C.H., Siwicki K.K., Sehgal A., and Jongens T.A. (2002) *Drosophila* Lacking *dfmr1* Activity Show Defects in Circadian Output and Fail to Maintain Courtship Interest. *Neuron* 34: 973-984.
- Doi M., Hirayama J., and Sassone-Corsi P. (2006) Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125: 497-508.
- Drake C.L., Roehrs T., Richardson G., Walsh J.K., and Roth T. (2004) Shift work sleep disorder: prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers. *Sleep* 27: 1453-1462.

- Duhamel duMonceau H.L. (1758) *La Physique des Arbres*. Paris: Guerin & Delatour.
- Dunlap J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Dunlap J.C, Loros J.J., and Decoursey P.P. (2003) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. (Sunderland: Sinauer Associates)
- Dushay M.S., Rosbash M., Hall J.C. (1989) The *disconnected* visual system mutation in *Drosophila melanogaster* drastically disrupts circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 4: 1-27.
- Eastman C.I., Stewart K.T., Mahoney M.P., Liu L., and Fogg L.F. (1994) Dark goggles and bright light improve circadian rhythm adaption to night-shift work. *Sleep* 17: 535-543.
- Edery I., Rutila J.E., and Rosbash M. (1994a) Phase shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophila period* protein. *Science* 263, 237-240.
- Edery I., Zwiebel L.J., Dembinska M.E., and Rosbash M. (1994b) Temporal Phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2260-2264.
- Edwards M.C. and Gibbs R.A. (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications* 3: S65-S75.
- Egan E.S., Franklin T.M., Hilderbrand-Chae M.J., McNeil G.P., Roberts M.A., Schroeder A.J., Zhang X., Jackson F.R. (1999) An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci.* 19 (10): 3665-3673.
- Elliott W.J. (2001) Timing treatment to the rhythm of disease: A short course in chronotherapeutics. *Postgrad. Med.* 110: 119-129.
- Ellis R.J. and van der Vies S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Emery I.F., Noveral J.M., Jamison C.F., and Siwicki K.K. (1997) Rhythms of *Drosophila period* gene expression in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 4092-4096.
- Emery P., So W., V., Kaneko M., Hall J.C., Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 26: 493--504.
- Emery P., Stanewsky R., Helfrich-Förster C., Emery-Le M., Hall J.C., Rosbash M. (2000b) *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26: 493--504.
- Erbel P.J.A., Card P.B., Karakuzu O., Bruick R.K., and Gardner K.H. (2003) Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *PNAS* 100(26):15504-15509.

- Ewer J., Frisch B., Hamblen-Coyle M. J., Rosbash M., Hall J.C. (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.* 12: 3321--3349.
- FlyBase. (1992) The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Research* 27: 85--88. <http://flybase.bio.indiana.edu/>.
- Förster C., and Engelmann W. (1988) *Thalassomyxa australis* rhythmicity III. Entrainment by combination of different zeitgeber. *J. interdiscipl. Cycle Res.* 19, 275-288.
- Freedman M.S., Lucas R.J., Soni B., von Schantz M., Munoz M., David-Gray Z. and Foster R. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 502-504.
- Frings S., Lynch J.W., and Lindemann B. (1992) Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J. Gen. Physiol.* 100, 45--67.
- Frisch B., Hardin P.E., Hamblen-Coyle M.J., Rosbash M., and Hall J.C. (1994) A promoterless *period* gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12, 555-570.
- Garty H., and Palmer L.G. (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77, 359--396.
- Gloor G. B., Preston C. R., Johanson-Schlitz D. M., Nassif N. A., Philis R. W., Benz W. K., Robertson H. M., Engels W. R. (1993) Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 135: 81-95.
- Glossop N.R., Houl J.H., Zheng H., Ng F.S., Dudek S.M., and Hardin P.E. (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of *Clock* in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37, 249-261.
- Giebultowicz J., Stanewsky R., Hall J. C., Hege D. (2000a) Transplanted *Drosophila* excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. *Curr. Biol.* 10: 107-111.
- Giebultowicz J. (2000b) Molecular mechanisms and Cellular Distribution of Insect Circadian Clocks. *Annu. Rev. Entomol.* 45:769-793.
- Giebultowicz J., and Hege D. (1997) Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature* 386:664
- Glaser F.T., and Stanewsky R. (2005) Temperature Synchronization of the *Drosophila* Circadian Clock. *Curr. Biol.* 15(15): 1352-1363.

- Grima B., Lamouroux A., Chelot E., Papin C., Limbourg-Bouchon B., Rouyer F. (2002) The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins PER and TIM. *Nature* 420: 178-182
- Grima B., Chelot 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.
- Grushko O.G, Sharakhova M.V, Shevchenko A.I, Karagodin D.A, Karamysheva T.V, Rubtsov N.B, and Stegny V.N (2004) Characterization and Comparative Analysis of DNA from the Pericentric Heterochromatin of Chromosome 2 of *Anopheles atroparvus* V. Tiel (*Culicidae*, *Diptera*) *Russ. J. of Gen.* (40)10: 1085–1094.
- Guo H., McKinley J., Champhekar A., Harris R.B.S., and Bittman E.L. (2005) Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(8): 3111-3116
- Halberg F. (1959) Physiologic 24-hour periodicity: General and procedural with reference to the adrenal cycle. *Z. Vitamin, Hormon-u. Fermentforsch.* 10:225-296.
- Halket, A. C. (1931) The flowers of *Silene saxifrage* L.; an inquiry into the cause of their day closure and the mechanism concerned in effecting their periodic movements. *Annals of Botany* 45: 15-37.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall J.C. (1995) Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* 18, 230-240.
- Hall J.C. (2000) Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Curr. Opinion Neurobiol.* 10: 456-466.
- Hamblen-Coyle M.J., Wheeler D.A., Rutila J.E., Rosbash J.E., and Hall J.C. (1992) Behavior of period-altered circadian rhythm mutants of *Drosophila* in light:dark cycles. *J. Insect Behav.* 5: 417-446
- Hamblen M.J., White N.E., Emery P.T.J., Kaiser K., and Jeffrey C. Hall (1998) Molecular and Behavioral Analysis of Four *period* Mutants in *Drosophila melanogaster* Encompassing Extreme Short, Novel Long, and Unorthodox Arrhythmic Types. *Genetics* 149: 165-178
- Handler A.M., and Konopka R.J. (1979) Transplantation of a pacemaker in *Drosophila*. *Nature* 279: 236-238
- Hao H., Allen D.L., and Hardin P.E. (1997) A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3687-3693.

- Hao H., Glossop N.R.J., Lyons L., Qiu J., Morrish B., Cheng Y., Helfrich-Förster C., and Hardin P. (1999) The 69 bp circadian regulatory sequence (CRS) mediates *per*-like developmental spatial, and circadian expression and behavioral rescue in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 19: 987-994
- Hardie R.C., and Minke B. (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup>-channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron.* 8(4):643-51.
- Hardie R.C., and Mojet M.H. (1995) Magnesium-dependent block of the light-activated and *trp*-dependent conductance in *Drosophila* photoreceptors. *J. Neurophysiol.* 74(6):2590-9.
- Hardie R.C. (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 204, 3403-3409.
- Hardie R.C. and Raghu P. (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 412: 186-193
- Hardin P.E. (1994) Analysis of *period* mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Molec. Cell. Biol.* 14: 7211-18
- Hardin P.E. (2005) The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15: R714-R722.
- Hattar S., Lucas R.J., Mrosovsky N., Thompson S., Douglas R.H., Hankins M.W., Lem J., Biel M., Hofmann F., Foster R.G., et al. (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76-81.
- Helfrich C., and Engelmann W. (1983) Circadian rhythm of the locomotor activity in *Drosophila melanogaster* and its mutants 'sine oculis' and 'small optic lobes'. *Physiol. Entomol.* 8: 257-272.
- Helfrich-Förster C. (1995) The *period* clock gene is expressed in central nervous system 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. (1997) Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 380:335–354.
- 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., Stengl M., and Homberg U. (1998) Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol. Int.* 15:567–594.

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 J.C., and Stanewsky R. (2001) The circadian clock of *Drosophila* is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30, 1-20.

Helfrich-Förster C., Edwards T., Yasuyama K., Wisotzki B., Schneuwly S., Stanewsky R., Meinertzhagen I., 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. Techn.* 62, 94–102.

Helfrich-Förster C. (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav.* 4(2):65-76.

Herzog E.D., and Huckfeldt R.M. (2003) Circadian Entrainment to Temperature, But Not Light, in the Isolated Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurophysiol.* 90: 763-770.

Hildebrandt G., Moser M., and Lehofer M. (1998) Chronobiologie und Chronomedizin. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.

Hochstrate P. (1989) Lanthanum mimics the trp photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. *J. Comp. Physiol. A* 166:179-188.

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

Hong S., Bang S., Paik D., Kang J., Hwang S., Jeon K., Chun B., Hyun S., Lee Y., and Kim J. (2006) Histamine and its receptor modulate temperature-preference behaviour in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 26 (27): 7245-7256.

Hoskins R.A., Phan A.C., Naeemuddin M., Mapa F.A., Ruddy D.A., Ryan J.J., Young L.M., Wells T., Kopczynski C., Ellis M.C. (2001) Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic Mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11(6):1100-13.

Hrushesky W., Wood P., Levi F., vonRoemeling R., Bjanarson G., Focan C., Meier K., Cornelissen G., and Halberg F. (2004) A recent illustration of some essentials of circadian chronotherapy study design. *J. Clin. Oncol.* 22: 2971-2972

Huber A., Sander P., Gobert A., Bähner M., Hermann R., and Paulsen R. (1996) The transient receptor potential protein (Trp), a putative store-open  $\text{Ca}^{2+}$  channel essential for

phosphoinositide-mediated photoreception, forms a signalling complex with NorpA, InaC and InaD. *EMBO J.* 15(24) 7036-7045.

Huelsken J. and Behrens J. (2002) The Wnt-Signaling pathway. *J. Cell Sci.* (15) 3977-3978.

Hyun S, Lee Y, Hong ST, Bang S, Paik D, Kang J, Shin J, Lee J, Jeon K, Hwang S, Bae E, Kim J. (2005) *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* 48(2):267-78.

Inoue B., Shimoda M., Nishinokubi I., Siomi M. C., Okamura M., Nakamura A., Kobayashi S., Ishida N., and Siomi H. (2002) A role for the *Drosophila* fragile X-related gene in circadian output. *Curr. Biol.* 12, 1331–1335.

Ismailov I.I., Fuller C.M., Berdiev B.K., Shlyonsky V.G., Benos D.J., Barrett K.E.(1996) A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19):10505-9.

Ivanchenko M., Stanewsky R., and Giebultowicz J.M. (2001) Circadian photoreception in *Drosophila*: Functions of *cryptochrome* in peripheral and central clocks. *J. Biol. Rhythms* 16, 205-215.

Jenkins J.B., and Tompkins L. (1990) Effects of amiloride on taste responses of *Drosophila melanogaster* adults and larvae. *J. Insect. Physiol.* 36:613–618.

Jiang J., and Struhl G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein growth and signalling. *Biochem. J.* 353, 417–439.

Johansson J., Mandin P., Renzoni A., Chiaruttini C., Springer M., and Cossart P. (2002) An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell.* 110, 551–561.

Jung S., Muhle A., Schaefer M., Strotmann R., Schultz G., Plant T.D.(2003) Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem.* 278(6):3562-71.

Kaneko M., Helfrich-Förster C., and Hall J.C. (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. (1998) Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 652-658.

Kaneko M. and Hall J.C. (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 J.H., Cheng Y., Harding P.E., Hall J.C. (2000) Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioral rhythms. *J. Neurobiol.* 43: 207-233.

Kellenberger S., and Schild L. (2002) Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of Ion Channels: A Variety of Functions for a Shared Structure. *Physiol. Rev.* 82: 735-767.

Kelly O., Lin C., Ramkumar M., Saxena N.C., Kleyman T. R., and Eaton D. C. (2003) Characterization of an amiloride binding region in the  $\alpha$ -subunit of ENaC. *Am. J. Physiol.* 285, F1279-F1290.

Kim S., McKay R.R., Miller K., and Shortridge R.D. (1995) Multiple Subtypes of Phospholipase C Are Encoded by the *norpA* Gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 270(24): 14376-14382.

Kim E.Y., Bae K., Ng F.S., Glossop N.R., Hardin P.E., and Edery I. (2002) CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron* 34: 69-81.

Kinnamon S.C. (1988) Taste transduction: a diversity of mechanisms. *TINS* 11, 491-496.

Klarsfeld A., Leloup J-C., Rouyer F. (2003) Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behavioural Processes* 64: 161-175.

Kleino A, Valanne S, Ulvila J, Kallio J, Myllymaki H, Enwald H, Stoven S, Poidevin M, Ueda R, Hultmark D, Lemaitre B, and Ramet M.(2005) Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway.*EMBO J.* 24:3423-34.

Kloss B., Price J. L., Saez L., Blau J., Rothenfluh A., Young M. W. (1998) The *Drosophila* Clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase Ia . *Cell* 94: 97-107.

Kloss B., Rothenfluh A., Young M. W., Saez L. (2001) Phosphorylation of PERIOD is influenced by cycling physical associations of DOUBLE-TIME, PERIOD, and TIMELESS in the *Drosophila* clock. *Neuron* 30: 699-706.

Knutsson A. (2003) Health disorders of shift workers. *Occup. Med.* 53: 103-108

Kobayashi M., Wod P.A., and Hrushesky W.J.M. (2002) Circadian chemotherapy for gynecological and genitourinary cancers. *Chronobiol. Int.* 19: 237-251.

Kondo T., Noremas N.F., Golden S.S., Johnson C.H., Kutsuna and S., Ishiura M. (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266:1233-1236.

- Konopka R.J., and Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 68, 2112-2116.
- Konopka R.J., Pittendrigh C., and Orr D. (1989) Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J. Neurogenet.* 6, 1-10.
- Krishnan B., Levine J. D., Lynch M. K., Dowse H. B., Funes P., Hall J. C., Hardin P. E. and Dryer S. E. (2001) A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411, 313-317.
- Kyriacou C.P. and Rosato E. (2000) Squaring up the E-box. *J. Biol. Rhythms* 15: 483--490.
- Lakin-Thomas P.L., and Brody S. (2004) Circadian Rhythms in Microorganisms: New Complexities. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 489-519.
- Lamb M.J., McDonald R.P.(1973) Heat tolerance changes with age in normal and irradiated *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol.* 8(4):207-17.
- Lear BC, Merrill CE, Lin JM, Schroeder A, Zhang L, Allada R. (2005) A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron.* 48(2):221-7.
- Lee Y, Lee Y, Lee J, Bang S, Hyun S, Kang J, Hong ST, Bae E, Kaang BK, Kim J. (2005) Pyrexia is a new thermal transient receptor potential channel endowing tolerance to high temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 37(3):305-10.
- Lee C., Bae K., Edery I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/DBMAL 1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol. Cell Biol.* 19: 5316--5325.
- Lee C., Bae K., and Edery I. (1998) The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interacts with the PER-TIM complex. *Neuron* 21: 857-867
- Levine J.D., Casey C.I., Kalderon D.D., and Jackson F.R. (1994) Altered circadian pacemaker functions and cyclic AMP rhythms in the *Drosophila* learning mutant dunce. *Neuron* 13, 967--974.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002a) Signal analysis of behavioral and molecular cycles. *BMC Neurosci.* 3, 1.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002b) Resetting the Circadian Clock by Social Experience in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 298: 2010-2012.
- Lewin B. (2000) Genes VII. Oxford University Press

- Lewis E. B., and Bacher F. (1968) Methods of feeding ethylmethane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros. Inf. Serv.* 43:193.
- Liao G., Rehm E.J., and Rubin G.M. (2000) Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(7): 3347-3351.
- Lindsley D.L., and Zimm G.G. (1992) Genetic Variations of *Drosophila*. (San Diego: Academic Press)
- Lin J.M., Kilman V. L., Keegan K., Paddock B., Emery-Le M., Rosbash M., Allada R. (2002) A role for casein kinase 2 in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420: 816–820.
- Lin Y., Stormo G.D., and Taghert P.H. (2004) The Neuropeptide Pigment-Dispersing Factor coordinates Pacemaker Interactions in the *Drosophila* Circadian System. *J. Neurosci.* 24(36): 7951-7957.
- Linne v.C. (1751) *Philosophia Botanica* 1751, pp. 274-276
- Linding R., Russel RB., Neduva V., and Gibson TL. (2003) GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucl. Acid Res.* 31(13):3701-3708.
- Liu Y., Merrow M., Loros J.J., and Dunlap J.C. (1998) How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science* 281, 825-829.
- Liu X., Lorenz L., Yu Q.N., Hall J. C., Rosbash M. (1988) Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2(2): 228-238.
- Liu L., Yermolaieva O., Johnson W.A., Abboud F.M., and Welsh M.J. (2003a) Identification and Function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae. *Nature Neurosci.* 6(3): 267-273.
- Liu L., Leonard S., Motto D.G., Feller M.A., Price M.P., Johnson W.A., and Welsh M.J. (2003b) Contribution of *Drosophila* DEG ENaC Genes to salt Taste. *Neuron* 39: 133-146.
- Looby P, Loudon AS. (2005) Gene duplication and complex circadian clocks in mammals. *Trends Genet.* 21(1):46-53.
- Luciani S., Bova S., Cagnelli G., Debetto P. (1992) Effects of amiloride on the cardiovascular system: role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Pharmacol Res.* 25(4):303-10.
- Lyons L.C., Darlington T.K., Hao H., Houl J., Kay S.A., and Hardin P.E. (2000) Specific sequences outside the E-box are required for proper *per* expression and behavioral rescue. *J. Biol. Rhythms* 15:472-482.

- Majercak J., Kalderon D., and Edery I. (1997) *Drosophila melanogaster* deficient in protein kinase a manifests behavior-specific arrhythmia but normal clock function. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5915–5922.
- Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P.E., and Edery, I. (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 24, 219-230.
- Majercak J., Chen W.F., and Edery I. (2004) Splicing of the *period* gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Molec. Cell. Biol.* 24, 3359-3372.
- Marrus S.B., Zeng H., and Rosbash M. (1996) Effect of constant light and circadian entrainment of *per<sup>S</sup>* flies: evidence for light-mediated delay of the negative feedback loop in *Drosophila*. *EMBO J.* 15, 6877-6886.
- Martin S.G., Dobi K.C., and Johnston D.S. (2001) A rapid method to map mutations in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2: 1-12.
- Martinek S., Inonog S., Manoukian A.S., and Young M.W. (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy* / GSK3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105: 769–779.
- McDonald M.J., Rosbash M., and Emery P. (2001) Wild-type circadian rhythmicity is dependent on closely spaced E boxes in the *Drosophila timeless* promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1207-1217.
- Meldrum E., Kriz R.W., Totty N., and Parker P.J. (1991) A second gene product of the inositol-phospholipid-specific phospholipase C delta subclass. *Eur. J. Biochem.* 196: 159–165.
- Melzig J., Buchner S., Wiebel F., Wolf R., Burg M., Pak W.L., 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.
- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH. (2005) PDF receptor signalling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron.* 48(2):213-9.
- Meyer P., Saez L., Young MW. (2006) PER-TIM Interactions in living *Drosophila* cells: An interval timer for the circadian clock. *Science* 311: 226-229.
- Montell C. (1999) Visual Transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 231-268.
- Montell C. (2005) *Drosophila* TRP channels. *Eur. J. Physiol.* 451: 19-28.
- Moon R.T., Bowerman B., Boutros M., and Perrimon N. (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296, 1644–1646.

- Moore-Ede M.C., Sulzman F.M., Fuller C.A. (1981) The Clocks That Time Us – Physiology Of The Circadian Timing System. Harvard University Press. Cambridge & London.
- Morrison WW., Milkman R. (1978) Modification of heat resistance in *Drosophila* by selection. *Nature*. 273(5657):49-50.
- Mullis K.B., and Faloona F.A. (1987) Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.* (155): 335-350.
- Myers M. P., Wager-Smith K., Rothenfluh-Hilfiker A., Young M. W. (1996) Light--induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 271: 1736-1740.
- Myers E.M., Yu J., and Sehgal A. (2003) Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 13(6):526-33.
- Naidoo N., Song W., Hunter-Ensor M. & Sehgal A. (1999) A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. *Science* 285: 1737-1741.
- Nakajima M., Imai K., Ito H., Nishikawa T., Murayama Y., Iwasaki H., Oyama T., Kondo T. (2005) Reconstitution of circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in vitro. *Science* 308: 414-415.
- Newby L.M., and Jackson F.R. (1993) A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function. *Genetics* 135, 1077–1090.
- Newby L.M., and Jackson, F.R. (1996) Regulation of a specific circadian clock output pathway by Lark, a putative RNA-binding protein with repressor activity. *J. Neurobiol.* 31, 117–128.
- Ouyang Y., Andersson C.R., Kondo T., Golden S., and Johnson C.H. (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8660-8664.
- Page T.L. (1985) Circadian Organization in Cockroaches: Effects of Temperature Cycles on Locomotor Activity. *J. Insect Pysiol.* 31(3): 235-242.
- Panda S., Provencio I., Tu D.C., Pires S.S., Rollag M.D., Castrucci A.M., Pletcher M.T., Sato T.K., Wiltshire T., Andahazy M., et al. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301,525-527.

- Park J.H., Helfrich-Förster C., Lee G., Liu L., Rosbash, M., Hall, J. C. (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3608-3613.
- Parks A.L. et al. (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nature* 36(3): 288-292.
- Partonen T., and Magnusson A. (2001) Seasonal Affective Disorder. Practice and Research. Oxford University Press, Oxford.
- Pearn M.T., Randall L.L. Shortridge R.D., Burg M.G., Pak W.L. (1996) Molecular, biochemical, and electrophysiological characterization of *Drosophila norpA* mutants. *J. Biol. Chem.* 271: 4937-4945.
- Peng Y., Stoleru D., Levine D. J., Hall J. C., Rosbash M. (2003) *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLOS Biol.* 1: 1-9.
- Peschel N., Veleri S., and Stanewsky R. (2006) Veela defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila's* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(46):17313-17318.
- Peter A., Schöttler P., Werner M. Beinert N., et al. (2002) Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. PX-Lines. *EMBO reports* 3(1): 34-38.
- Pittendrigh C. S. and Bruce V. G. (1959) Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals* (ed. R. B. Withrow), pp. 474-505. Washington, D.C.
- Pittendrigh C.S. (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 40(10): 1018-1029.
- Pittendrigh C., Bruce M. (1957) An oscillator model for biological Clocks. Rhythmic and synthetic processes in growth. (Princeton University Press)
- Pittendrigh, C.S., Bruce V.G., Kaus P. (1958) On the significance of transients in daily rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 965-973.
- Pittendrigh C., Bruce V.G., Rosenzweig N.S., and Rubin M.L. (1959) A biological clock in *Neurospora*. *Nature* 184: 169-170.
- Pittendrigh C. S. (1981) Circadian systems: general perspective. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. 4, Biological Rhythms, edited by J. Aschoff, Plenum Press, New York, pp. 57-80.

- Plautz J.D., Straume M., Stanewsky R., Jamison C.F., Brandes C., Dowse H.B., Hall J.C., and Kay S.A. (1997a) Quantitative analysis of *Drosophila period* gene transcription in living animals. *J. Biol. Rhythms* 12, 204-217.
- Plautz J.D., Kaneko M., Hall J.C., and Kay S.A. (1997b) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278, 1632-1635.
- Power J.M., Ringo J.M., and Dowse H.B. (1995) The effects of *period* mutations and light on the activity rhythms of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms* 10: 267-280.
- Prolo L.M., Takahashi J.S., and Herzog E.D. (2005) Circadian rhythms generation and entrainment in astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 404-408.
- Price J.L., Dembinska M.E., Young M.W., and Rosbash M. (1995) Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation *timeless*. *EMBO J.* 14, 4044-4049.
- Price J.L., Blau J., Rothenfluh A., Adodeely M., Kloss B., and Young M.W. (1998) *double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94: 83-95.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68:619-47.
- Reddy K.J., Haskell D.M., Sherman D.M., and Sherman L.A. (1993) Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *J. Bacteriol.* 175: 1284-1292.
- Ratcliffe M.J., Itoh K., and Sokol S.Y. (2000). A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J. Biol. Chem.* 275, 35680–35683.
- Reinberg A.E. (1992) Concepts in Chronopharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 51-66.
- Renn S.C P., Park J.H., Rosbash M., Hall J. C., Taghert P. H. (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.
- Renner M. (1960) The contribution of the honey bee to the study of time sense and astronomical orientation. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 25: 361-367.
- Revell V.L., and Eastman C.I. (2005) How to Trick Mother Nature Into Letting You Fly Around or Stay Up All Night. *J. Biol. Rhythms* 20(4): 353-365.
- Rhee S.G., Suh P.G., Ryu S.H., and Lee S.Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244: 546-550.
- Rhee S.G., and Choi K.D. (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.

- 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* 18, 377-391.
- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R., Johnson-Schlitz D.M., Benz Wendy K., and Engels W.R. (1988) A stable Genomic Source of P-Element Transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 461-470.
- Roenneberg T., Wirz-Justice A., and Mellow M. (2003) Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J. Biol. Rhythms* 18: 80-90.
- Rosenzweig M., Brennan K.M., Tayler T.D., Phelps P.O., Patapoutian A., and Garrity P.A. (2005) The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev.* 19, 419-24.
- Rothenfluh A., Young M.W., and Saez L. (2000) A TIMELES-Independent Function for PERIOD Proteins in the *Drosophila* Clock. *Neuron* 26: 505-514.
- Rouyer F., Rachidi M., Pikielny C., and Rosbash M. (1997) A new gene encoding a putative transcription factor regulated by the *Drosophila* circadian clock. *EMBO J.* 16, 3944–3954.
- Ruoff P., Loros J.J., and Dunlap J. (2005) The relationship between FRQ-protein stability and temperature compensation in the *Neurospora* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(49): 17681-17686.
- Rush B.L., Murad A., Emery P., and Giebultowicz J.M. (2006) Ectopic CRYPTOCHROME Renders TIM Light Sensitive in the *Drosophila* Ovary. *J. Biol. Rhythms* 21(4):272-278
- Rutila J.E., Suri V., Le M., So V., Rosbash M., Hall J.C. (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 93: 805-14.
- Ryder E. et al. (2004) The DrosDel Collection: A Set of P-Element Insertions for Generating Custom Chromosomal Aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 797-813.
- Saez L. and Young M.W. (1988) In situ localization of the per clock protein during development of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 8:5378-5385.
- Sambrook J. and Russel D.W. (2001) Molecular cloning, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.



- Sarov-Blat L., So W.V., Liu L., and Rosbash M. (2000) The *Drosophila takeout* gene is a novel link between circadian rhythms and feeding behavior. *Cell* 101, 647–656.
- Sathyanarayanan S., Zheng X., Xioa R., Sehgal A. (2004) Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116: 213-223.
- Sayeed O., and Benzer S. (1996) Behavioral genetics of thermosensation and hygrosensation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 6079-6084.
- Sawyer L.A., Hennessy J.M., Peixoto A.A., Rosato E., Parkinson H., Costa R., and Kyriacou C.P. (1997) Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science* 278, 2117-2120.
- Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E., Willett W.C., Hunter D.J., Kawachi I., and Colditz G.A. (2001) Rotating night shifts and breast cancer in woman participating in the nurses' health study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 1563-1568.
- Schneuwly S., Burg M.G., Lending C., Perdeu M.H., Pak W.L.(1991) Properties of photoreceptor-specific phospholipase C encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 266(36):24314-9.
- Schotland P., Hunter-Ensor M., Lawrence T. and Sehgal A. (2000) Altered Entrainment and Feedback Loop Function Effected by a Mutant Period Protein. *J. Neurosci* 20(3): 958-968.
- Sehgal A., Price J.L., Man B., and Young M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 263, 1603-1606.
- Selby C.P., and Sancar A. (1999) A Third Member of the Photolyase/Blue-light Photoreceptor Family in *Drosophila*: A Putative Circadian Photoreceptor. *Photochemistry and Photobiology* 69(1): 105–107.
- Selby C.P., Thompson C., Schmitz T.M., Van Gelder R.N., Sancar A. (2000) Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14697–14702.
- Shieh B.H., and Zhu M.Y. (1996) Regulation of the TPR  $\text{Ca}^{2+}$  channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 16: 991-998.
- Sidote D., Majercak J., Parikh V., and Edery I. (1998) Differential effects of light and heat on the *Drosophila* circadian clock proteins PER and TIM. *Molec. Cell. Biol.* 18, 2004-2013.

- Shafer O.T., Rosbash M., Truman J.W. (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins Period and Timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 22: 5946--5954.
- Shafer O.T., Helfrich-Förster C., Renn S.C.P., Taghert P.H. (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal pacemakers reveals new neuronal classes. *J. Comp. Neurol.* 498:180-193.
- Sheng M. and Sala C. (2001) PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.
- Shieh B.H., and Zhu M.Y. (1996) Regulation of the TRP  $\text{Ca}^{2+}$  channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 16: 991-998.
- Smith D.P, Ranganathan R., Hardy R.W., Marx J., Tsuchida T., and Zuker C.S. (1991) Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor specific protein-kinase-C. *Science* 254, 1478-1484.
- Steffan J.S., Bodai L., Pallos J., Poelman M., McCampbell A. et al. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-43
- So W.V., and Rosbash M. (1997) Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO J.* 16: 7146-7155.
- So W.V., Sarov-Blat L., Kotarski C.K., McDonald M.J., Allada R., and Rosbash M. (2000) *takeout*, a Novel *Drosophila* Gene under Circadian Clock Transcriptional Regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20(8): 6935-6944.
- Stanewsky R., Frisch B., Brandes C., Hamblen-Coyle M.J., Rosbash M., and Hall J.C. (1997a) 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., Jamison C.F., Plautz J.D., Kay S.A., and Hall J.C. (1997b) Multiple circadian-regulated elements contribute to cycling *period* gene expression in *Drosophila*. *EMBO J.* 16, 5006-5018.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S.A., Rosbash M., and Hall J.C. (1998) The *cry<sup>b</sup>* mutation identifies *cryptochrome* as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692.
- Stanewsky R. (2002a) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 309, 11-26.
- Stanewsky R., Lynch K.S., Brandes C., and Hall J.C. (2002b) Mapping of elements involved in regulating normal temporal *period* and *timeless* RNA-expression patterns in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms* 17, 293-306.

- Stanewsky R. (2003) Genetic Analysis of the Circadian System in *Drosophila melanogaster* and Mammals. *J. Neurobiol.* 54: 111-147.
- Steller H., Fischbach K. F., Rubin G. M. (1987) *Disconnected* a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell* 50(7): 1139-1353.
- Stephan F. K., Swann J. M., Sisk J. L. (1979) Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav. Neural. Biol.* 25(4): 545-554.
- 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(7065):238-42.
- Straume M, Frasier-Cadoret SG, Johnson ML (1991) Least squares analysis of fluorescence data.. In Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 2: Principles, JR Lakowicz, ed, pp. 117-240. Plenum, New York.
- Suss-Toby E., Selinger Z., Minke B.(1991) Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. *J Gen Physiol.* 98(4):849-68.
- Syrova Z, Sauman I, Giebultowicz JM. (2003) Effects of light and temperature on the circadian system controlling sperm release in moth *Spodoptera littoralis*. *Chronobiol Int.* 20(5):809-21.
- Tang C.M., Presser F., Morad M.(1988) Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science.* 240(4849):213-5.
- Tanoue S, Krishnan P, Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. (2004) Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol.* 14(8):638-49.
- Teeter K., Naeemuddin M., Gasperini R., Zimmerman E., White K.P., Hoskins R., and Gibson G. (2000) Haplotype Dimorphism in a SNP Collection From *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 288: 63-75.
- Thompson C.L., Selby C.P., Van Gelder R.N., Blaner W.S., Lee J., Quadro L., Lai K., Gottesman M.E., and Sancar A. (2004) Effect of vitamin A depletion on nonvisual phototransduction pathways in cryptochromeless mice. *J. Biol. Rhythms* 19, 504-514.
- Tominaga M., and Caterina M.J. (2004) Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* 61, 3-12.

- Tomiooka K., Sakamoto M., Harui Y., Matsumoto N., and Matsumoto A. (1998) Light and temperature cooperate to regulate the circadian locomotor rhythm of wild type and *period* mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 44, 587-596.
- Tomita J., Nakajima M., Kondo T., Iwasaki H. (2005) No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 307: 251-254.
- Tower J., Karpen G.H., Craig N., and Spradling A.C. (1993) Preferential Transposition of *Drosophila* P Elements to Nearby Chromosomal Sites. *Genetics* 133: 347-359.
- Tracey W.D. Jr, Wilson R.I., Laurent G., and Benzer S. (2003) *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261-73.
- Ueda H.R., Matsumoto A., Kawamura M., Iino M., Tanimura T., and Hashimoto S. (2002) Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 277, 14048–14052.
- Vallone D., Lahiri K., Dickmeis T., and Foulkes N.S. (2005) Zebrafish cell clocks feel the heat and see the light!. *Zebrafish* 2(3), 171-187.
- Van Gelder R.N., Bae H., Palazzolo M.J., Krasnow M.A. (1995) Extent and character of circadian gene expression in *Drosophila melanogaster*: identification of twenty oscillating mRNAs in the fly head. *Curr. Biol.* 5:1424–1436
- van der Horst G.T.J., Muijtjens M., Kobayashi K., Tokano R., Kanno S., Takao M., de Wit J., Verkerk A., Eker A.P., van Leenen D., Buijs R., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., and Yasui A. (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 348: 627-630.
- Veleri S., Brandes C., Helfrich-Förster C., Hall J.C., and Stanewsky R. (2003) A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* 13, 1758-1767.
- Venter J.C. et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51.
- Virey J.J. (1814) *Ephémérides de la vie humaine ou recherches sur la révolution journalière et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies*. Promotionsschrift, Universität Paris, 1814.
- Viswanath V., Story G.M., Peier A.M., Petrus M.J., Lee V.M., Hwang S.W., Patapoutian A., and Jegla T. (2003) Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature* 423, 822-823.
- Venglarik CJ, Gao Z, Lu X.(2004) Evolutionary conservation of *Drosophila* polycystin-2 as a calcium-activated cation channel. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(5):1168-77.
- Voets T., and Nilius B. (2003) TRPs make sense. *J. Membr. Biol.* 192(1):1-8.

Von Linne C. (1751) *Philosophia Botanica*. 1751, pp. 274-276

Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B. (2004) Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch.* 449(3):213-26.

Welsh M.J., Price M.P., and Xie J. (2001) Biochemical Basis of Touch Perception: Mechanosensory Function of Degenerin/Epithelial Na<sup>+</sup> Channels. *J. Biol. Chem.* 277(4): 2369-2372.

Wheeler D.A., Hamblen-Coyle M.J., Dushay M.S, and Hall J.C. (1993) Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are blind, arrhythmic, or both. *J. Biol. Rhythms* 8, 67-94.

Williams J.A., Su H.S., Bernards A., Field J., Sehgal A. (2001) A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science* 293:2251–2256.

Wülbeck C., Szabo G., Shafer O.T., Helfrich-Förster C., and Stanewsky R. (2005) The Novel *Drosophila* timblind Mutation affects Behavioral Rhythms but not Periodic Eclosion. *Genetics* 169: 751-766.

Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M., and Tei H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682-685.

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

Yasuyama K., and Meinertzhagen I.A. (1999) Extraretinal Photoreceptors at the Compound Eye's Posterior Margin in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. neurol.* 412: 193-202.

Yoo S.H., Yamazaki S., Lowrey P.L., Shimomura K., Ko C.H., Buhr E.D., Siepkha S.M., Hong H.K., Oh W.J., Yoo O.J., et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 5339-5346.

Yoshii T., Sakamoto M., and Tomioka K. (2002) A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoolog. Sci.* 19, 841-850.

Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K. (2005) Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci.* 22(5):1176-84.

Yoshii T., Fujii K., and Tomioka J. (2006) Induction of *Drosophila* Behavioral and Molecular Rhythms by Temperature Steps in Constant Light. *J. Biol. Rhythms* in press.

- Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. (2005) Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms*. 20(6):500-12.
- Yu Q., Jacquier A.C., Citri Y., Hamblen M., Hall J.C., and Rosbash M. (1987) Molecular Mapping of Point Mutations in the *Period* Gene that Stop or Speed up Biological Clocks in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 784-788.
- Zars T. (2001) Two thermosensors in *Drosophila* have different behavioral functions. *J. Comp. Physiol. A* 187, 235-242.
- Zimmerman W.F., Pittendrigh C.S., Pavlidis T. (1968) Temperature compensation of the circadian oscillation on *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *J. Insect. Physiol.* 14: 669-684.
- Zeng H., Qian Z., Myers M. P., Rosbash M. (1996) A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 380: 129-135.
- Zerr D.M., Hall J.C., Rosbash M., Siwicki K.K. (1990) Circadian fluctuations of *period* protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 10: 2749-2762.
- Zhu L., McKay R.R., and Shortridge R.D. (1993) Tissue-specific expression of phospholipase C encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 268, 5994-6001.
- Zinn, J.G. (1759) *Hamburg Magazin* 22:40-50.
- Zocchi E, Carpaneto A, Cerrano C, Bavestrello G, Giovine M, Bruzzone S, Guida L, Franco L, Usai C. (2001) The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98(26):14859-64.

## 9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die aktiv oder passiv zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, wenn auch nicht alle namentlich genannt werden können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Stanewsky, Queen Mary University London, für seine Unterstützung, sein Vertrauen und die ständige Diskussionsbereitschaft, wenngleich die Kommunikation bedingt durch die örtliche Distanz nicht immer einfach gewesen ist.

Sehr herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Zoologie und Entwicklungsbiologie in Regensburg anfertigen zu können.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Professor Dr. Charlotte Förster, Herrn PD Dr. Alois Hofbauer, Frau Dr. Corinna Wuelbeck, Herrn Dr. Christoph Gruenewald, sowie Frau Gisela Szabo für die kritische Diskussion meiner Ergebnisse, Hilfestellungen, sowie Tipps zu verschiedenen Methoden und anderen Problemen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Schneuwly und der Arbeitsgruppe Förster bedanken, die den oft nervaufreibenden Arbeitsalltag erträglicher gemacht haben.

Ein großes PROST geht auch an meine langjährigen Mitstreiter Johannes Landskron und Nicolai Peschel, welche sich immer aufgeschlossen und hilfsbereit zeigten, auch bei ausserlaborlichen Aktivitäten.

Meinen Eltern möchte ich für Ihre Hilfe und Unterstützung während der langen Zeit des Studiums und der Promotion danken.

Am meisten zu Dank verpflichtet bin ich aber meiner seelischen Stütze Birgit ☀, die während den Jahren dieser Arbeit geduldig meine Launen ertragen und mich mit all ihren Kräften unterstützt hat.

## 10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbstständig angefertigt und dabei keine anderen Hilfsmittel als die 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, 27.11.2006

Franz Glaser