Immunhistochemische und verhaltensbiologische Untersuchungen zur Funktion des Pigment Dispersing Factor im circadianen Uhrwerk von *Drosophila melanogaster*.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg.

vorgelegt von
Eva Grieshaber aus
Tübingen
November 2008

Promotionsgesuch eingereicht am 05.11.2008
Kolloquium am 16.12.2008
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Charlotte Förster, Universität Regensburg
Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schneuwly
1. Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster
2. Gutachter: PD Dr. Alois Hofbauer
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Rosemarie Baumann

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung..... 5

Grundlagen circadianer Rhythmen bei *Drosophila melanogaster*..... 5

Merkmale innerer Uhren..... 7

Neuropeptide..... 10

Pigment-Dispersing-Factor..... 11

Theoretische Überlegungen zu den Versuchen..... 12

1. Greift PDF in die Phosphorylierung von PER ein?..... 13
2. Ist die lange Periodenlänge von *sine oculis*^{01} auf die zusätzlichen PDF-Fasern zurückzuführen?..... 13
3. Was geschieht, wenn man die Signalübertragung von PDF stört?..... 14
4. Welche Zellen sind den sLNv nachgeschaltet?..... 15
5. Was geschieht im circadianen Netzwerk, wenn man Teile oder alle der Hauptschrittmacher ablatiert?..... 16

Material und Methoden..... 17

Fliegenstämme..... 17

Immunhistochemie..... 19

Präparation..... 20
Auswertung..... 21
Statistik..... 24

Laufaktivität..... 24

Aufzeichnung..... 25
Auswertung..... 27
Statistik..... 29

Western Blot..... 30

Präparation..... 30
Auswertung..... 32
Statistik..... 33

Ergebnisse..... 34

1. Untersuchung von PER-Phosphorylierungsbanden bei *y w* und *y w; ;Pdf^{01}*..... 34

2. Laufaktivität von *so^{01}*..... 36

3. Expression des thermosensitiven Allels *shibire^{ts1}* in diversen Untergruppen der Uhrneuronen..... 40

3.1. Expressionsmuster der verwendeten *GAL4* – Linien..... 40
3.2. Laufaktivität unter 18°C bzw. 28°C..... 42
3.3. Einfluss von Shibire^{ts1} auf die Freilaufperiodenlänge..... 46
3.4. Expressionsstärke der Treiberlinien..... 49
3.5. Einfluß von Shibire^{ts1} auf das durchschnittliche Tagesaktivitätsmuster..... 51
3.6. Einfluss von Shibire^{ts1} auf das PDF-cycling in den Terminalen der sLNv..... 52
3.7. Vergleich der Durchschnittstage von *CS* und *y w; ;Pdf^{01}* bei 18°C und 28°C..... 55

4. Wheat-Germ-Agglutinin als Tracer für sLNv-Folgeneuronen..... 60

5. Ablation verschiedener Untergruppen von Uhrzellen..... 62

5.1. Laufaktivitätsversuch der ablatierten Fliegen..... 66

5.2.Immunhistochemische Präparationen von *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen..... 71

Diskussion..... 78

1. Western Blot Analyse von *y w* und *y w; ;Pdf^{01}*..... 78

2. Laufaktivität von *so^{01}*..... 79

3. Expression des thermosensitiven Allels *shibire^{ts1}* in diversen Untergruppen der Uhrneuronen..... 81

3.1.Expressionsmuster der verwendeten *GAL4* – Linien..... 82
3.2.Laufaktivität und Freilaufperiodenlänge von Fliegen mit mutiertem Shibire in verschiedenen Neuronen unter 18°C bzw. 28°C..... 83
3.3. Expressionsstärke der Treiberlinien..... 85
3.4. Einfluss von Shibire^{ts1} auf das PDF-cycling in den Terminalen der sLNv..... 86
3.5. Einfluß von Shibire ^{ts1} auf das durchschnittliche Tagesaktivitätsmuster..... 87
3.6. Vergleich der Durchschnittstage von *CS* und *y w; ;Pdf^{01}* bei 18°C und 28°C..... 89
3.7. Abschließende Bemerkungen über die Verwendung von *shibire^{ts1}*..... 92

4. Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) als Tracer für sLNv-Folgeneuronen..... 92

5. Ablation verschiedener Untergruppen von Uhrzellen..... 93

5.1. Laufaktivitätsversuch..... 93
5.2. Immunhistochemische Präparationen..... 97

Zusammenfassung..... 100

Anhang..... 101

Literaturverzeichnis..... 109

Einleitung

Grundlagen circadianer Rhythmen bei *Drosophila melanogaster*

Unser Planet dreht sich bekanntermaßen innerhalb von 24 h um sich selbst. Der relative Standpunkt der Erde zur Sonne bedingt dabei, dass sich Tag und Nacht auf ewig gleiche Weise rhythmisch ablösen. Dieser Licht-Dunkel-Wechsel ist der prominenteste periodische Ablauf in unserer Natur und wohl auch deshalb haben die meisten Lebewesen vom Einzeller bis zum Menschen eine innere Uhr evolviert, die es ihnen ermöglicht, die Übergänge jeden Tag aufs Neue vorauszuahnen. Auf diese Weise, können sie zu genau dem richtigen Zeitpunkt blühen, aktiv sein, Beute erjagen, oder dem Räuber aus dem Weg gehen, sich erfolgreich fortpflanzen oder auch sich regenerieren.

Voraussetzung für endogene Tagesuhren sind Taktgeber. Diese circadianen Schrittmacher (circa = ungefähr, dies = Tag) müssen eigenständig Schwingungen erzeugen, sich von der äußeren 24h Periodizität synchronisieren lassen und den resultierenden Rhythmus an den gesamten Organismus weitergeben. Was beim Einzeller noch recht einfach zu bewerkstelligen ist, benötigt beim vielzelligen Säuger ein zentrales, in sich vernetztes Schrittmacherzentrum im Gehirn, welches dann die vielen peripheren Oszillatoren in den Geweben und Organen ins rechte Zusammenspiel bringt.

In *Drosophila melanogaster* besteht das zentrale circadiane Schrittmachersystem aus einem Netzwerk von mehreren Neuronenclustern (siehe Abb. 1 nach Föster et al. 2007). Im lateralen Gehirn kann man die so genannten Lateralneuronen (LN) finden. Im dorsalen Protocerebrum gelegen sind die Dorsalneuronen (DN). Die LN teilen sich auf in zwei vetrolaterale Gruppen (LNv) und eine dorsolaterale Gruppe (LNd). Die ventrolateralen Gruppen werden anhand ihrer Zellkörpergröße noch in kleine und große LNv aufgeteteilt (sLNv und lLNv – von engl. small und large).

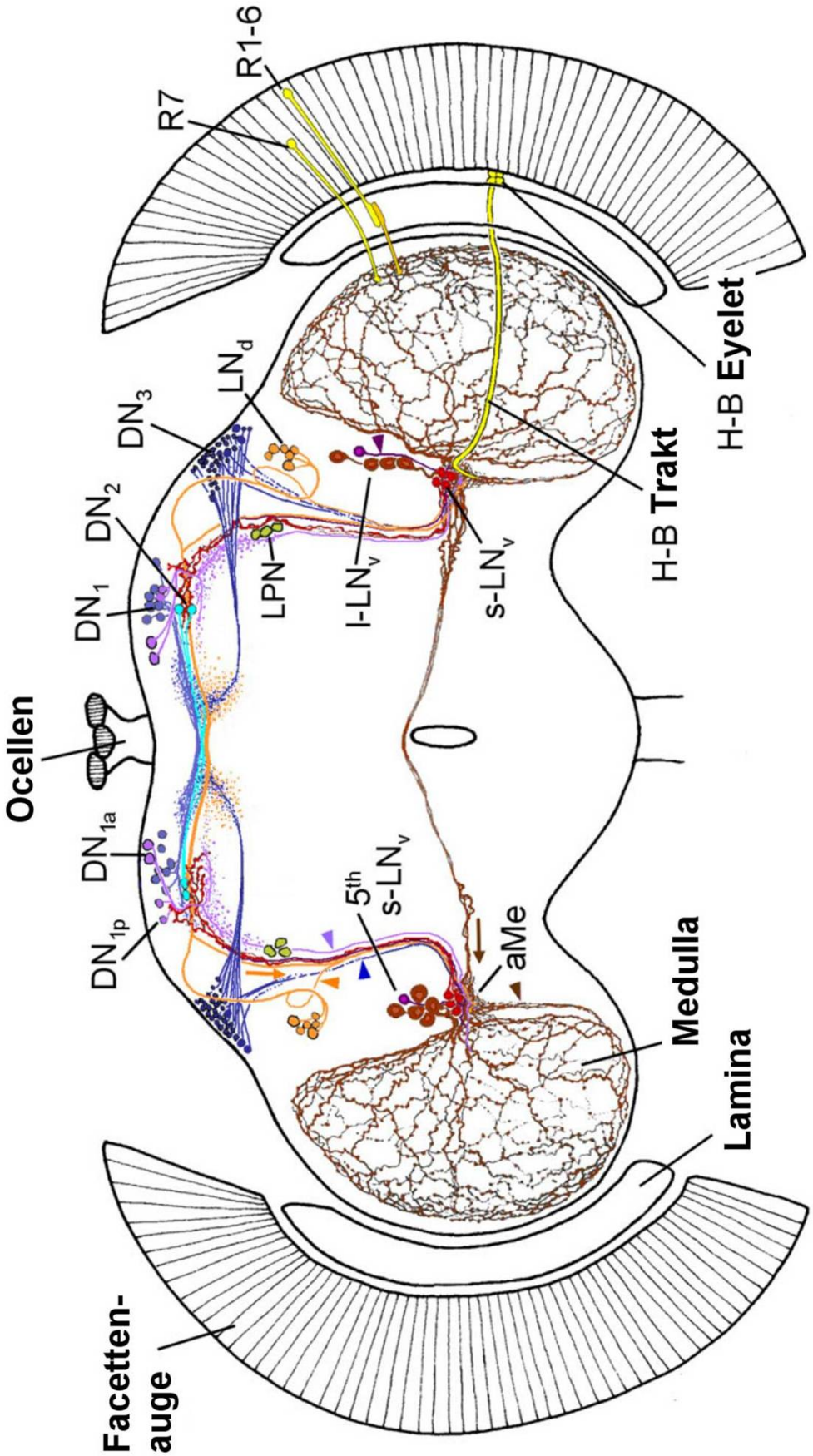


Abb. 1: Uhrneuronen und ihre Verzweigungsmuster (Förster et al. 2007)

Die DN können in 3 Gruppen geteilt werden, die beginnend von der dorsalen Mitte des Gehirns nach außen ihrem Auftreten nacheinander als DN1, DN2 und DN3 bezeichnet werden. Zwei der DN1 werden aufgrund ihrer Lage (mehr anterior als die anderen DN1) DN1a bezeichnet und sind so von den restlichen DN1p (für posterior) abgesondert. Zugleich können die DN1a und zwei der DN1p aufgrund ihrer Expressionseigenschaften von den restlichen DN1p unterschieden werden, denn in ihnen wird im Gegensatz zu den übrigen DN1 ein intrazelluläres Photopigment hergestellt.
Abb. 1 zeigt auch die Verzweigungsmuster all dieser Neuronen (Förster et al., 2007). Pfeilspitzen in den Farben der Zellcluster weisen auf deren ipsilaterale Innervierung der akzessorischen Medulla (aMe) hin, Pfeile auf eine Contralaterale. Die akzessorische Medulla ist das wichtigste Relay der circadianen Uhr von *Drosophila*. Hier wird höchstwahrscheinlich die Information der Augen auf die innere Uhr verschaltet und die der einzelnen Neuronengruppen untereinander (Förster et al., 2007).
Ganz hinten im Gehirn befinden sich die lateralen Posteriorneuronen (LPN). Auf diese Schrittmacherneurone werde ich aber im Folgenden nicht mehr eingehen, da nur sehr wenig über sie bekannt ist.

Merkmale innerer Uhren

Die in den Schrittmacherzentren generierten circadianen Rhythmen zeichnen sich durch bestimmte allgemein gültige Merkmale aus. Wie der Name schon andeutet, weichen sie leicht von 24h ab. Dies erfordert die Synchronisation dieser Rhythmen mit dem irdischen Tag, der genau 24h lang ist, d.h. die innere Uhr muss verstellbar sein. Diese Verstellbarkeit macht es auch möglich, auf Änderungen des Licht-Dunkel-Wechsels (z. Bsp. bei einem Transatlantikflug beim Menschen, oder der saisonalen Wanderung bei Zugvögeln) zu reagieren. Bei konstanten äußeren Bedingungen (d.h. konstante Temperatur und kein Licht, also Dauerdunkel - DD) fällt die Synchronisation weg und die innere Uhr läuft autonom mit ihrer endogenen Periodenlänge weiter - sie läuft frei.
Ein weiteres Merkmal steht in Kontrast zu den meisten chemischen und vielen biologischen Reaktionen. Während diese mit steigender Temperatur schneller ablaufen, ist der endogene Rhythmus der inneren Uhren temperaturkompensiert, das

bedeutet, die Periode sollte bei steigender Temperatur gleich bleiben. Tatsächlich wird der Rhythmus manchmal sogar eher langsamer als schneller.

In den meisten Fällen der untersuchten inneren Uhren verschiedenster Organismen, liegen eine oder mehrere ineinander greifende, negative Rückkopplungsschleifen als molekulare Mechanismen zugrunde. Dies bedeutet, dass so genannte Uhrproteine die eigene Transkription hemmen und damit einen ständigen Wechsel von Reprimierung und Transkription auslösen.

Auch die Taufliege *Drosophila melanogaster* besitzt ein ebensolches endogenes Uhrwerk. Die 4 Hauptkomponenten der zugrunde liegenden hier stark vereinfachten negativen Rückkoppelungsschleife (Abb. 2) in *Drosophila* sind: *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*dClk*) und *cycle* (*cyc*), wobei die Genprodukte Period (hier P) und Timeless (hier T) aus dem Cytoplasma in den Kern translocieren und dort ihre eigene Transkription hemmen (Übersicht siehe Edery, I 2000). Sie bewerkstelligen dies durch eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Clock (dCLK) und Cycle (CYC), welche dann nicht mehr an die DNA binden können. Proteinkinasen wie Doubletime (DBT) und Shaggy (SGG) sind jeweils für die Phosphorylierungen und/oder den Abbau von Period bzw. Timeless zuständig. Scheint die Sonne, oder ist das Tier künstlichem Licht ausgesetzt, wird Timeless zusätzlich durch den Blaulichtphotorezeptor Cryptochrom (CRY) abgebaut. Diese Mechanismen verzögern einerseits die Rückkoppelungsschleife auf eine Dauer von ca. 24 h und gewähren andererseits dem Licht eine Möglichkeit, die innere Uhr zu verstellen. Mutationen in diesen Uhrgenen oder gar ihr Verlust führen zu Veränderungen der endogenen Periodenlängen bis hin zur Arrhythmie.

Über die Outputsignale der Uhr in *Drosophila melanogaster* ist bis jetzt leider wenig bekannt. Jedoch kann der Transkriptionsmechanismus natürlich auch die Bildung anderer Proteine rhythmisieren, und diese so genannten *clock controlled genes* (*ccgs*) geben vielleicht auf diese Weise den Takt des Uhrwerks an nachgeschaltete Zellen weiter.

Eine andere Möglichkeit, die Weitergabe von Informationen periodisch zu gestalten, ist, potentielle Ausgangssignale erst bei der Translation so zu beeinflussen, dass das Protein oder Peptid periodisch mehr oder weniger für den Organismus zur Verfügung steht. Auch der Transport der Signalproteine zu ihren Wirkungsorten kann durch Verzögerung und/oder Beschleunigung verantwortlich dafür sein, dass eine Information rhythmisch weitergegeben wird.

Ein Beispiel hierfür ist Pigment Dispersing Factor (PDF). Die RNA dieses 18 Aminosäurereste umfassenden Neuropeptids wird nicht rhythmisch exprimiert (Park et al., 2000) genauso wenig wie die Peptidmenge im Zellkörper oszilliert (Park et al., 2000). Jedoch ist PDF in den Terminalen des dorsalen Protocerebrums nur periodisch nachweisbar. Somit muss auf dem Weg vom Zellkörper zu den Terminalen ein rhythmisierender Vorgang eingreifen.

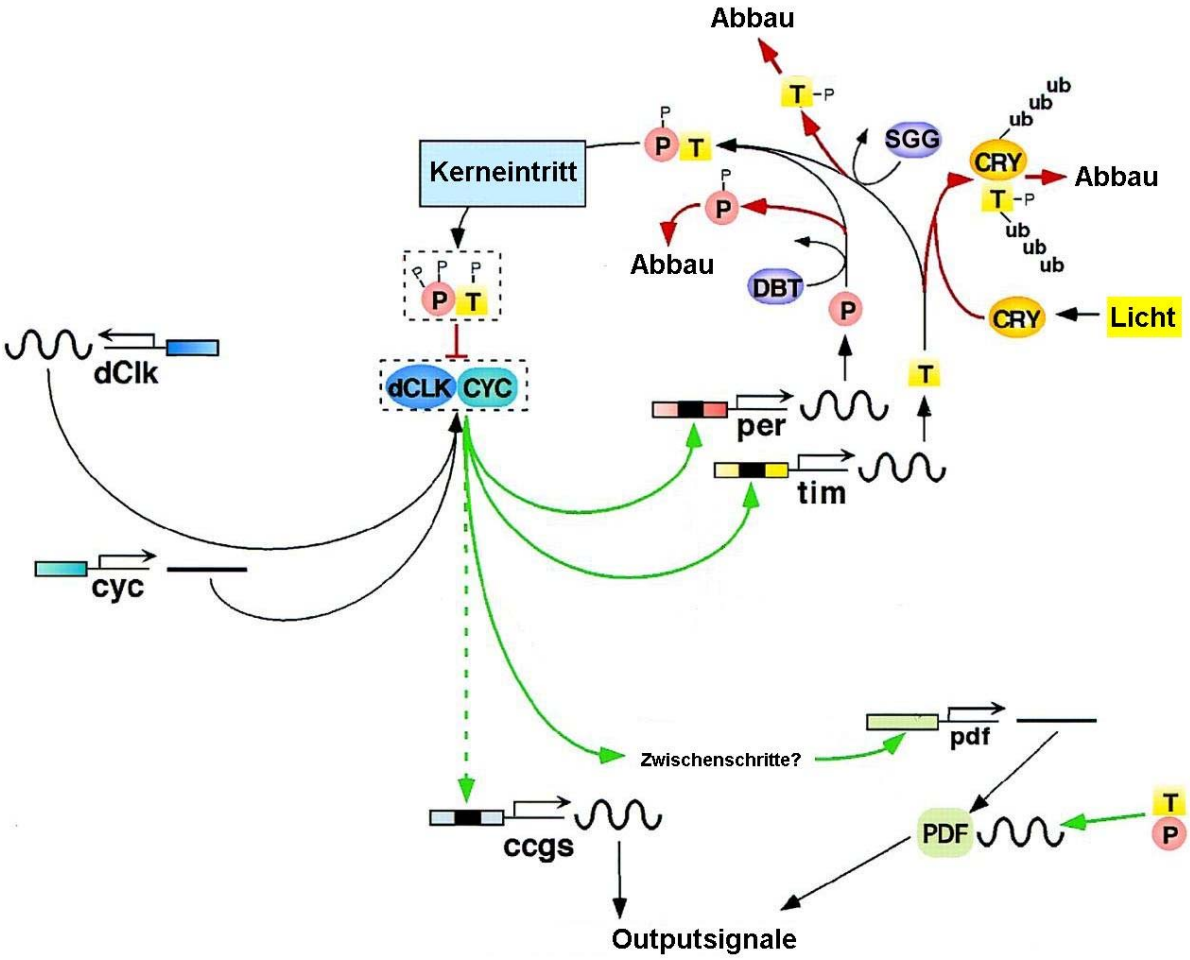


Abb. 2: Stark Vereinfachte Darstellung des molekularen Mechanismus der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* (modifiziert nach Edery I, 2000). Erläuterungen siehe Text. *period (per), timeless (tim), Clock (dClk), cycle (cyc), clock controlled genes (ccgs), pigment dispersing factor (pdf)*, Period (P), Timeless (T), Clock (dCLK), Cycle (CYC), Pigment Dispersing Factor (PDF), Doubletime (DBT), Cryptochrom (CRY), Shaggy (SGG)

Neuropeptide

Neuropeptide werden von den inneren Uhren im Tierreich bevorzugt als Signalmolekule benutzt (Maywood et al., 2006; Nässel and Homberg, 2006) und sind deshalb in diesem Forschungsgebiet sehr im Fokus. Ganz allgemein sind Neuropeptide kurzkettige Proteine (von 3 bis zu über 50 Aminosäureresten; Übersicht siehe Nässel, 2002), die in den gesamten Nervensystemen von den Hydrozoen bis zum Menschen vorkommen. Neuropeptide gehen aus größeren Precursorproteinen, so genannten Preproproteinen hervor. Dabei kann ein Preproprotein mehrere Neuropeptide enthalten. Das Precursorprotein von PDF enthält beispielsweise noch das so genannte PDF-Associated-Protein (PAP), welches ebenfalls nur in den s- und lLNv vorkommt und ein fast identisches Expressionsmuster wie PDF zeigt (mündliche Mitteilung von C. Förster).

Prinzipiell läuft die Signalübertragung mit Neuropeptiden folgendermaßen ab: Sie werden in Vesikeln gespeichert, die sich in Varikositäten oder in Synapsen befinden können. Eine Depolarisation triggert dann ihre Exocytose in den extrazellulären Raum. Hier binden sie in den Zielgebieten meist an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Unter den Signalsubstanzen sind Neuropeptide strukturell und funktional die heterogenste Gruppe, was erklärt, warum Neuropeptidsignale ein sehr komplexes Thema darstellen (Übersicht siehe Nässel, 2002). Diese Vielschichtigkeit steigert sich noch durch die Variabilität der Effektorsysteme, also nachdem die Neuropeptide an ihren Rezeptor gebunden haben (Nässel, 2002). Somit stellt die Neuropeptidforschung eine gewisse Herausforderung dar.

Jedoch lassen die hervorragende genetische Manipulierbarkeit von *Drosophila melanogaster* und die Tatsache, dass hier oft nur einzelne Neurone bestimmte Neuropeptide enthalten, hoffen, dass sich zumindest ein Teil der Funktionen einzelner Neuropeptide offenbaren. PDF ist ein solches Neuropeptid, denn es wird in im Gehirn nur in bestimmten LNv hergestellt (Helfrich-Förster und Homberg, 1993). Deshalb heißen diese Zellen auch PDF-Neuronen.

Pigment-Dispersing-Factor

Fehlen genau diese PDF-Neuronen, ist es für *Drosophila* schwer, einen stabilen Freilaufrhythmus im DD aufrecht zu erhalten (zusammenfassend in Taghert und Shafer, 2006). Diese Tatsache und das Expressionsmuster von PDF (rot und braun in Abb. 1) legt eine Beteiligung von PDF an der inneren Uhr von *Drosophila* nahe. Genauer gesagt, könnte es als Signalsubstanz die Information der einzelnen Oszillatoren an andere Zellen weitergeben. Denn, in den lLNv wäre es damit für die Verbindung der beiden Hemisphären prädestiniert und in den sLnv könnte es die circadiane Rhythmik an nachgeschaltete Zellen transferieren. Im dorsalen Protocerebrum sitzen einerseits weitere Schrittmacherneurone und andererseits mögliche Ansprechpartner für den circadianen Output, wie beispielsweise neurosekretorische Zellen. PDF ist also wie geschaffen, um als Kopplungs- und/oder Outputfaktor zu arbeiten. Renn et al. (1999) und Helfrich-Förster et al. (2000) machten die ersten Entdeckungen, die dieser Vermutung wissenschaftliche Grundlage verliehen: Sie fanden heraus, dass Fliegen ohne PDF eine signifikant kürzere Periodenlänge in ihrer lokomotorischen Aktivität im Freilauf zeigten, als der Wildtyp. Fliegen mit konstant zu viel PDF im dorsalen Protocerebrum hingegen, zeigten eine signifikant längere Periode als der Wildtyp. Außerdem wurden die meisten der Fliegen, egal ob sie gar kein, oder zu viel PDF hatten, innerhalb der ersten zwei Wochen im DD komplex rhythmisch, oder arrhythmisch (Renn et.al., 1999; Helfrich-Förster et al., 2000). Dies ließ zwei Schlüsse zu: Einerseits verlangsamt PDF anscheinend den Rhythmus der lokomotorischen Aktivität, was für die Weitergabe der circadianen Information an nachgeschaltete Effektorsysteme spricht. Andererseits ist der Organismus der Fliege mit einem aus dem Gleichgewicht geratenen PDF-Spiegel nicht in der Lage, den endogenen Rhythmus über längere Zeit hinweg synchron oder überhaupt aufrecht zu erhalten. Dies wiederum deutet darauf hin, dass PDF mit der Stabilität des circadianen Systems zu tun hat und die Schrittmacherzellen möglicherweise untereinander koppelt. Peng et al. (2003) und Lin et al. (2004) lieferten weitere Hinweise darauf, dass dem tatsächlich so ist: Erstere konnten nachweisen, dass ohne PDF im DD das Cycling der *tim* und *cry*-RNA in allen Uhrneuronen allmählich abnimmt und schließlich verschwindet; Lin et al. (2004) stellten fest, dass PDF zumindest die sLNv untereinander koppelt, denn in

Fliegen ohne PDF läuft in diesen Zellen die Translokation von PER in den Kern nicht mehr synchron ab.
Somit kann für PDF eine Output- und eine Kopplungsfunktion im circadianen Gefüge postuliert werden. Die genauen Mechanismen sind allerdings weiterhin unklar.

Theoretische Überlegungen zu den Versuchen

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht viel mehr über PDF bekannt, als eben das Expressionsmuster, dass es in den sLNv-Terminalen zyklisch vorhanden ist und die Wirkung auf die lokomotorische Rhythmik. In der Zwischenzeit kennt man bereits den Rezeptor von PDF (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005; Mertens et al., 2005). Das ursprüngliche Expressionsmuster des PDF-Rezeptors (Abb. 3), welches diesen auf den lLNv, aber nicht auf den sLNv beschrieben hatte, ist mittlerweile bereits auch revidiert: Nicht die lLNv haben den PDF-Rezeptor, sondern die sLNv (Shafer et al., 2008).

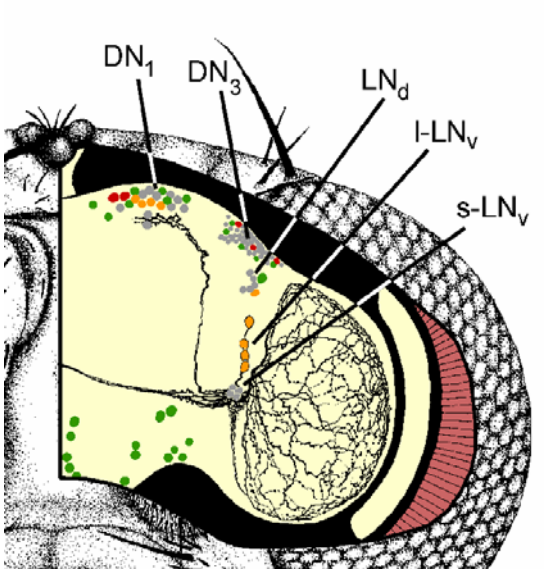


Abb. 3: Aus mehreren unabhängigen Veröffentlichungen zusammen gesetztes Bild der Expression des PDF-Rezeptors (Förster, 2006). Die einzelnen Zellen, variieren von Veröffentlichung zu Veröffentlichung (rote, gelbe und grüne Zellen), jedoch sah keine der Studien den PDF-Rezeptor in den sLNv oder DN2, nur in den lLNv, Teilen der LNd und den restlichen DN. Zusätzlich waren in einer Untersuchung auch Zellen außerhalb des Uhrnetzwerks gefunden worden.

Es war Ziel dieser Arbeit, das Wissen über PDF zu vertiefen und aufgekommene Fragen durch bereits beschriebene Ergebnisse und Hypothesen genauer zu beleuchten. Insbesondere sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Greift PDF in die Phosphorylierung von PER ein?

Wie oben erläutert, bewirkt PDF Periodenveränderungen der inneren Uhr. Solche Periodenveränderungen könnten durch Einflussnahme auf die Phosphorylierung der Uhrproteine PER oder TIM bewerkstelligt werden. Insbesondere eine Untersuchung von Petri und Stengl (2001) machte dies wahrscheinlich: Bei der Schabe *Leucophea maderae* führte ins Schrittmacherzentrum appliziertes PDH (Homolog des PDF aus Krabben) zu Phasenverzögerungen, egal zu welchem circadianen Zeitpunkt diese Administrationen geschahen. Eine Berechnung im Computer-Modell, mit allen bis dato bekannten „Zahnrädern" der inneren Uhr ergab, dass diese Reaktion höchstwahrscheinlich nur durch einen Eingriff in die Phosphorylierungen von Period erreicht werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten wildtypische Tiere und PDF-negative Tiere auf ihre Unterschiede in der Phosphorylierung getestet werden. Dies war möglich durch eine neue Western Blot Technik mit Immunhistochemie, die höhere Auflösung im Bereich der Phosphorylierungsstufen von Period versprach (siehe Odyssey™ Handbuch) als die gängige Chemolumineszenz-Methode.

2. Ist die lange Periodenlänge von *sine oculis*^{01} auf die zusätzlichen PDF-Fasern zurückzuführen?

Das *sine oculis*^{01} *(so*^{01}*)* Allel bewirkt, dass die Fliegen keine Augen mehr haben und sich ihre optischen Loben auf 20% der wildtypischen Größe verkleinern (Fischbach, 1983). Helfrich-Förster und Homberg (1993) haben berichtet, dass das Verzweigungsmuster der lLNv der *so*^{01} Fliegen nicht mehr dem gewöhnlichen Muster (Verzweigungen in der ipsilateralen Medulla , Projektionen und Verzweigungen über den hinteren optischen Trakt in die kontralaterale Medulla) folgen, sondern wohl aufgrund der mangelnden Größe des optischen Lobus in das zentrale Gehirn von *Drosophila* projizieren. Dadurch erhöht sich die Zahl der PDF-positiven Fasern in der akzessorischen Medulla. Außerdem zeigen *so*^{01} Fliegen eine längere Periode als der

Wildtyp (Helfrich, 1986). Sollte diese Periodenverlängerung mit den zusätzlichen PDF-Fasern und damit mit zusätzlichen PDF-Signalen im zentralen Gehirn zusammenhängen, sollte eine Einkreuzung des *Pdf*^{01} Allels in den *so*^{01} Hintergrund diese Verlängerungen rückgängig machen und diese Fliegen sollten eine Periodenlänge ähnlich oder gleich der von *Pdf*^{01} Fliegen zeigen.

3. Was geschieht, wenn man die Signalübertragung von PDF stört?

Sollte PDF tatsächlich mit seinen Signalen die Periodenlänge beeinflussen, muss sich, wenn diese Signalübertragung gestört wird, etwas an der Periodenlänge von den Fliegen ändern. Kaneko et al. (2000) hatten versucht, über das GAL4/UAS System die Synapsenübertragung in den PDF-Zellen per Tetanustoxin auszuschalten. Im Gegensatz zu Fliegen, die nach selektiver Ablation der LNv arhythmisch wurden oder mit kurzer Periodenlänge freiliefen, waren die Fliegen mit blockierten Synapsen in den PDF-Neuronen rhythmisch kaum betroffen (Kaneko et al., 2000; Renn et al. 1999). Tetanustoxin spaltet Synaptobrevin, ein Teil des SNARE Komplexes, der Vesikel für die Signalübertragung an die Membran bindet (Übersicht siehe Humeau et al., 2000). Da PDF aber anscheinend parakrin an unspezialisierten Stellen der Membran abgegeben wird (Miskiewitcz et al., 2004) und nicht an Synapsen, scheint diese Blockade PDF-Signale nicht beeinflusst zu haben.
Folglich muss nach anderen Wegen gesucht werden, die Signalübertragung von PDF zu stören. Eine Möglichkeit besteht darin, die Endozytose von PDF in nachgeschalteten Zellen zu unterbinden. Um das Signal zu beenden, werden Neuropeptide nämlich an ihrem Wirkungsort mitsamt dem Rezeptor internalisiert, oder durch Peptidasen abgebaut. (Übersicht siehe Nässel, .2002). Diese Rezeptor gesteuerte Endozytose ist Dynamin abhängig. Dynamin ist eine GTP-ase, die sich um den „Hals“ einer Clathrin ummantelten Einbuchtung der Zellmembran legt und sich bei Spaltung von GTP zu GDP zusammenzieht, was dann zu einer Abschnürung eines Vesikels in das Zellinnere führt (Abb. 4; Lodish et al, 2001).
Diesen Vorgang der Internalisierung kann man bei *Drosophila* mit Hilfe des thermosensitiven *Dynamin*-Allels *shibire*^{ts1} gezielt reversibel stören, indem man mit Hilfe des GAL4/UAS Systems das semidominante *shibire*^{ts1} Gen nur in bestimmten Zellen exprimiert. Wird nun die Fliege in Temperaturen von 28°C oder höher transferiert, funktioniert in den gezielt angesteuerten Zellen die zuvor beschriebene

Einschnürung nicht mehr, oder nur sehr eingeschränkt (Kitamoto, 2001; siehe auch Abb. 5).

Auf diese Art und Weise sollten Fliegen in ihrer Signalübertragung in verschiedenen Uhrzellgruppen, vor allem aber in den PDF-Zellen selbst beeinträchtigt werden.

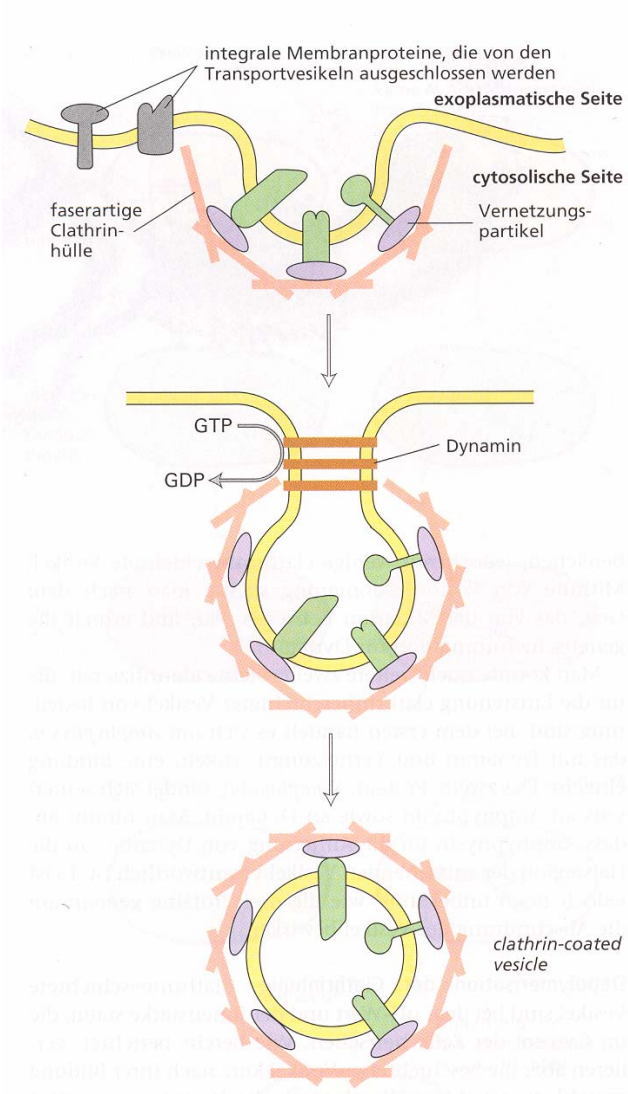


Abb. 4: Schematische Darstellung des Abschnürungsvorganges eines Vesikels mit Hilfe von Dynamin. (Lodish et al, 2001)

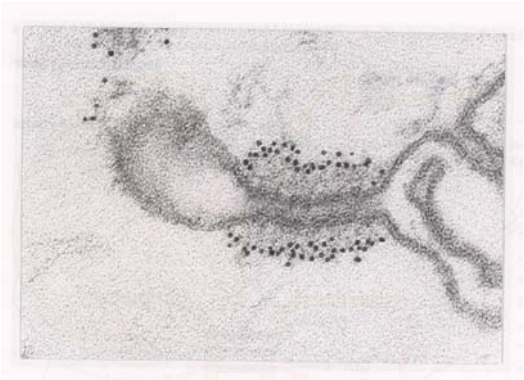


Abb. 5: Ist die GTP-ase nicht mehr funktionstüchtig, so legen sich mehr und mehr Dynaminmoleküle um den „Hals“ der Einschnürung, jedoch wird kein Vesikel mehr abgeschnürt. (Lodish et al., 2001)

4. Welche Zellen sind den sLNv nachgeschaltet?

Bei der Durchführung des gerade genannten Experimentes war es wichtig, zu wissen, welche Neuronen den PDF-Zellen nachgeschaltet sind. Leider sind diese bisher nicht bekannt. Deshalb wurde (erneut über das GAL4/UAS System) in den PDF-Neuronen Weizenkeimagglutinin (WGA), ein Lektin, exprimiert, das sowohl

anterograd als auch reterograd an Folgezellen, bzw. vorhergehende Zellen weitergegeben wird (Yoshihara et al., 1999; Tabuchi et al., 2000). Somit könnten die PDF-Folgezellen markiert werden und das neuronale Netzwerk der inneren Uhr von *Drosophila* um einen Baustein erweitert werden.

5. Was geschieht im circadianen Netzwerk, wenn man Teile oder alle der Hauptschrittmacher ablatiert?

Das Netzwerk der inneren Uhr von *Drosophila* ist komplex und wie bereits erwähnt noch nicht völlig entschlüsselt Es stellt sich die Frage, wie es nach Ablation der wichtigsten Uhrzellgruppen reagiert. Nach bisherigen Erkenntnissen sind die Hauptschrittmacher die lateralen Neuronen (sLNv, lLNv, 5^{th}-sLNv, LNd) (Rieger et al., 2006). Die anderen Uhrneuronen, die auf den Output der LN angewiesen sind, um im circadianen Netzwerk eine interne Synchronisation zu erhalten, könnten bei Fehlen der LN diesen Gleichklang verlieren.
Durch genaue Analyse der Laufaktivität dieser Fliegen und durch Färbungen im Gehirn zu verschiedenen Zeitpunkten sollte es möglich sein, eventuell auftretende Desynchronisation in den verbliebenen Uhrneuronen sichtbar zu machen. Welche Untergruppen der LN hierbei die wichtigste Rolle spielen, könnte die systematische Ablation verschiedener Untergruppen der LN aufzeigen.
Diese gezielte Ablation der Zellen sollte erneut mit dem GAL4/UAS System bewerkstelligt werden. *Head involution defective* ist ein *Drosophila*-eigenes Gen, das normalerweise programmierten Zelltod in Form von Apoptose in der Entwicklung der Fliege aktiviert. Unter der Kontrolle von UAS und GAL4 kann es in den gewünschten Zellen Apoptose induzieren und somit sind diese Zellen dann nicht mehr vorhanden.

Material und Methoden

Sämtliche Rezepte, Konzentrationen und pH-Werte sind im Anhang nachzuschlagen.

Fliegenstämme

Alle Stämme wurden bei einem Licht-Dunkel-Wechsel (LD) von 12:12 h und konstanten 20°C (± 2°) gehalten. Als Nahrung diente ihnen ein bewährtes Nährmedium. Die Fliegenkolonien wurden alle 2-3 Wochen auf neues Futter gesetzt. Verwendete Fliegenstämme sind in Tab. 1 dargestellt.

In vielen Experimenten wurde das sog. GAL4/UAS System verwendet. Das GAL4/UAS System (Übersicht siehe Duffy, J.B. 2002) stammt ursprünglich aus der Hefe *Sacharomyces cervisiae*. *GAL4* codiert für ein Protein mit 881 Aminosäuren, welches als Regulator für andere Gene wirkt und von Galaktose induziert wird. GAL4 kann an die DNA binden und besitzt transkriptionelle Aktivierungsfunkionen. Zielsequenz ist ein *Upstream Activating Sequences* (UAS) - Element, welches als Enhancer funktioniert und essentiell für die Aktivierungsfunktion von GAL4 benötigt wird. Mit Hilfe dieses Systems können in *Drosophila* Gene zielgerichtet in bestimmten Zellen angeschaltet werden. Dazu bringt man das *GAL4*-Gen unter die Kontrolle eines Promotors, dessen Protein das gewünschte Expressionsmuster zeigt und erzeugt einen Fliegenstamm, der diese Kombination stabil in seinem Genom trägt. Dieser Stamm wird als Treiber-Linie bezeichnet. In einen anderen Fliegenstamm sollte man das *UAS*-Element in Verbindung mit dem gewünschten Gen, das gezielt exprimiert werden soll, einbringen. Diese Fliegenlinie ist der so genannte Responder. Kreuzt man Treiber- mit Responderlinie erhält man im Nachwuchs Fliegen, welche nur in den bewussten Zellen das GAL4 Protein synthetisieren. Dieses bindet an das *UAS*-Element und somit wird die Transkription des gewünschten Gens aktiviert.

Ein weiterer Baustein in diesem System ist GAL80, ein Repressor aus der Hefe. Dieser bindet GAL4 und inaktiviert dieses somit. Wird also nun in der Treiberlinie *GAL80* unter die Kontrolle eines weiteren Promotors gebracht, kann man das zuvor eingebrachte *GAL4*-Konstrukt gezielt „abschalten“ (Suster et al., 2004).

Tab. 1.: verwendete Stämme und ihre Charakteristiken

Stamm (Bezugsquelle)	Mutations-/ Insertionsort	Phänotyp/ Expressionsschema
Wildtyp		
Canton S (Labor Hall)		wildtypische Fliegen
Mutierte Stämme		
yellow white (y w) (Labor Schneuwly)	X-Chr.	Yellow: dieses Protein wird zur Bildung von Melanin in der Kutikula benötigt, d.h. Fliegen mit einer *yellow* - Mutation haben einen honigfarbenen Körper. (Biessmann 1985) White: ATP-bindende Kassette des ABC - Transporters, welcher bei Mutation nicht mehr in der Lage ist den Precursor des Augenpigments richtig in die Zelle zu transportieren. Deshalb haben diese Fliegen weiße Augen.
yw; ;Pdf ^{01} (Labor Taghert)	3.Chr. (Renn et al. 1999)	Diese Null-Mutante kann kein funktions-tüchtiges PDF mehr herstellen. (Renn et al. 1999)
sine occulis (so) (Labor Fischbach)	2.Chr. 57,1 (Milani, 1951)	Ozellen werden nie gebildet, die Komplexaugen sind in unterschiedlichem Ausmaß bis hin zum vollständigen Fehlen reduziert. (Fischbach, 1983)
GAL4 Treiberlinien		
y w; $\frac{R6-GAL4}{CyO}$ (Labor Taghert)	2.Chr.	Diese Linie exprimiert in den kleinen ventrolateralen PDF-Neuronen und in Tracheen. (Helfrich Förster et al., 2007)
y w; Pdf-GAL4 (Labor Taghert)	2.Chr. (Renn et al. 1999)	Das GAL4 Protein wird hier in den großen und kleinen LNv hergestellt (Renn et al. 1999)
y w; cry^{BN}*-GAL4-13* (Labor Emery)	3.Chr.	In diesem Stamm findet man die GAL4 Expression in allen LN, den DN1a, 2 DN1p und und 2 DN3 (Emery et al., 2000; Helfrich-Förster et al., 2007)
y w; $\frac{Pdf-GAL80}{CyO}$; $\frac{cry^{BN}-GAL4-13}{MRS}$ (Labor Rosbash)	2.Chr./3.Chr.	Das *Pdf-GAL80* Konstrukt hemmt in den sLnv vollständig und in den lLNv nur teilweise die GAL4-Bildung, die der oben beschriebene *cry* - Treiber eigentlich bedingt. (Helfrich-Förster et al., 2007)
y w; tim-(UAS)-GAL4 (Labor Young)	2. Chr. (Blau and Young, 1999)	Alle Uhrneurone, einige ektopische Neurone und viele Gliazellen enthalten bei dieser Treiberlinie das Protein GAL4
UAS Responderlinien		
UAS-GFP S56T (Labor Fischbach)	Es existieren 2 Stämme mit Insertionen von *GFP* im 2. oder 3. Chr. Leider konnte nicht mehr nachvollzogen werden, welcher der verwendete Stamm war	Ein modifiziertes Green-Fluorescent-Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde unter Kontrolle der *Upstream Activating Sequences (UAS)* ins Genom der Fliege gebracht und fungiert so als Reportergen. Die Modifikationen betreffen die Absorptions- und Emissionswellenlänge, die eine optimale Anregung bei 488 nm gewährleistet (Abb. 3.1.). (Ito et al., 1997)
UAS-shi^{tsI} (Labor Kitamoto)	siehe *UAS-GFP*	In dieser UAS-Linie kann das semidominante thermosensitive *shibire*-Allel *shi*^{tsI} mit Hilfe des UAS-GAL4 Systems exprimiert werden. (Kitamoto, 2001)
$\frac{UAS-hid\ 16}{CyO}$ (Labor Schneuwly)	2. Chr. (McNabb et al., 1997)	*head involution defective (hid)* ist ein Zelltodgen, welches unter UAS-Kontrolle gezielte Ablationen möglich macht.

Immunhistochemie

Für die Immunhistochemieversuchen war es für die jeweilige Fragestellung nötig, die Tiere in unterschiedlichen Temperatur- und Lichtverhältnissen großzuziehen:

A.) *shi* ^{ts1} - Versuch
Nachwuchs aus den *Pdf-GAL4* × *UAS-shi*^{ts1} Kreuzungen und *Pdf-GAL4* Fliegen wurden sowohl auf 18°C als auch auf 28°C gezüchtet. Auf diese Weise sollten die Unterschiede im PDF-Cycling in den sLNv-Terminalen bei funktionstüchtigem bzw. defektem Shibire-Protein ans Licht kommen.

Diese Tiere wurden ohne Rücksicht auf ihr Geschlecht im Alter von 10-12 Tagen zu den Zeitpunkten ZT 23, ZT 1, ZT 3, ZT 5, ZT 7, ZT 9 und ZT 11 getötet, fixiert und später präpariert (s.u.).

B.) GFP-Expressionsversuch
Nachkommen aus den verschiedenen, bei 20°C kultivierten *GAL4* × *UAS-GFP* Kreuzungen wurden vor der Präparation je 9-12 Tage auf 20°C bzw. 28°C gehalten. Damit waren diese Fliegen in einem vergleichbaren Alterszustand in der GAL4-Expressionsstärke, wie in den *shi*^{ts1} Laufaktivitätsversuchen (s.u.).

C.) *Pdf-GAL80;cry-GAL4* × *UAS-hid* Versuch
Die bei Standardbedingungen gezogene F1-Generation der *Pdf-GAL80;cry-GAL4* × *UAS-hid* Kreuzung wurden nach 7-9 Tagen 12:12h LD ins Dauerdunkel (DD) transferiert. Die Temperatur blieb weiterhin konstant 20°C. Einen Teil der Fliegen präparierte ich am ersten Tag im DD zu den Zeitpunkten, die im LD ZT9 und ZT20 gewesen waren. Die restlichen Versuchstiere wurden zu denselben Zeitpunkten am 7. Tag im DD präpariert. Diese Zeitpunkte wurden so gewählt, da die Kontrollfliegen *UAS-hid* im Laufaktivitätsversuch mit ihrer 23,99 h Periodenlänge zu diesen

Zeitpunkten im DD ihr Aktivitätsmaximum, bzw. –minimum hatten. Somit sollten die synchronisierten Zellen zu diesen Zeitpunkten weniger (ZT9) und mehr (ZT20) gefärbt sein.

D.) *Pdf-GAL4 x UAS-WGA* Versuch

Auch hier wurde die F1 Generation der *Pdf-GAL4 x UAS-WGA* Kreuzung unter Standardbedingungen gezogen. Diese Tiere mussten allerdings WGA im Gehirn akkumulieren (mündliche Mitteilung von Dirk Rieger), weshalb die Versuchstiere und die Kontrollfliegen (*CS*) erst nach 5 Wochen präpariert wurden.

Präparation

In Phosphatpuffer (PP) freipräparierte *Drosophila* Gehirne (whole mounts) wurden 1h lang in Zamboni's Fixativ fixiert. Nach 3×10 min spülen mit PP wiederholte sich der Spülvorgang mit 3×10 min, allerdings mit Phosphatpuffer dem das Detergenz TritonX-100 in einer Konzentration von 0,5 % (PPT 0,5%) zugesetzt wurde. Um später unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde versucht, mit 5% Ziegenserum in PPT 0,5% über Nacht bei Raumtemperatur alle freie Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend inkubierten die Gehirne bis zum nächsten Tag bei 4°C in der Lösung mit dem primären Antikörper. Nach 5×10 min Spülen in PPT 0,5% wurde der fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper aus der Ziege aufgebracht. Die Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Antikörper sind in Abb. 6 zu sehen. In dieser Lösung verblieben die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur. Der letzte Spülvorgang (4×10 min PPT 0,5% und 10 min PPT 0,1%) sollte dann den restlichen ungebundenen Antikörper auswaschen. Die whole mounts wurden in Vectashield ® eingebettet und bei 4°C aufbewahrt, um eine Austrocknung zu verhindern. Mussten die Fliegen zu einem bestimmten Zeitpunkt präpariert werden, wurden sie direkt in Fixativ, mit 0,5% TritonX-100 versetzt, getötet.

Nach 1h wurden die Fliegen 5×10 min in PPT 0,5% gespült. Erst dann erfolgte die Gehirnpräparation. Das restliche Procedere blieb identisch.

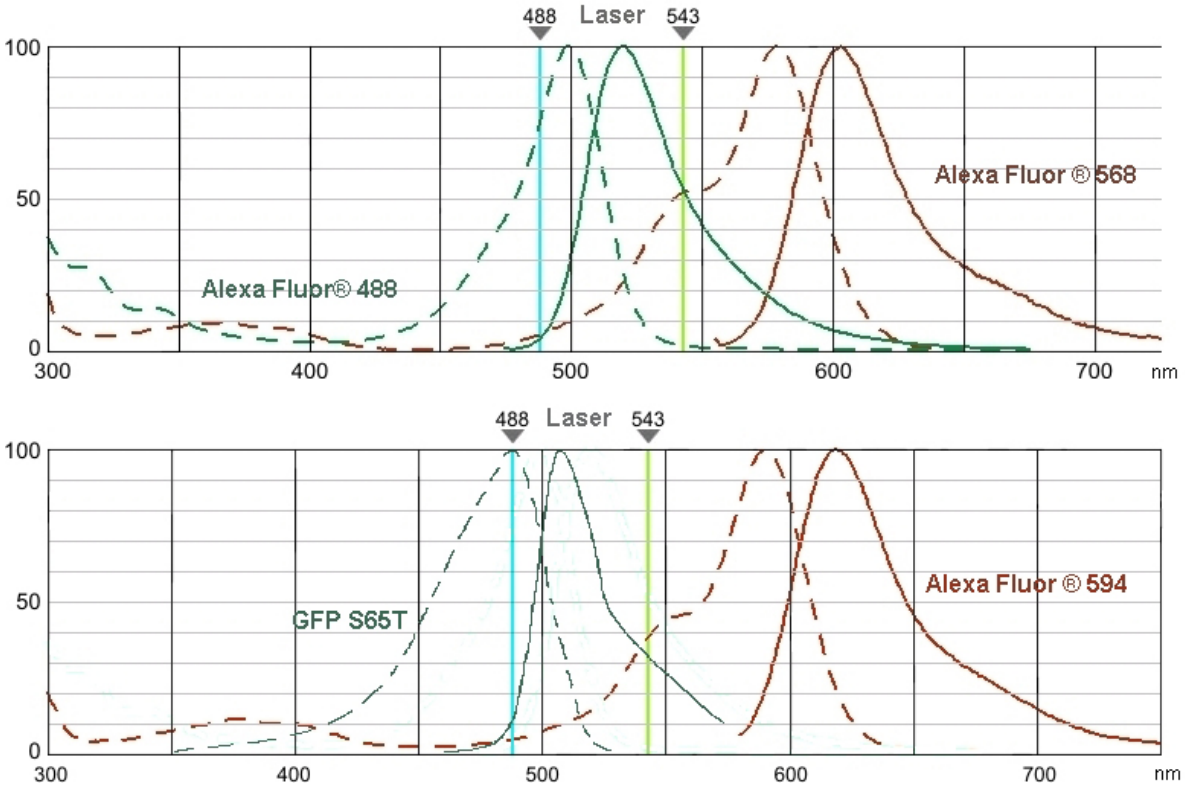


Abb. 6: Absorbtions- und Emissionsspektren der verwendeten sekundären Antikörper, bzw. des eingekreuzten GFP. Gestrichelte Linien zeigen Anregungsspektren, durchgezogene Kurven stellen das Emissionsspektrum dar. (modifiziert nach http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/ und Heim and Tsien, 1996)

Auswertung

Die Präparate wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Microscope (LSM) 510 von Zeiss digital gescannt. Die Dicke der optischen Schnitte sollte ein konstanter Faktor bleiben und war auf 2µm (±0,1µm) festgelegt. Es wurde für jeden Versuch zusätzlich darauf geachtet, dass der Vergrößerungsfaktor bei der Aufnahme der Gehirne gleich war. Der Faktor war so gewählt, dass die zu untersuchenden Strukturen in einer Gehirnhälfte pro Aufnahme zu sehen waren. Für jeden Versuch entstand deshalb pro gescannter Hirnhemisphäre ein Datenfile. Die resultierenden konfokalen Schnitte konnten je nach Bedarf zusammenmontiert werden, sodass ein gemeinsames Bild entstand, oder wurden direkt weiter für die Auswertung genutzt. Für die Auswertung der PDF-Menge in den Terminalen wurden all die Schnitte zusammengenommen, die Teile der Terminalen beinhalteten und als Tagged Image File Format (TIFF) - Datei exportiert. Auch für die Messung der Expressionstärke der *GFP*-Treiberlinien wurden die Schnitte, die Teile der einzelnen Neuronengruppen

enthielten jeweils verbunden und umgewandelt. Überstieg die Anzahl der Schnitte, die Teile der Neuronengruppen zeigten, jedoch 10, d.h. waren die Zellgruppen dicker als 20µm, wurden mehrere verschiedene Montagen gemacht, die jeweils einzelne gefärbte Nervenzellen enthielten. Die Schnitte für die PER-Bestimmung in den vielen einzelnen Neuronen blieben aus Gründen der Arbeitsersparnis jedoch im ursprünglichen Format (LSM-File), und nur der Schnitt, in denen das zu messende Neuron scharf umrandet zu sehen war, kam der Auswertung zu. Die Intensitätsbestimmung erfolgte mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ[1]. Dazu wurden die TIFF- bzw. LSM-Bilder geöffnet und vom RGB-Color Modus in den 8-bit Modus umgewandelt. Bei den LSM-Files gewährleistete dies eine Standardisierung der einzelnen Gehirne, da die Intensitätsschritte nun ebenso wie die TIFF-Bilder jeweils von 0 bis 255 festgelegt waren, und nicht jedes einzelne Bild einen eigenen Tiefst- bzw. Höchstwert im Bereich von 0 bis 65535 aufwies. Das Programm nahm hierzu das Minimum bzw. Maximum des gegenwärtig geöffneten Schnittes und skalierte danach den gesamten Stapel linear von 0 bis 255.

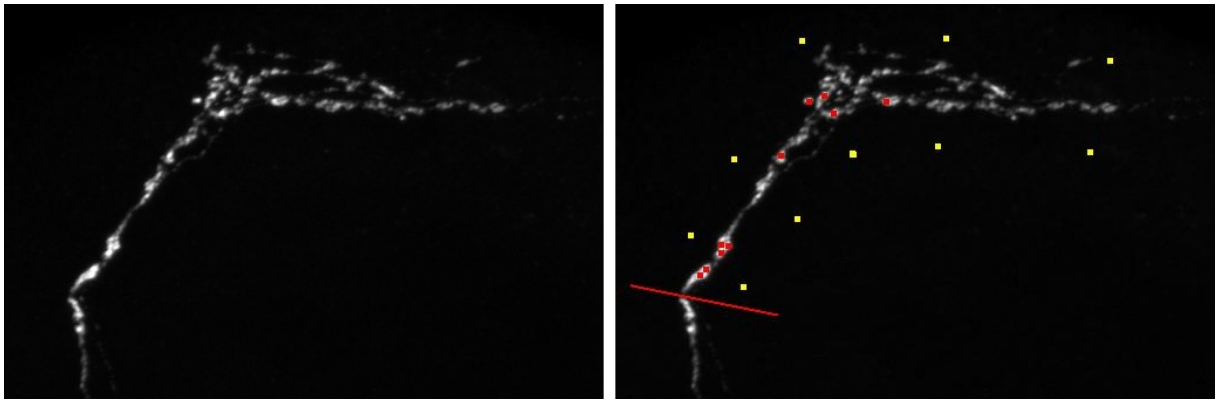


Abb. 7: Beispiel vor und nach einer Punktintensitätsbestimmung. Rote Markierungen repräsentieren die 10 subjektiv hellsten Punkte in den Terminalen. Gelbe Markierungen zeigen 10 frei gewählte Hintergrundsintensitätsmessungen

Bei den Bildern der Terminalen wurde die Funktion des Point Selection Tools von ImageJ genutzt, mit welchem die 10 subjektiv hellsten Punkte in den Endigungen der sLNv (Park et al., 2000) zu markieren und deren Intensität zu erfassen waren (siehe Abb. 7). ImageJ zeigte die Intensität dieser Punkte an und ermöglichte, diese Werte zu speichern.

[1] © National Institutes of Health, USA

Eine fast identische Methode kam im *WGA*-Versuch zum Einsatz, allerdings wurden hier nur die drei hellsten WGA-Punkte in den Versuchs und Kontrolltieren angeklickt, die direkt neben den PDF-Terminalen lagen. Als Referenz galt ein Punkt in der Calyx des Pilzörpers, die nur Hintergrundfärbung aufwies. Somit war ausgeschlossen, dass unspezifische WGA Färbung im dorsalen Gehirn fälschlicherweise als Hintergrundfärbung gewertet wurde.

Mit Hilfe einer frei zugänglichen Zusatzfunktion des Programms - YAWi2D[2] - konnten auch die mittleren Intensitäten von Zellkörpern ermittelt werden. Dazu wurde per Computermaus mit dem „Zauberstab“ so lange auf den zu untersuchenden Zellkörper geklickt, bis dieser vollständig umrandet war (siehe Abb. 8). Das Programm gab dann die mittlere Intensität an. Da der Grad an Fluoreszenz proportional zur Menge an Antigen oder Fluoreszenzprotein ist, konnte auf diese Weise die durchschnittliche Höhe der GFP-Expression oder die mittlere PER-Menge bestimmt werden.

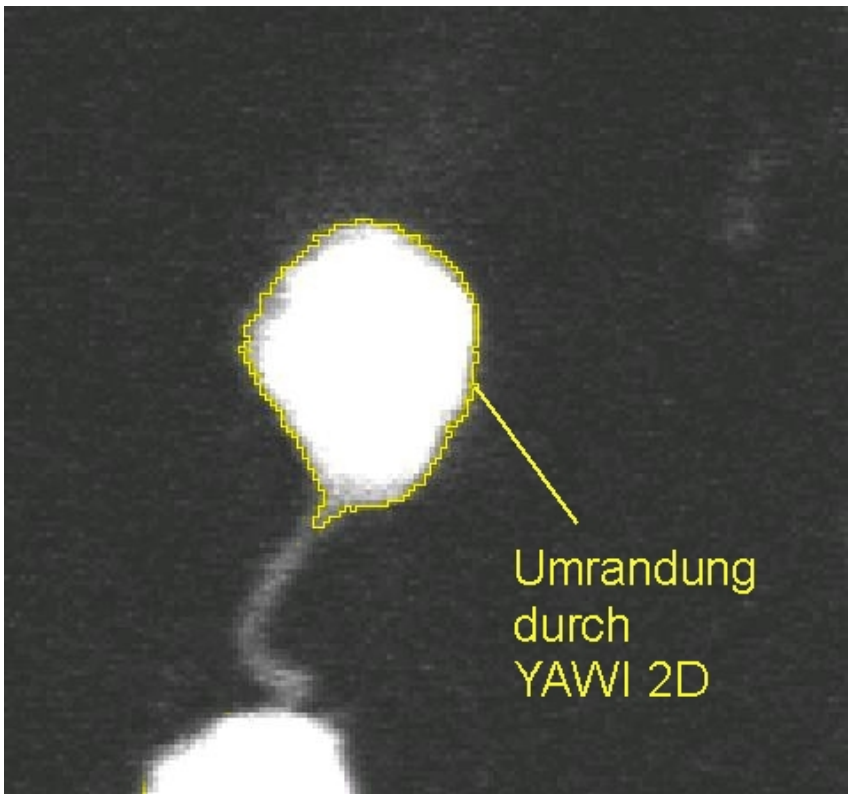


Abb. 8: lLNv mit YAWI2D Umrandung.

[2] ©Guarracino M.R., Coppola, D. und Lassandro F. http://yawi3d.sourceforge.net/

Statistik

Alle Tests wurden mit dem Programm SYSTAT ®[3] für Windows durchgeführt. Soweit vorhanden wurden von jeder Präparation mindestens 8 Gehirne, also 16 Hemisphären ausgewertet. Aus den jeweils gemessenen Intensitätswerten einer Hemisphäre ergaben sich Mittelwerte von Neuronengruppen bzw. Terminalen pro Gehirnhälfte. Dies ergab je Zeitpunkt, bzw. Temperatur oder GFP-Expression statistisch vergleichbare Wertetabellen. Als Signifikanzgrenze wählte ich eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p \leq 0{,}05$. Bei $p \leq 0{,}001$ galten die Werte als hochsignifikant unterschiedlich. Einem Test auf Normalverteilung folgte eine Varianzanalyse (ANOVA) und im Bedarfsfall ein Post Hoc - Test nach Bonferroni, um signifikante Unterschiede in den Färbungen zu finden. Entsprachen die Werte keiner Normalverteilung, wurden die statistischen Tests trotzdem durchgeführt und die Irrtumswahrscheinlichkeit nach Glaser (1978) angepasst, d.h. der erhaltene p-Wert wird multipliziert um einen strengeren Test zu erhalten. Sind danach die p-Werte immer noch unter dem Signifikanzniveau, kann getrost von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden.

Laufaktivität

Als Versuchstiere für die Laufaktivität dienten ausschließlich 1-3 Tage alte Männchen. Die Auswahl erfolgte unter binokularer Kontrolle und CO_2-Betäubung. Mit Ausnahme der Tiere in den *shi*^{ts1} - Versuchen wurden alle Laufaktivitätsfliegen auf 20°C gezüchtet. Die Aufzucht der Ersteren erfolgte auf 18°C, damit sich kein defektes Shibire-Protein bilden konnte.
In den meisten Fällen wurden die Tiere für 5-7 Tage in einem Licht-Dunkel Wechsel von 12:12 h gehalten. Danach folgte eine 2-3 Wochen lange Periode mit konstanter Dunkelheit. All dies geschah bei einer Temperatur von 20°C (± 2°). Ausnahme dieser Regel waren die *shibire*-Versuche. Hier war der Versuchsraum erst ca. 2,5 Wochen

[3] Version 11.00.01 © SYSTAT Software, Inc. 2004

auf 18°C temperiert, daraufhin wurde diese Klimakammer auf 28°C hochgeheizt. Nach insgesamt 3 Wochen Dauerdunkel, bekamen die Fliegen dann wieder eine Woche lang einen 12:12 h Licht-Dunkel-Wechsel.

Aufzeichnung

Damit die Laufaktivität einzelner Fliegen aufgezeichnet werden konnte, mussten diese isoliert werden. Jedes Versuchstier wurde vorsichtig und unbeschädigt in eine Fotometerküvette eingesetzt, die mit einem Körnchen Hagelzucker als Futter bestückt war. Oben befand sich ein Loch mit Gazenetz bespannt zur Luftversorgung. An der Unterseite ermöglichte ein weiteres kleineres Loch die Wasserversorgung. Acht dieser Küvetten waren zu einer Einheit zusammengeklebt (8-er Einheit), welche mit einer exakt passenden Abdeckung aus Plexiglas verschlossen wurde. Dieser Deckel hatte oben ebenfalls acht größere Löcher, die über den Luftlöchern mit Netz zu liegen kamen (Abb. 9). Die Wasserversorgung erfolgte über einen unten liegenden Spalt, in welchen ein Schwammtuchstreifen platziert wurde, der so die Wasserversorgungslöcher verschloss. Die Enden dieses Schwammes lagen in Wasserbehältern und konnten über die Dochtwirkung Feuchtigkeit zu den Küvetten transportieren.

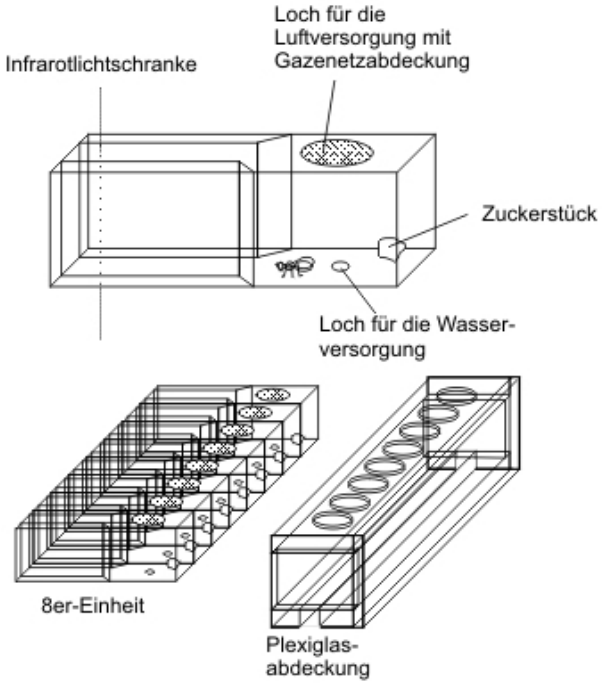


Abb. 9: Einzelne Fotometerküvette als Registrierraum für eine einzelne Fliege und die endgültige 8er Einheit mit der dazugehörigen Abdeckung aus Plexiglas.

Vier der 8-er Einheiten (also 32 Messplätze) wurden in eine Aufzeichnungseinheit gesteckt. Dort kam am gegenüberliegenden Ende von Futter und Wasser je eine Infrarotlichtschranke pro Küvette zu liegen. Dies garantierte, dass keine Futter- oder Wasseraufnahmeaktivität, sondern nur Laufaktivität registriert wurde. Die Lichtschranke bestand aus einer infrared light emitting diode (LED) und Phototransistor (PT). Bei Unterbrechung des Infrarotlichtstrahls registrierte dies der PT und gab einen elektrischen Impuls über eine Interfacekarte an einen Multiplexer (MP) und schließlich eine periphere Prozessoreinheit (PPU) weiter (Abb. 10). Von hier wurden die Daten stündlich fortlaufend auf einen PC übertragen. Da wurden die Daten der jeweils letzen 30 Tage auf einer Diskette gespeichert. Eine mit der PPU verbundene Funkuhr gewährleistete eine exakte Zeitmessung im Versuch. Die resultierenden Stundenwerte waren digital in 15 4-Minuten-Intervalle verschlüsselt, wobei die ein- oder mehrmalige Passage der Lichtschranke innerhalb dieser 4-Minuten-Intervalle als „aktiv“ bewertet wurde. Ansonsten galt die Fliege als „inaktiv“. Auf diese Weise erhielt man pro Stunde 15 „Aktiv-Inaktiv-Entscheidungen“. Insgesamt standen 8 Aufzeichnungseinheiten à 32 Küvetten für insgesamt 256 Fliegen pro Versuch zur Verfügung. Jede dieser Einheiten war von einem Metallgehäuse umgeben, um elektrische Störungen zu vermeiden.

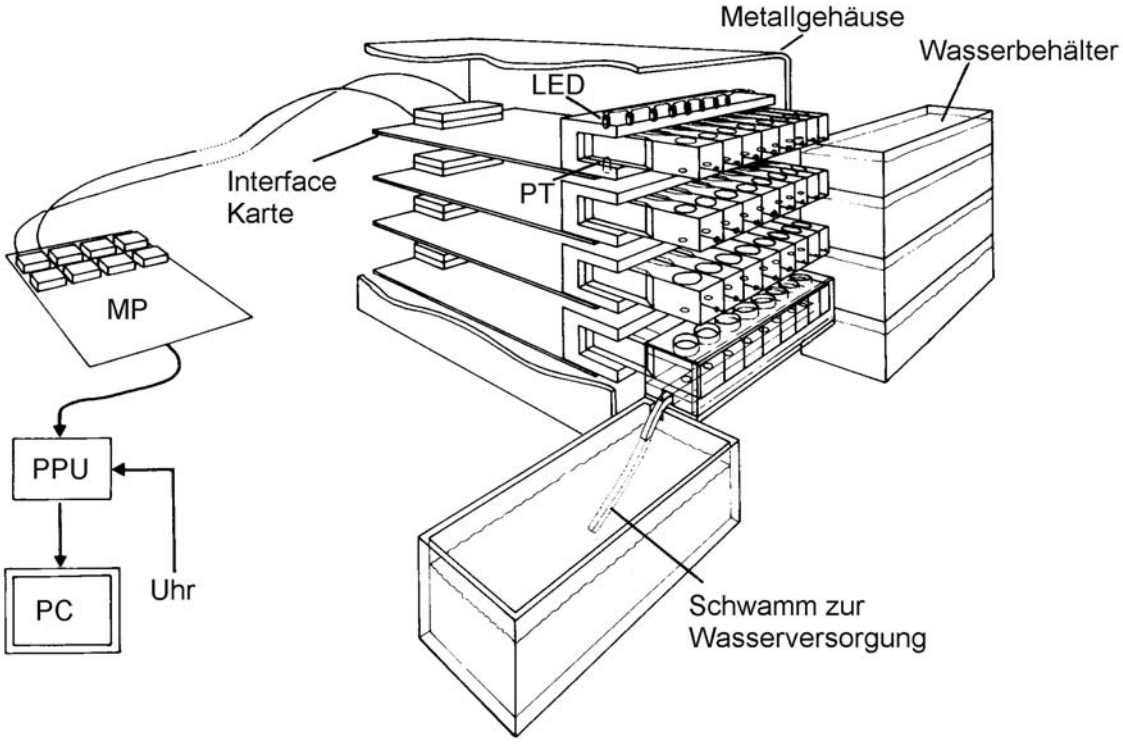


Abb. 10: Vier 8er-Einheiten ergeben zusammen eine Aufzeichnungseinheit. (modifiziert nach Helfrich-Förster 1998)

Auswertung

Die Daten wurden mit verschiedenen Linux-Programmen („akto“[4], „conv.py“[5] und „pyth2elt“[6]) in eine Form gebracht, welche das Windows-Programm „El Temps“[7] einlesen konnte. Hier wurden dann Aktogramme und soweit möglich Durchschnittstage und Periodenlängen berechnet. Aktogramme sind Darstellungen der Aktivität über einen gewissen Zeitraum, wobei alle 24h eine neue Aktivitätszeile unter die vorherige gesetzt wird (siehe Abb. 11 A). So erhält man im Laufe der Zeit ein Bild, welches den zeitlichen Aktivitätsverlauf einer Fliege genau darstellt. Veränderungen im Freilaufverhalten kann man unter Umständen besser sehen, wenn man 48h hintereinander, jedoch immer noch jeweils 1 Tag untereinander darstellt. Eine solche Illustration nennt sich Doppelplot und ist in Abb. 11 B zu sehen. Um ein allgemeines Aktivitätsprofil der Fliegen zu erhalten, konnten mit Hilfe der Programme die durchschnittlichen Aktivitätsmengen über 24h hinweg ermittelt werden. Die Kurve der Durchschnittstage und die zugehörigen Standardfehler wurden als Wertetabelle exportiert und in Techplot[8] eingelesen und geglättet. So waren sie für die endgültige Darstellung besser geeignet. Ein solcher Durchschnittstag über insgesamt 6 Tage ist in Abb. 12 dargestellt.
Durchschnittstage von einzelnen Fliegen dienten in einem Teil der Versuche dazu, die Akrophase der morgendlichen, abendlichen und nächtlichen Aktivität zu berechnen. Hierzu wurden die Kurvenwerte der Einzeldurchschnittstage aus El Temps ausgelesen und in Systat eingelesen. Hier gab es die Funktion „Smooth & Plot“. Es wurden Regressionen durch die Daten gelegt, allerdings hatte nicht jeder Datenpunkt dieselbe Gewichtung, sondern Daten, die nahe am zu berechnenden Datenpunkt lagen bekamen mehr Gewichtung als weiter außen liegende Daten. Dadurch erfuhr die Kurve des Durchschnittstages eine extreme Glättung und so konnten die Maxima dieser neuen Kurven als Akrophasen der jeweiligen Aktivität gerechnet werden.

[4] © Hellrung, W.; Tübingen
[5] © Engelmann,D.; Tübingen
[6] © Neumann, S.; Tübingen, 2000
[7] Version 1,187 © Dièz-Noguera, A.; Barcelona, 1999
[8] © Dietrich, R.; Braunschweig

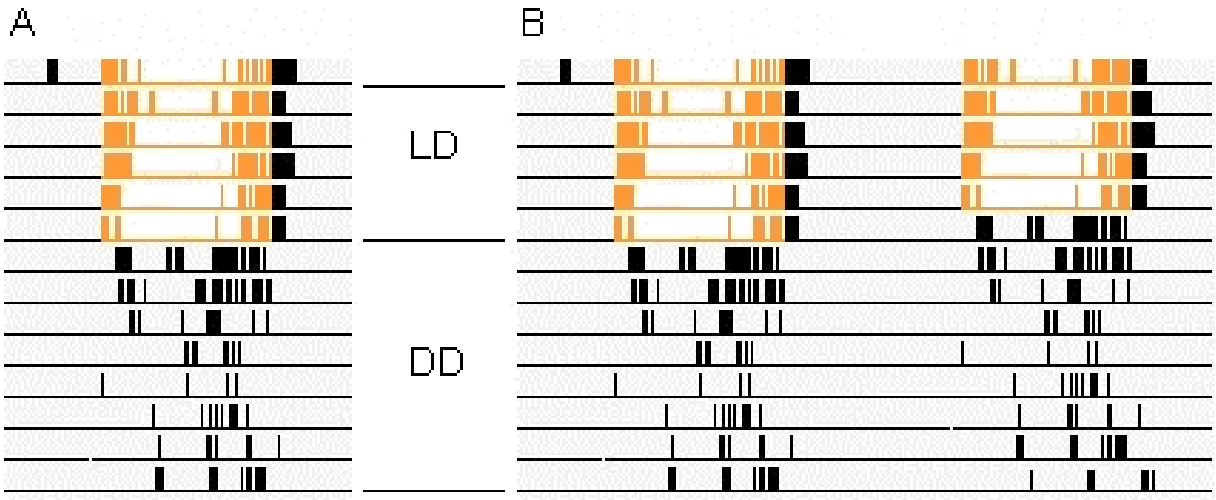


Abb. 11: Beispielaktogramm einer Wildtypfliege. Links ist ein einfaches Aktogramm zu sehen, rechts die Aktivität derselben Fliege als Doppelplot. Die gelben Bereiche kennzeichnen Lichtzeiten. Nach dem 6. Tag blieb das Licht aus, und die Fliege zeigte in konstanten Bedingungen ihren endogenen Rhythmus.

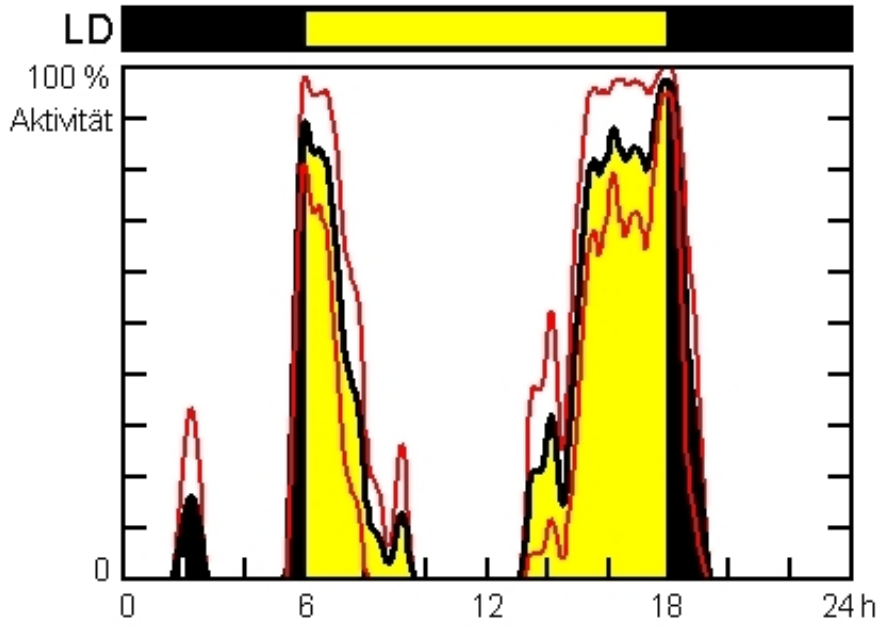


Abb. 12: Durchschnittstag der Wildtypfliege von Abb. 4. Hierzu wurde die Aktivität der ersten 6 Tage gemittelt und dann geglättet.

Für die Periodenlängenbestimmung konnte das Programm El Temps eine Periodogrammanalyse nach Sokolove-Bushell durchführen. Alle erhaltenen Werte wurden einer statistischen Überprüfung unterzogen.

Um die durchschnittliche Menge der Aktivität Morgens, Abends und in der Nacht ermitteln zu können, wurden in bestimmten Fällen die Durchschnittstage einzelner Fliegen mit Image J folgendermaßen bearbeitet: Aus El Temps als Bilddatei exportierte Einzeldurchschnittstage, die alle standardisiert waren, sprich dieselbe Größe und Qualität hatten, wurden in Image J eingelesen. Hier wurden die vorher festgelegten Abschnitte von morgendlicher, abendlicher und nächtlicher Aktivität nacheinander eingefärbt und dann die Pixelfläche mit dem Zauberstab umrandet und bemessen (Abb. 13). So ergaben sich für die einzelne Fliege Daten über die Menge der verschiedenen Aktivitäten am Tag. Diese Daten wurden dann ins Verhältnis zur Pixelfläche der gesamten Aktivität der einzelnen Fliege gesetzt. Somit wurden Fehler durch individuelle Unterschiede in den Aktivitätsmengen umgangen. Mit den resultierenden Mittelwerten der Stämme konnten dann statistische Vergleiche durchgeführt werden.

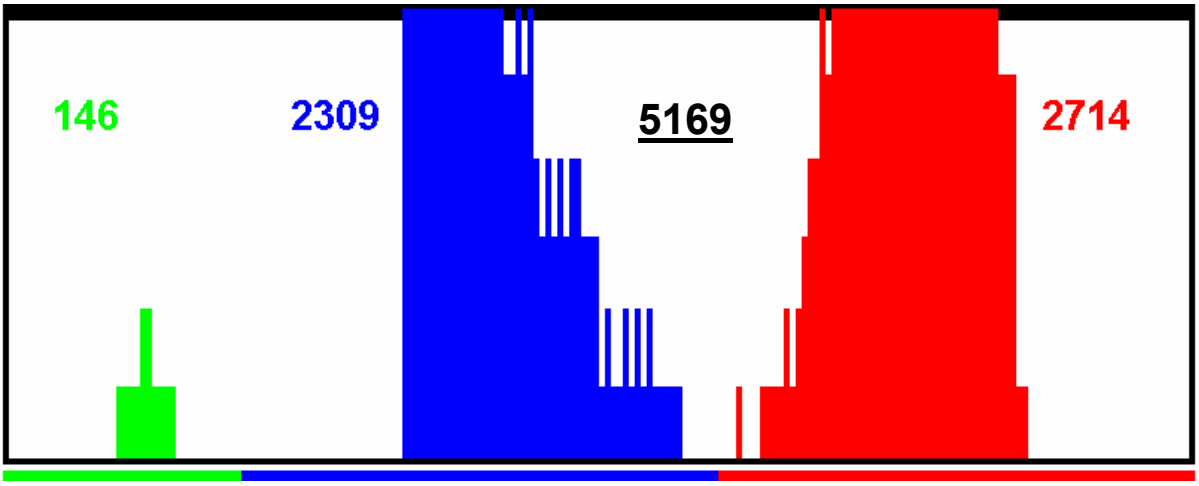


Abb. 13: Ein standardisierter Einzeldurchschnittstag mit Markierungen, die festlegen, wann Aktivität zu einem Nacht-, Morgen- oder Abendpeak gerechnet wird. Grün ist hierbei nächtliche, blau morgendliche und rot abendliche Aktivität. Die farbigen Zahlen geben jeweils die Anzahl der Pixel, die die jeweilige Aktivität einnimmt, wieder. Die unterstrichene schwarze Zahl ist die aus den Einzelteilen aufaddierte Gesamtaktivität dieser Fliege.

Statistik

Auch hier wurden alle Tests mit dem Programm SYSTAT ® durchgeführt. Die statistisch vergleichbaren Wertetabellen entstanden nun durch die verschiedenen Aktivitäsmengen, bzw Akrophasen oder Einzelperiodenlängen der Fliegen pro Genotyp und – falls erforderlich - „Behandlung“. Diese bestand beispielsweise aus Temperaturwechseln. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde mit den Werten genauso verfahren, wie bei den Präparationsversuchen.

Western Blot

Für die Western Blots wurde keine Rücksicht auf das Geschlecht der Versuchstiere, die bis zu 1 Woche alt waren, genommen. Alle Fliegen wurden bis zum Versuchszeitpunkt unter Standardbedingungen (siehe Seite 18) gehalten. Für einen Western Blot - Ansatz wurden mindestens 50 Versuchstiere pro Zeitpunkt und Genotyp vorbereitet.

Präparation

Für diesen Ansatz wurden *y w; ;Pdf*^{01} als Versuchstiere und *y w* als Kontrolltiere verwendet. Die synchronisierten Fliegen wurden über einen 24h hinweg alle zwei Stunden, beginnend mit Zeitpunkt ZT1 abgesammelt. Dies ging folgendermaßen von statten: Die Fliegen wurden aus ihren Kulturgläschen über einen Trichter in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen[9] geschüttelt, welches fingerbreit in flüssigem Stickstoff stand. Auf diese Weise Schock gefroren, konnten die Versuchstiere weiterverarbeitet werden, ohne dass *Drosophila*- eigene Proteasen das Ergebnis verfälschten. Immer noch gefroren wurden die Fliegen in den Röhrchen Vibrationen ausgesetzt (Vortex-Genie2 ®[10]). Somit wurden die Köpfe der Fliegen vom Körper getrennt. Das Aussortieren der Köpfe auf Trockeneis schützte die Proteine weiterhin vor Abbau. Jeweils 25 Köpfe pro Zeitpunkt und Genotyp wurden eisgekühlt mit Proteinextraktionspuffer versetzt und homogenisiert (Biovortexer[11]). Dieses Homogenisat wurde 2 × 6 min. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge pico[12]). Der Überstand wurde überführt, das Pellet verworfen. Die Proben wurden mit jeweils 10µl 5-fach-DGLP Gelladepuffer versetzt und 3 min. bei 95°C aufgekocht. 30µl dieses Gemischs wurden in die Ladetaschen zweier Polyacrylamidgele[13] (4,5%

[9] TPP ®, Europe/Switzerland
[10] Scientific Industries, Inc.; Bohenia, NY, USA
[11] Biospec Products; Bartsville, OK, USA
[12] Heraeus /Kendro Laboratory Products GmbH; Hanau, Deutschland
[13] Herstellung siehe Anhang

Polyacrylamid im Sammelgel, 6% im Trenngel) pippetiert (Gelapperatur: HoeferTM SE600[14]). Die Auftrennung erfolgte ca. 16h bei 55V 150mA und 5W (Consort Power Supply E 835[15]) in 1-fach Elektrophoresepuffer. Jedes der zwei Trenngele wurde nach der Proteinseparierung so zurechtgeschnitten, dass die erwünschte Auftrennungsregion mit reichlich Spielraum erfasst war. Eines dieser Gelstücke kam auf 3 in Semi-Dry-Blotting-Buffer (SDBB) getauchte Whatman Filter und einer gewässerten Nitrocellulosemembran zu liegen, die ganz exakt auf die Gelgröße zugeschnitten waren. Auf das Gel wurden noch einmal drei mit SDBB befeuchtete Whatman Filter gelegt. Dieser Aufbau mußte auf die Plus-Pol Platte des PerfectBlue™ Semi-Dry-Electroblotters[16] geschichtet werden. Eventuell vorhandene Luftblasen in dem „Sandwich“ wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig herausgerollt. War anschließend die Minus-Pol Platte vorsichtig mit gleichmäßigem Druck obenauf geschraubt, wurden die Proteine eine Stunde lang bei 400 mA, 30V und 250 Watt auf die Membran transferiert. Ebenso wurde mit dem 2. Gel verfahren. Nach Auseinandernehmen der Blots, mußte darauf geachtet werden, dass die Membranen mit der Proteinseite nach oben auf mit Parafilm[17] ummantelte Glasscheiben in einer feuchten Kammer platziert wurden. Hier wurden per Überschichtung mit Odyssey Blocking Buffer[18] 2 h lang die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Danach inkubierten die Membranen bei 4°C über Nacht im Period-Antikörper[19]. Der Inkubation folgten mehrere Spülvorgänge mit Tris-gepufferter Saline, die mit einem Tensid versetzt war (TBST) (20sec, 30min, 15min, 3×5min). Abgeschirmt von Licht und bei Raumtemperatur verblieb der sekundäre fluoreszierende Antikörper[20] für 2 h auf den Membranen. Der hier verwendete Antikörper von Rockland™ konnte durch eine Wellenlänge von 800nm angeregt werden (Anregungs- und Emissionsspektrum siehe Abb. 14). Nach erneutem Spülen (s.o.) konnten die Membranen mit dem Odyssey™ Infrared Imaging System[21] gescannt werden.

[14] Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Germany
[15] peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
[16] peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
[17] American National Can Company, USA
[18] Li-Cor® Biosciences; Lincoln, NE, USA
[19] aus dem Kaninchen. Verdünnung: 1:10000 in 5% Milch in TBST mit 0,02% Natriumazid (Stanewsky)
[20] IRDyeTM 800 Goat anti Rabbit Rockland
[21] Li-Cor® Biosciences; Lincoln, NE, USA

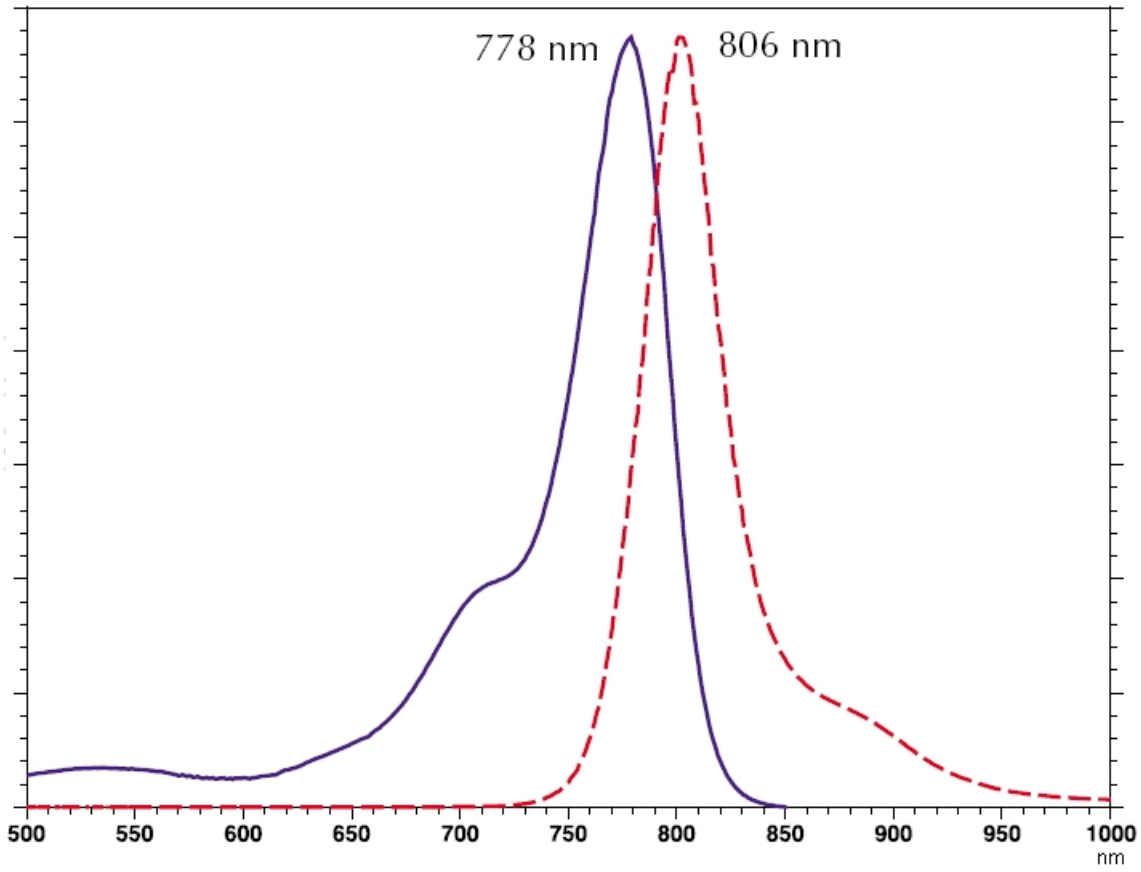


Abb. 14: Absorptions- und Emissionsspektrum des sekundären Western Blot Antikörpers IRDyeTM 800 (modifiziert nach http://biosupport.licor.com/docs/odyssey/applicationbriefs/IRdye800_Ab_kit.pdf)

Auswertung

Der Scanner lieferte ein TIFF-Bild, welches mit der Odyssey-eigenen Software analysiert wurde. Hierzu zeichnete man Rechtecke um die Proteinbanden. In diesem Fall wurde die period-Protein Region in zwei Banden aufgeteilt: eine höher und eine niedriger phosphorylierte per-Bande (siehe Abb. 16). Das Programm errechnete in einem mehrere Pixel breiten Umfeld des Rechtecks einen Hintergrundwert (siehe Abb. 15), der dann von der Intensität innerhalb des Rechtecks abgezogen wurde. Der angegebene Wert hieß „Integrated Intensity“.

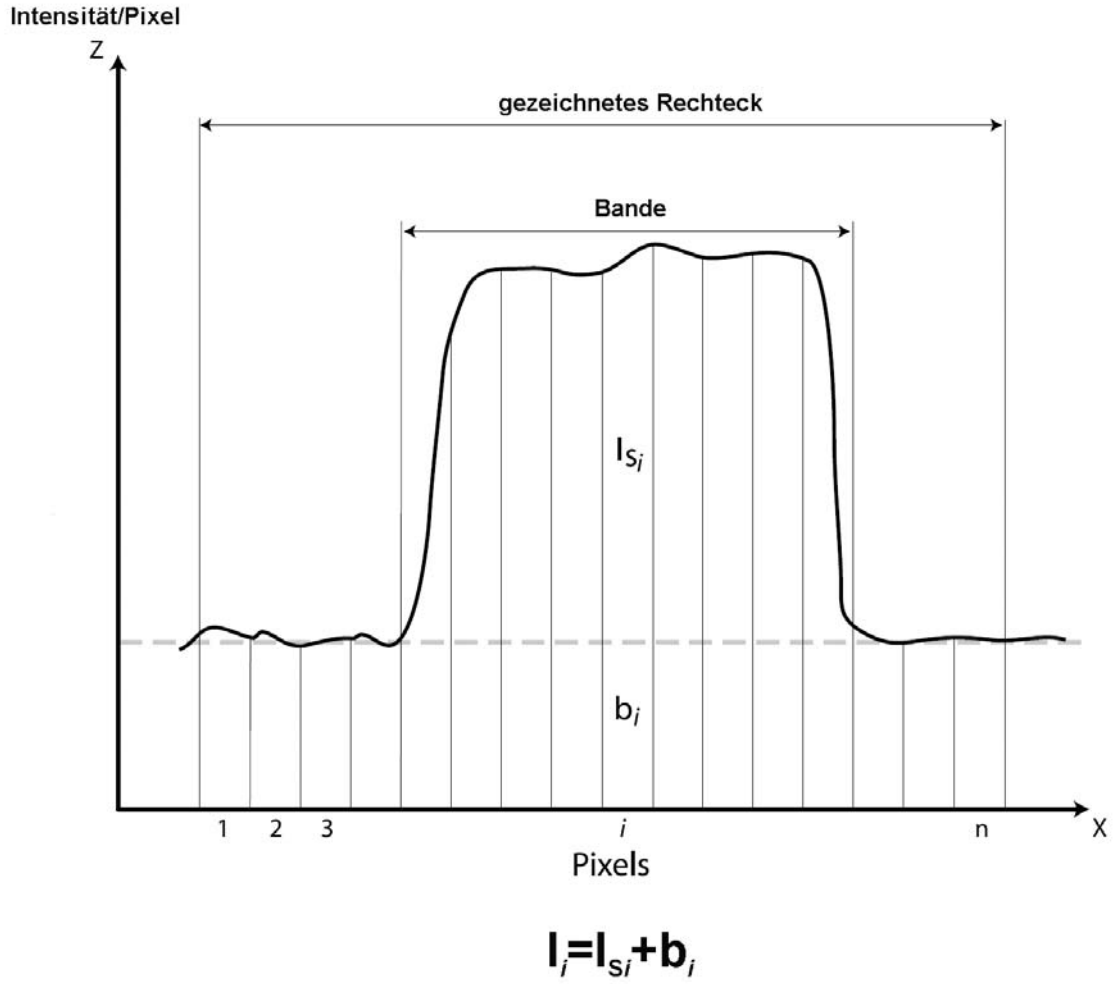


Abb. 15: Grafische Darstellung der Berechnung der Intensität. Die Banden bestehen aus der Intensität des Signals und der Intensität des Hintergrunds. Um die Proportionalität der Fluoreszenzfärbung zur Proteinmenge nutzen zu können, muss das Signal vom Hintergrund getrennt werden. Das Programm erkennt in mehreren Pixeln rund um das Signal die durchschnittliche Intensität des Hintergrunds und kann dann diesen Wert vom eigentlichen Signal abziehen. (I = Intensität; b= Hintergrund; S = Signal) (modifiziert nach dem Odyssey User Manual)

Damit Intensitätsschwankungen zwischen den einzelnen Blots keine Rolle spielten, wurden all diese resultierenden relativen Intensitäten eines Blots auf dessen Maximalintensität normalisiert, d.h. jeder Blot hatte dann nur noch Intensitätswerte von 0 bis 1. Da ich insgesamt 3 Mal das gesamte Prozedere mit *y w* und *y w; ;Pdf*[01] durchführte, konnten für jede Bande ein Intensitätsmittelwert berechnet werden.

Statistik

Die Statistik wurde wieder mit dem SYTAT® Programm durchgeführt.

Ergebnisse

1. Untersuchung von PER-Phosphorylierungsbanden bei *y w* und *y w; ;Pdf*^{01}

Wie bereits erwähnt, zeugen bisherige Versuche von einer Einflussnahme von PDF auf die innere Uhr bei *Drosophila* (Renn et.al., 1999; Helfrich-Förster et al., 2000; Peng et al., 2003; Lin et al., 2004.) Wie PDF diesen Eingriff vornimmt, ist weiterhin unklar. Laut Literatur ist es wahrscheinlich, dass PDF über die Phosphorylierungen von PER die Uhr beeinflusst (Petri und Stengl, 2001). Deshalb wurden die beiden Stämme *y w* und *y w; ;Pdf*^{01} über den Tag verteilt abgesammelt und aus Kopfextrakten die jeweils vorhandene Menge der zwei unterscheidbaren PER-Phosphorylierungszustände per Western Blot bestimmt. Abb. 16 zeigt einen solchen Western Blot und Abb. 17 die resultierende Quantifizierung aller Western Blots.

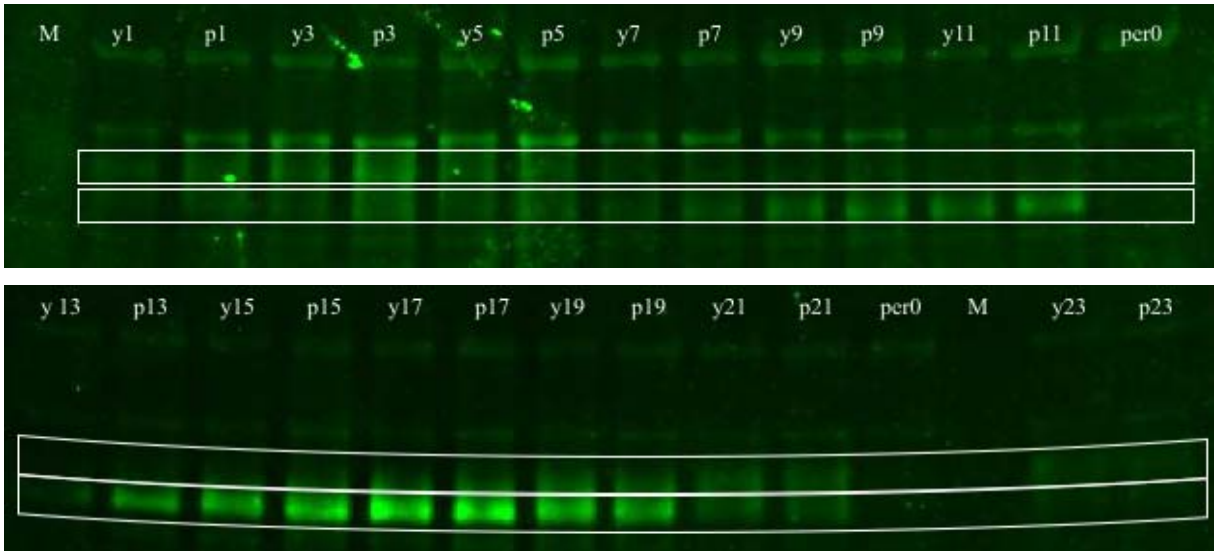


Abb. 16: Hier ist ein eingescannter Western Blot von *y w; ;Pdf*^{01} und *y w* als Kontrolle zu sehen. Aus Platzgründen wurden die Proben auf zwei Membranen verteilt. Der jeweils obere Kasten markiert die höherphosphoylierte und damit schwerere Bande, während die untere Bande weniger phosphoryliert ist und damit schneller durchs Gel wandern kann. Die Zahlen und Buchstaben geben an, um welchen Stamm es sich handelt und zu welchem Zeitgeberzeitpunkt die Probe abgesammelt wurde. (p: *y w; ;Pdf*^{01}, y: *y w*, M: Molekülgewichtsmarker)

Die Kurvenverläufe von *y w* und *y w; ;Pdf*^{01} sind sich sehr ähnlich aber nicht identisch: in beiden Stämmen steigt die weniger phosphorylierte Stufe des Period ca. 2 h früher an als die höher phosphorylierte. Auch die Maxima der weniger phosphorylierten Bande erscheinen 1 bis 2h früher. Interessanterweise scheinen jedoch bei *y w; ;Pdf*^{01} beide Per-Banden früher anzusteigen als bei *y w*. Die Maxima der *y w; ;Pdf*^{01} Kurven sind aber dann wieder in etwa zur selben Zeit (weniger phosphorylierte Bande, ZT 19) oder sogar später (höher phosphorylierte Bande, ZT21) als die von *y w* (ZT19 bzw. ~ZT20).

Leider konnten in der statistischen Untersuchung diese Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen von *y w* und *y w; ;Pdf*^{01} nicht bestätigt werden. Dies liegt wohl vor allem an der Variabilität der verschiedenen Western Blots und dem damit verbundenen hohen statistischen Fehler. Der einzige signifikante Unterschied zwischen den Stämmen liegt in dem Befund, dass *y w; ;Pdf*^{01} insgesamt mehr Per zu haben scheint.

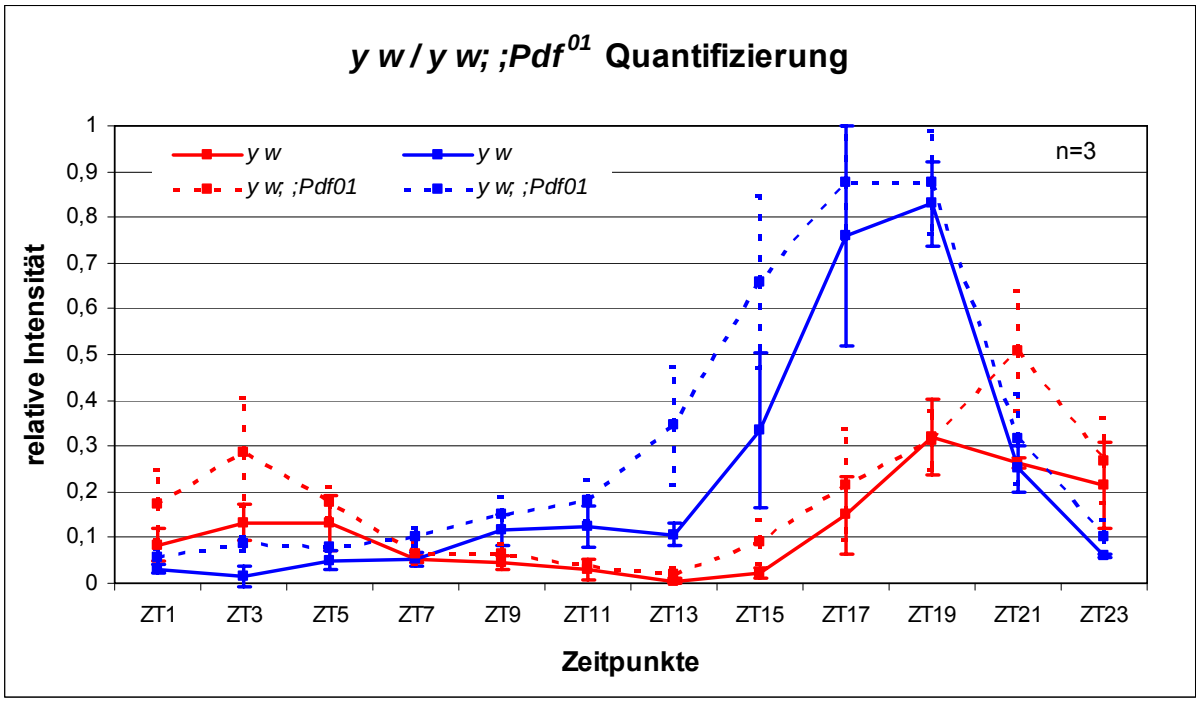


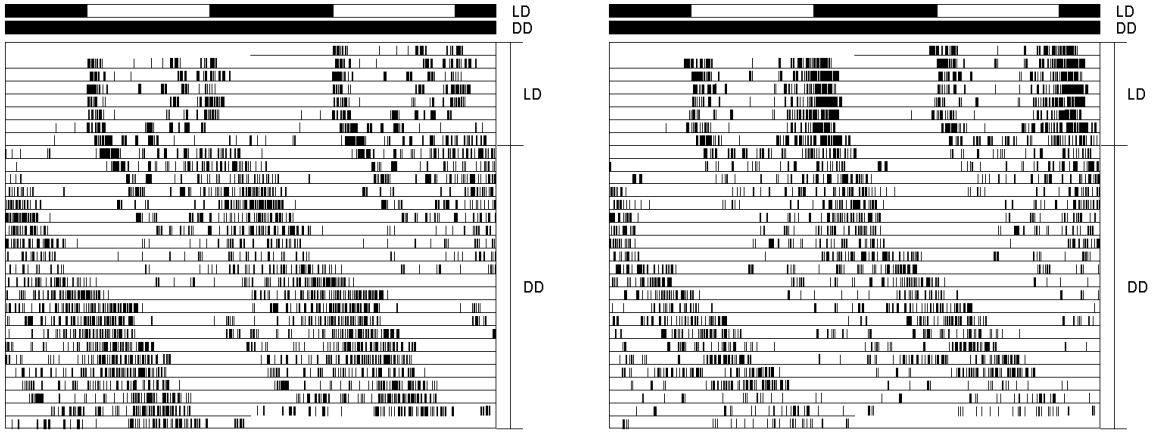
Abb. 17: Resultate der Quantifizierung der Western Blots. Die blauen Linien zeigen den Verlauf der PER-Proteinmenge in der wenig phosphorylierten Bande, die roten Linien den des höher phosphorylierten PERs. Gestrichelte Linien repräsentieren die Versuchstiere, Durchgehende die Kontrollen.

Trotzdem ist die Tendenz von Fliegen ohne PDF einerseits einen früheren Per-Anstieg und andererseits ein normales, oder gar verspätetes Maximum zu zeigen erkennbar und würde mit einer größeren Anzahl an Versuchen möglicherweise auch statistisch offenbar.

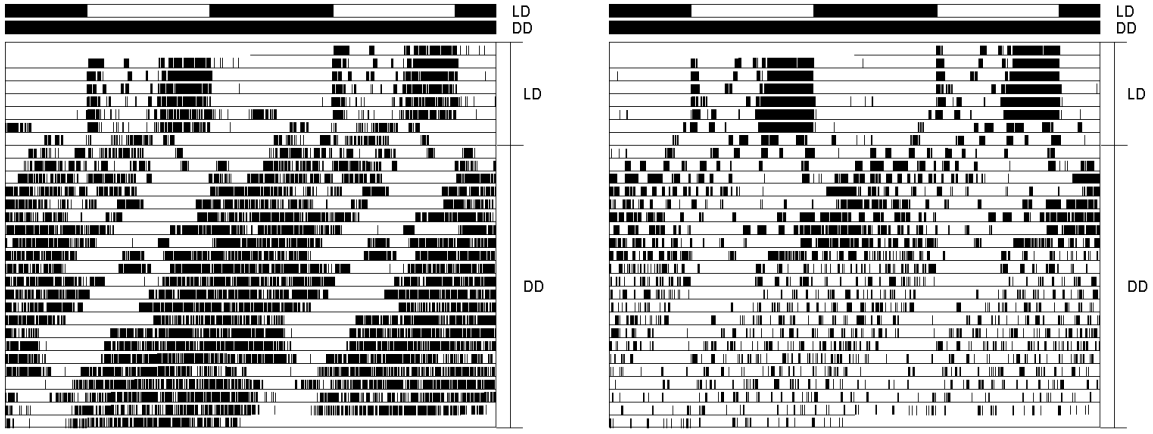
2. Laufaktivität von *so*^{01}

Sine oculis ist eine augenlose Mutation mit einer nicht vollständigen Penetranz, d.h. es treten immer wieder Augenreste auf, die in ihrer Größe und Form von einem fast vollständigen integrierten Facettenauge bis zu einem wenige Ommatidien umfassenden Stielauge reichen (Zulassungsarbeit Acksel, 2006). Um festzustellen, ob die Periodenlänge von der Anwesenheit eines großen Augenrests beeinflusst wird, wurden Fliegen mit und ohne Augenreste in der Laufaktivitätsanlage registriert. *so*^{01} mit großen Augenresten hat eine Periodenlänge von 24,64 ± 0,11 h. Bei *so*^{01} - Fliegen ohne Augen läuft die innere Uhr mit einer Freilaufperiodenlänge von 24,88 ± 0,20 h. Statistisch sind die Periodenlängen mit oder ohne Augenreste nicht unterschiedlich (p=0,31). Deshalb wurden die Werte der augenlosen und mit Augenresten versehenen *so*^{01}-Fliegen gepoolt und tauchen nur noch als „*so*^{01}“ auf. Da theoretisch auch Hintergrundeffekte im Genom der *so*^{01} Fliegen für die lange Periodenlänge verantwortlich sein könnten, kreuzte ich 3 verschiedene Defizienzstämme - mit einer Deletion im *so* Genbereich - mit der *so*^{01} Mutante und registrierte diese heterozygoten Tiere wiederum in der Aktivitätsanlage (o. Abb). Diese Fliegen hatten also bis auf die *so*-Region immer zumindest eine wildtypische Kopie aller Gene und somit konnten rezessive Hintergrundmutationen keine Rolle mehr spielen. Alle drei heterozygoten Fliegenlinien zeigten Periodenlängen zwischen 24,5 und 25,0h und waren von denen der *so*^{01}-Fliegen nicht signifikant verschieden ($F(3/71)=0,99$; $p=0,40$). Um festzustellen, ob die lange Periodenlänge der *so*^{01}-Fliegen mit den in der Einleitung erwähnten Fehlprojektionen der lLNv aus dem hinteren optischen Trakt, und dem damit verbundenen Mehr an PDF zusammenhängt, wurden *so*^{1}*;Pdf*^{01} Fliegen generiert und ihre Laufaktivität im Vergleich zu *so*^{01} und *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen aufgezeichnet (s. Abb. 18).

so^{01}



y w; ;Pdf^{01}



so^{01}*;Pdf*^{01}

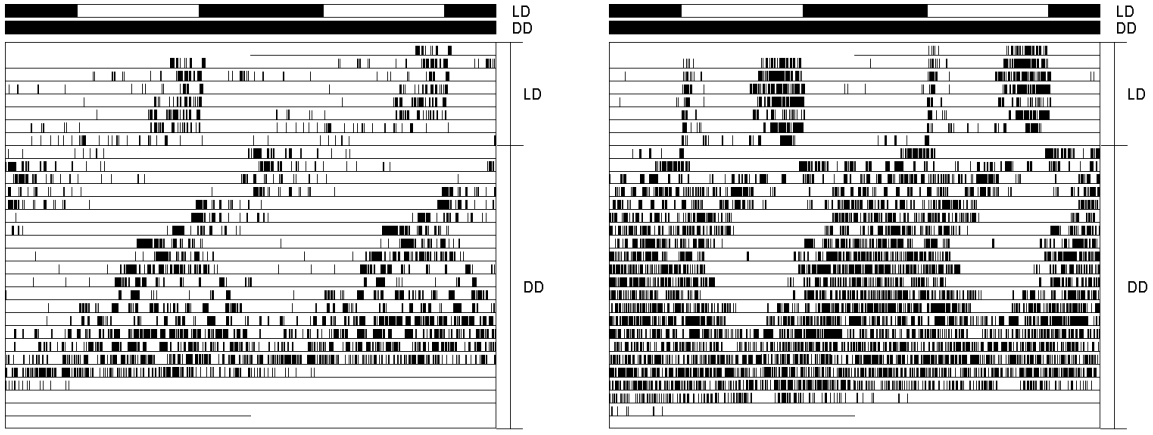


Abb. 18: Diese Abbildungen zeigen jeweils 2 typische Beispielaktogramme der verwendeten Mutanten *so*^{01}, *y w; ;Pdf*^{01} und *so*^{01}*;Pdf*^{01}. Es ist deutlich zu sehen, dass die Periodenlänge der Doppelmutante der Periodenlänge von *y w; ;Pdf*^{01} ähnelt und nicht der von *so*^{01}.

Für die Auswertung musste auf die besonderen Eigenschaften von *y w; ;Pdf*^{01} acht gegeben werden, denn es ist, wie bereits erwähnt bekannt, dass Fliegen ohne PDF unter DD – Bedingungen teilweise ihre Rhythmizität nach mehr oder weniger vielen

Tagen verlieren. (Renn et al.,1999). Auch in diesem Versuch bildeten die *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen keine Ausnahme, sie waren in über 60% der Fälle arythmisch, oder wurden es im Laufe des Versuchs. Dieser Effekt wird dem Fehlen von PDF zugeschrieben (Renn et al., 1999). Deshalb war diese Eigenschaft auch bei den *so*^{01}*;Pdf*^{01} Fliegen zu erwarten. Wie Abb. 19 zeigt, ist genau dies bei *so*^{01}*;Pdf*^{01} in 50% der Tiere auch der Fall, während es bei *so*^{01} selbst, nur in knapp 25% der Fällen zur Arrhythmie im Laufe des Versuchs kommt.

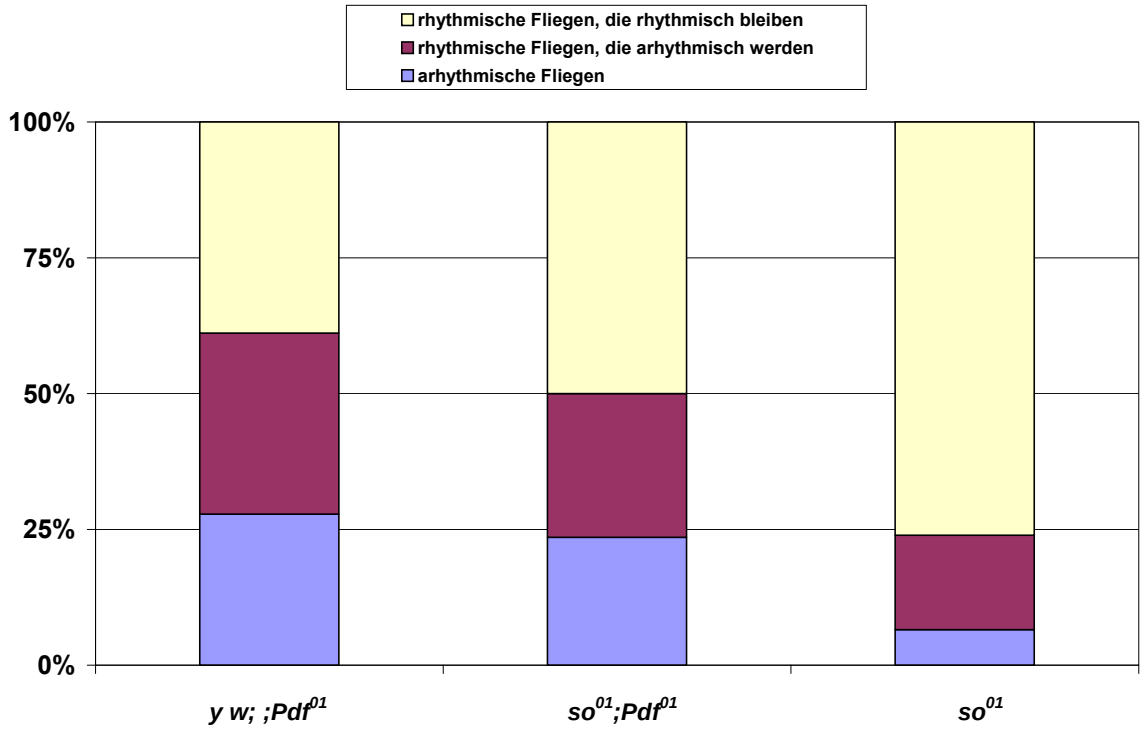


Abb. 19: Prozentsätze der rhythmischen, arythmischen und arhythmisch werdenden Fliegen in den Versuchs und Kontrollstämmen. Fliegen, denen PDF fehlt zeigen mehr Arhythmie als PDF-positive Fliegen.

Für die Periodenlängenbestimmung wurde auf mindestens 5 Tage Rhythmizität geachtet. Die Periodenlänge von *y w; ;Pdf*^{01} ist bekanntermaßen kürzer als 24h (Renn et al., 1999). In diesem Experiment hatten diese Fliegen eine durchschnittliche Periodenlänge von 23,17 ± 0,21 h. Im Vergleich dazu hatten die *so*^{01}*;Pdf*^{01} Doppelmutanten eine Periodenlänge von durchschnittlich 22,75 ± 0,22 h.

Weitere Statistik zeigte, dass die so Fliegen in ihrer Periodenlänge hochsignifikant unterschiedlich zu *y w; ;Pdf*^{01} und *so*^{01}*;Pdf*^{01} waren. Dies alles ist auch in der zusammenfassenden Abb. 20 vermerkt.

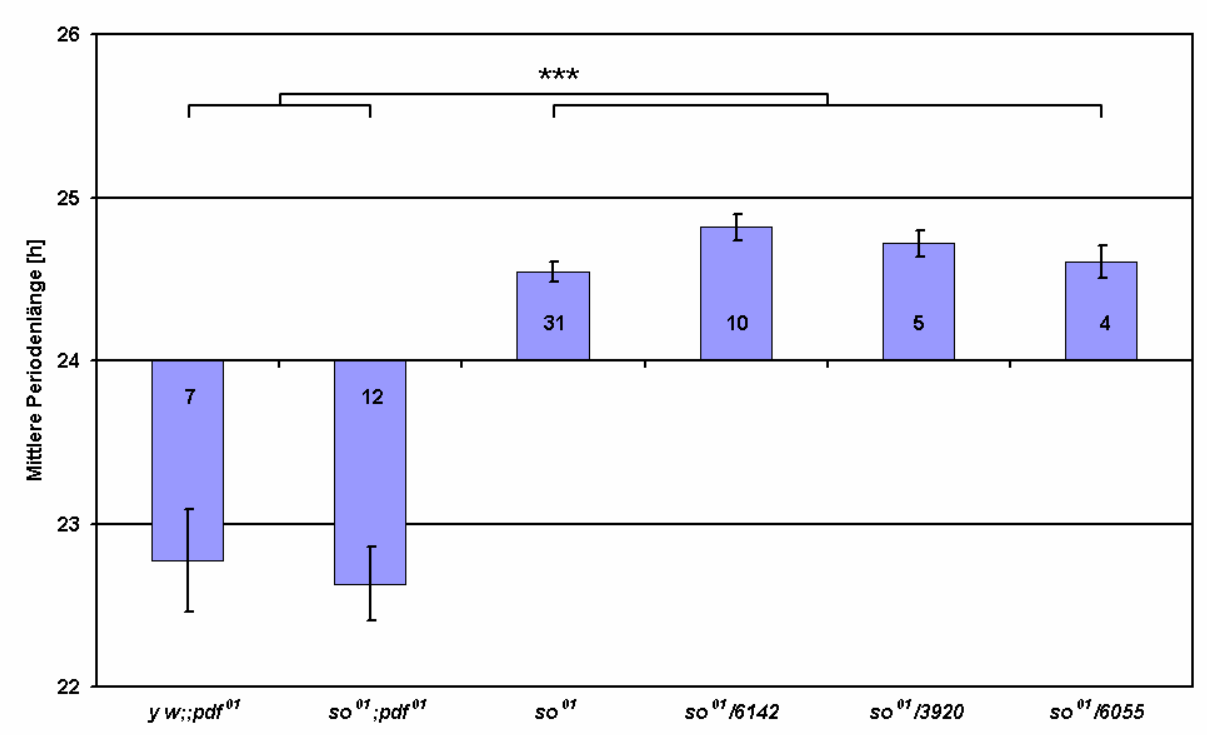


Abb. 20: Durchschnittliche Periodenlängen der Versuchs- und Kontrollfliegen. Es ist deutlich, dass die Versuchstiere (*so*^{01};*Pdf*^{01}) Periodenlängen zeigen, die denen von *y w; ;Pdf*^{01} gleichen und sich von den PDF-positiven *so*^{01} und Defizienzkreuzungen unterscheiden. Die drei rechten Datenpunkte sind die Ergebnisse der Kreuzungen von *so*^{01}-Fliegen mit Defizienzstämmen im *so*-Genbereich. (Die Statistiksymbole sollen bedeuten, dass alle verwendeten Stämme mit einer Periodenlänge über 24h zu den beiden PDF-negativen Gruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p<0,001 unterschiedlich sind. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der ausgewerteten Tiere des jeweiligen Stammes an.)

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die längere Periodenlänge von *so*^{01} auf PDF zurückzuführen ist, denn sobald kein PDF vorhanden ist, ist dieser Effekt verschwunden und die Fliege zeigt eine Periodenlänge die von der von *y w; ;Pdf*^{01} nicht zu unterschieden ist. *so*^{01} unterscheidet sich insofern vom Wildtyp, als dass PDF-Fasern des Hinteren Optischen Traktes zusätzlich zu den Fasern der sLNv ins dorsale Protocerebrum ziehen (Helfrich-Förster und Homberg, 1993). Diese Unterschiede zwischen *so*^{01};*Pdf*^{01} und *so*^{01} legen deshalb nahe, die Effekte von zusätzlichem PDF im circadianen System noch einmal genauer zu beleuchten.

3. Expression des thermosensitiven Allels *shibire*^{ts1} in diversen Untergruppen der Uhrneuronen

Shibire blockiert die Aufnahme von Substanzen aus dem synaptischen Spalt. Somit können Transmitter länger an den Rezeptoren gebunden bleiben und die Signallänge ausdehnen.
Die verschiedenen GAL4-Treiberlinien ermöglichten es, shi^{ts1} einmal nur in den sLNv, dann in allen PDF-Neuronen, in allen LN, in allen LN außer den sLNv und schließlich in allen Uhrneuronen, mehreren ektopischen Zellen und vielen Glia zu exprimieren.

3.1. Expressionsmuster der verwendeten *GAL4* – Linien

Um festzustellen, in welchen Neuronen genau die verschiedenen Treiberlinien exprimieren, wurden diese mit einer GFP-Responderlinie gekreuzt und anschließend das Expressionsmuster mittels konfokaler Mikroskopie ausgemacht.
R6-GAL4 zeigt Färbung nur in den kleinen ventrolateralen Schrittmacherneuronen (siehe Abb. 21 A), während *Pdf-GAL4,* GFP auch noch in den lLN$_v$ exprimiert (Abb. 21 B). *cry-GAL4* weist Färbung in allen lateralen Neuronengruppen auf und zusätzlich in vier DN1-Neuronen (genauer den DN1 a und DN1p) und 2 DN3 Neuronen (Abb. 21 C). Die Treiberlinie *Pdf-GAL80; cry-GAL4* exprimiert offensichtlich trotz der GAL80 Reprimierung der GAL4 Expression ein klein wenig in den lLN$_v$, jedoch war kein GFP in den sLN$_v$ zu finden. Die restliche Expression ist der der *cry-GAL4*-Linie identisch (Abb. 21 D).
tim-GAL4 zeigt in allen Uhrneuronen (sLN$_v$,lLNv, 5thsLnv, Lnd, DN1, DN2, DN3) GFP und exprimiert zusätzlich in anderen ektopischen Neuronen und vielen Glia-Zellen (Abb. 21 E)

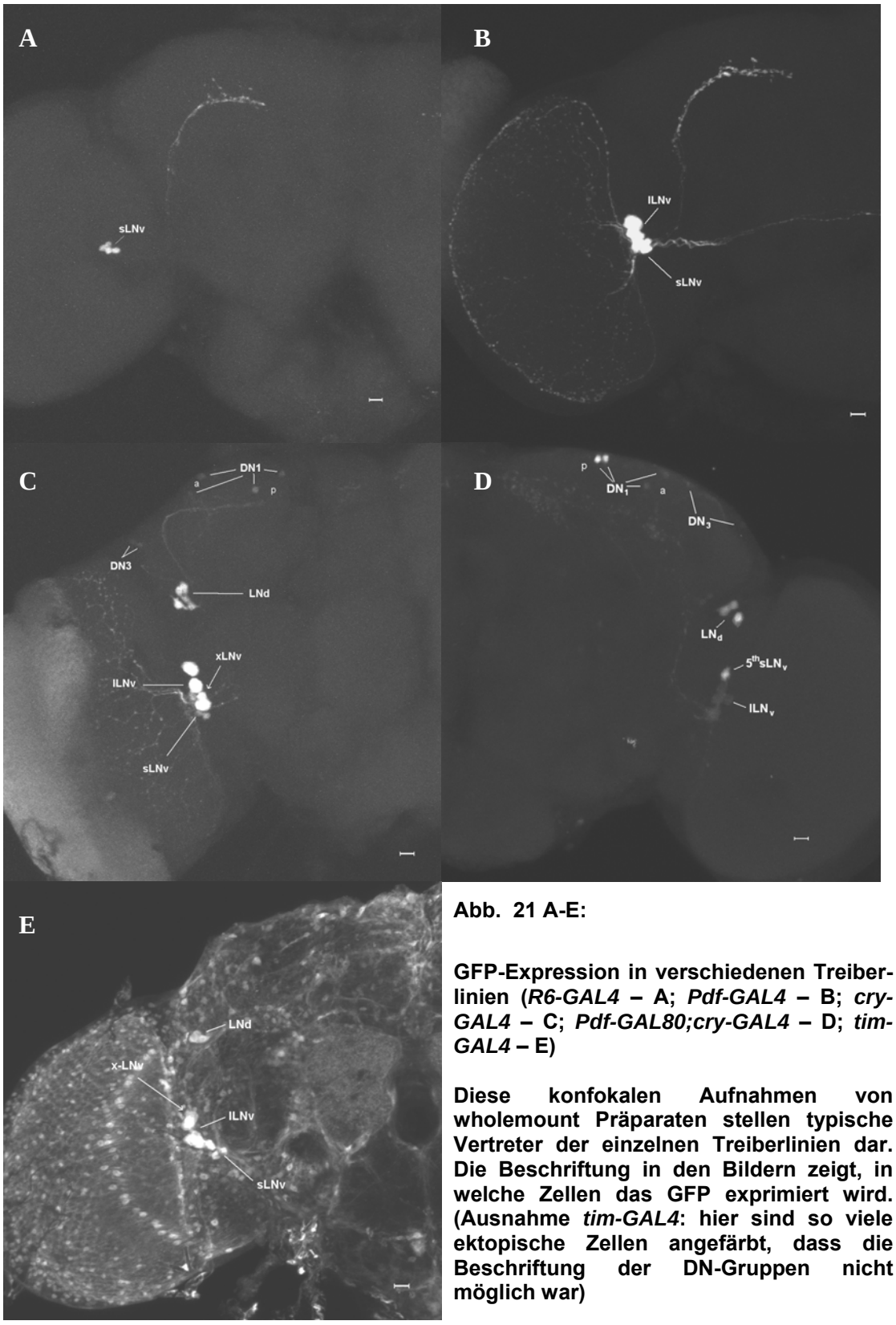


Abb. 21 A-E:

GFP-Expression in verschiedenen Treiberlinien (*R6-GAL4* – A; *Pdf-GAL4* – B; *cry-GAL4* – C; *Pdf-GAL80;cry-GAL4* – D; *tim-GAL4* – E)

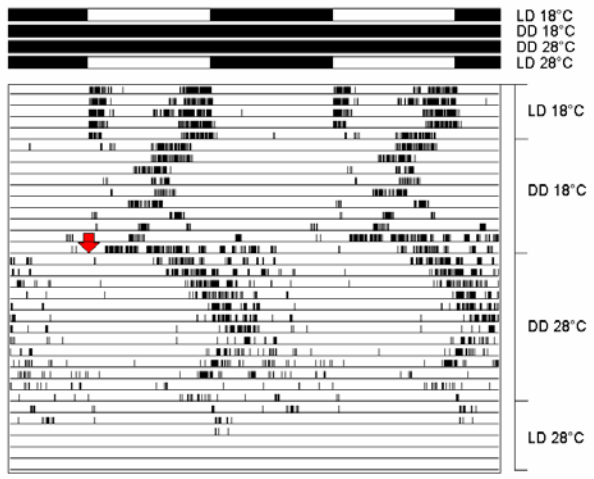
Diese konfokalen Aufnahmen von wholemount Präparaten stellen typische Vertreter der einzelnen Treiberlinien dar. Die Beschriftung in den Bildern zeigt, in welche Zellen das GFP exprimiert wird. (Ausnahme *tim-GAL4*: hier sind so viele ektopische Zellen angefärbt, dass die Beschriftung der DN-Gruppen nicht möglich war)

Der Balken zeigt eine Strecke von 10 µm.

3.2. Laufaktivität unter 18°C bzw. 28°C

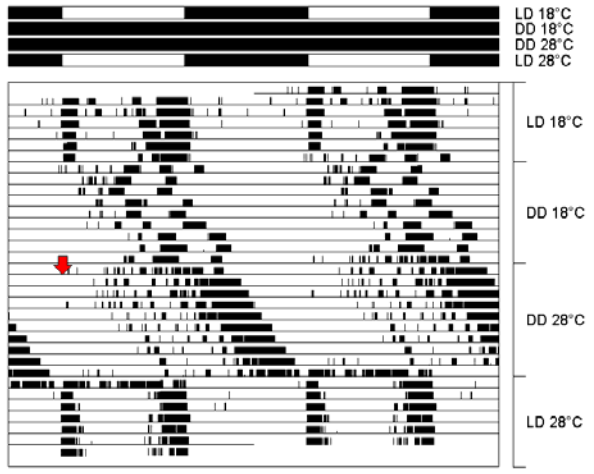
Wie im Material und Methoden Teil beschrieben, wurde die Laufaktivität der Tiere erst bei 18°C und dann bei 28°C aufgezeichnet. Hierbei waren sie zuerst im LD bei 18°C, dann wurde das Licht ausgeschaltet und die Tiere verblieben im DD. Nach einiger Zeit wurde die Temperatur auf 28°C erhöht. Wieder später wurden die Tiere wieder einem LD ausgesetzt. Die folgenden Abbildungen (Abb. 22 1. – 22 4.d) zeigen repräsentative Beispielaktogramme der Kontrollen und der Versuchstierstämme. In manchen Fällen sind aus mangelnder Einförmigkeit mehrere Aktogramme von einem Versuchstierstamm abgebildet, um die Diversität zu dokumentieren.

1. Der Wildtyp

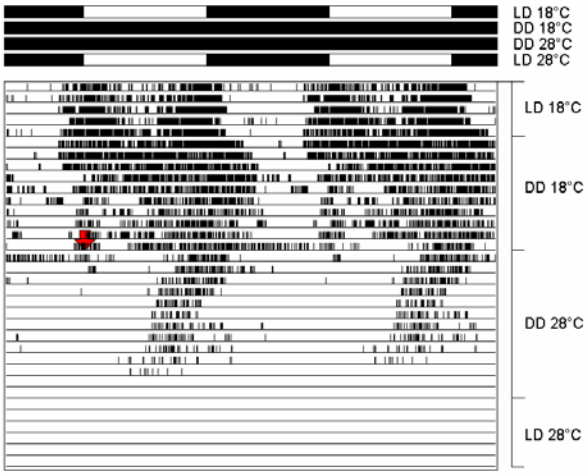


Canton S

2. Die GAL4-Stämme

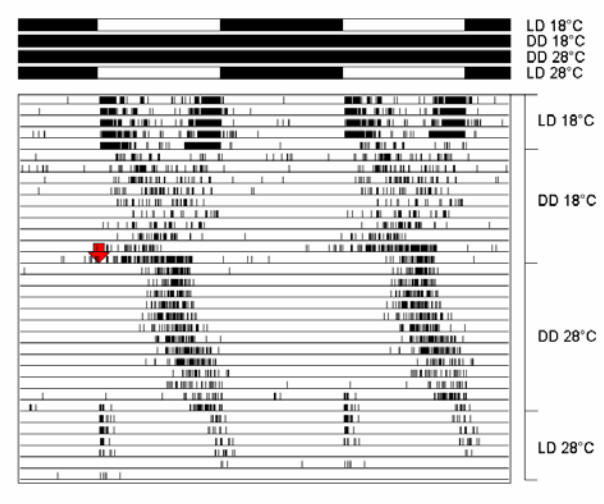


Pdf-GAL4

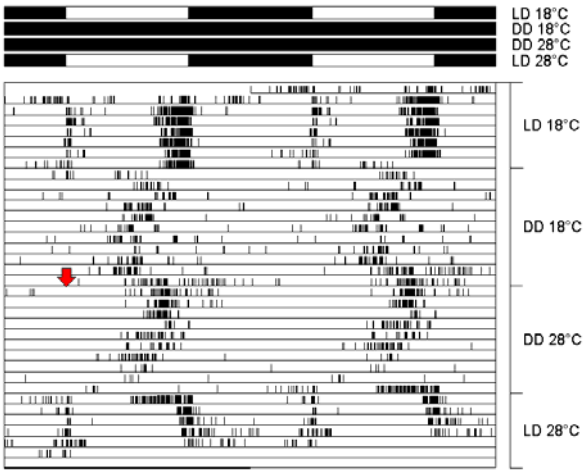


cryBN-GAL413

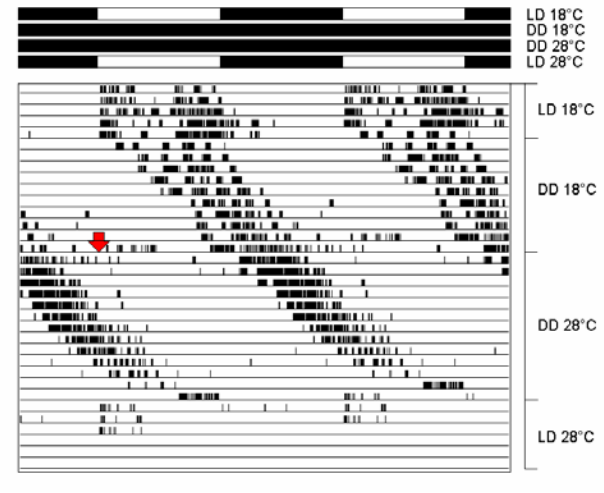
Abb. 22 Fortsetzung siehe nächste Seite



R6–GAL4

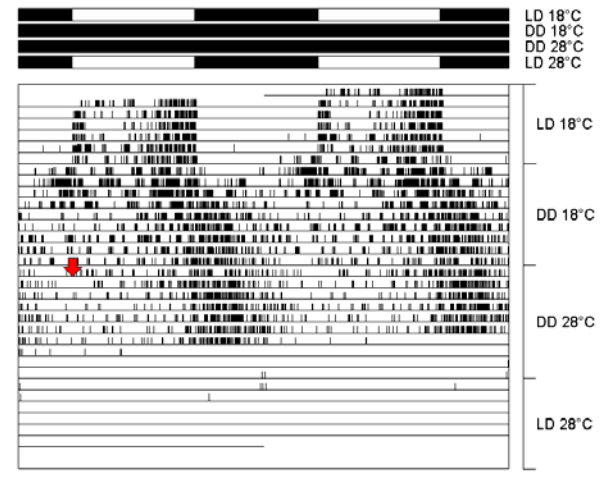


Pdf-GAL80, CryBN-GAL4



tim-GAL4

3.Der UAS Stamm

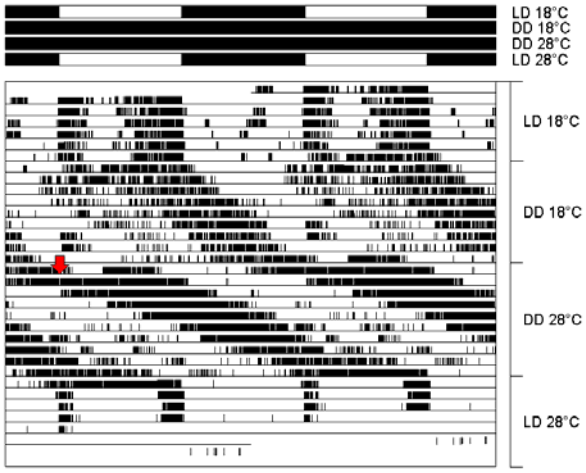


UAS-shi^{ts1}

Abb. 22 Fortsetzung siehe nächste Seite

4. Die Versuchsstämme

a) *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}*



b) *cryBN-GAL4 UAS-Shi^{ts1}*

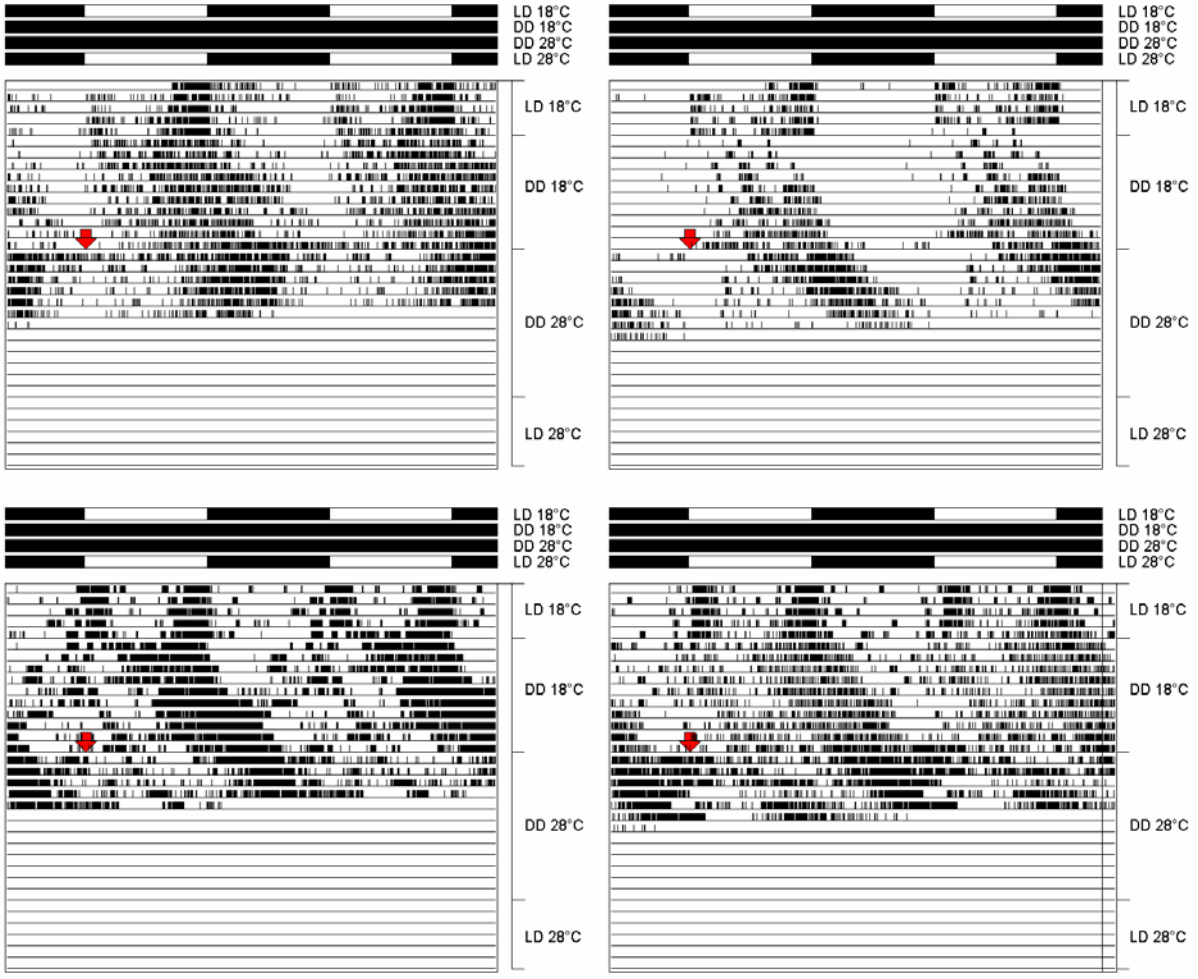
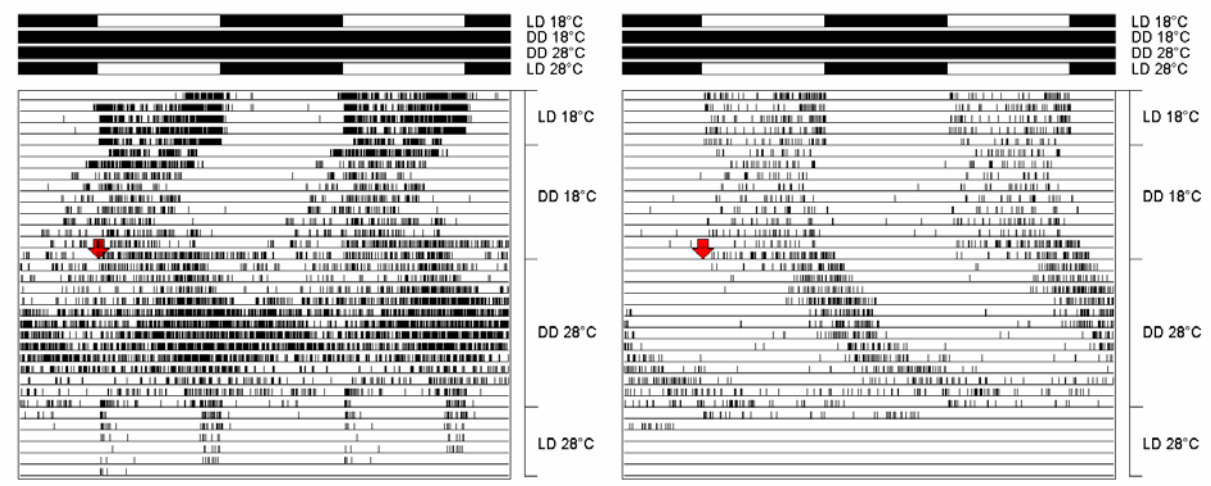


Abb. 22 Fortsetzung siehe nächste Seite

c) *R6-GAL4 UAS-shi^{ts1}*



d) *tim-GAL4 UAS-shi^{ts1}*

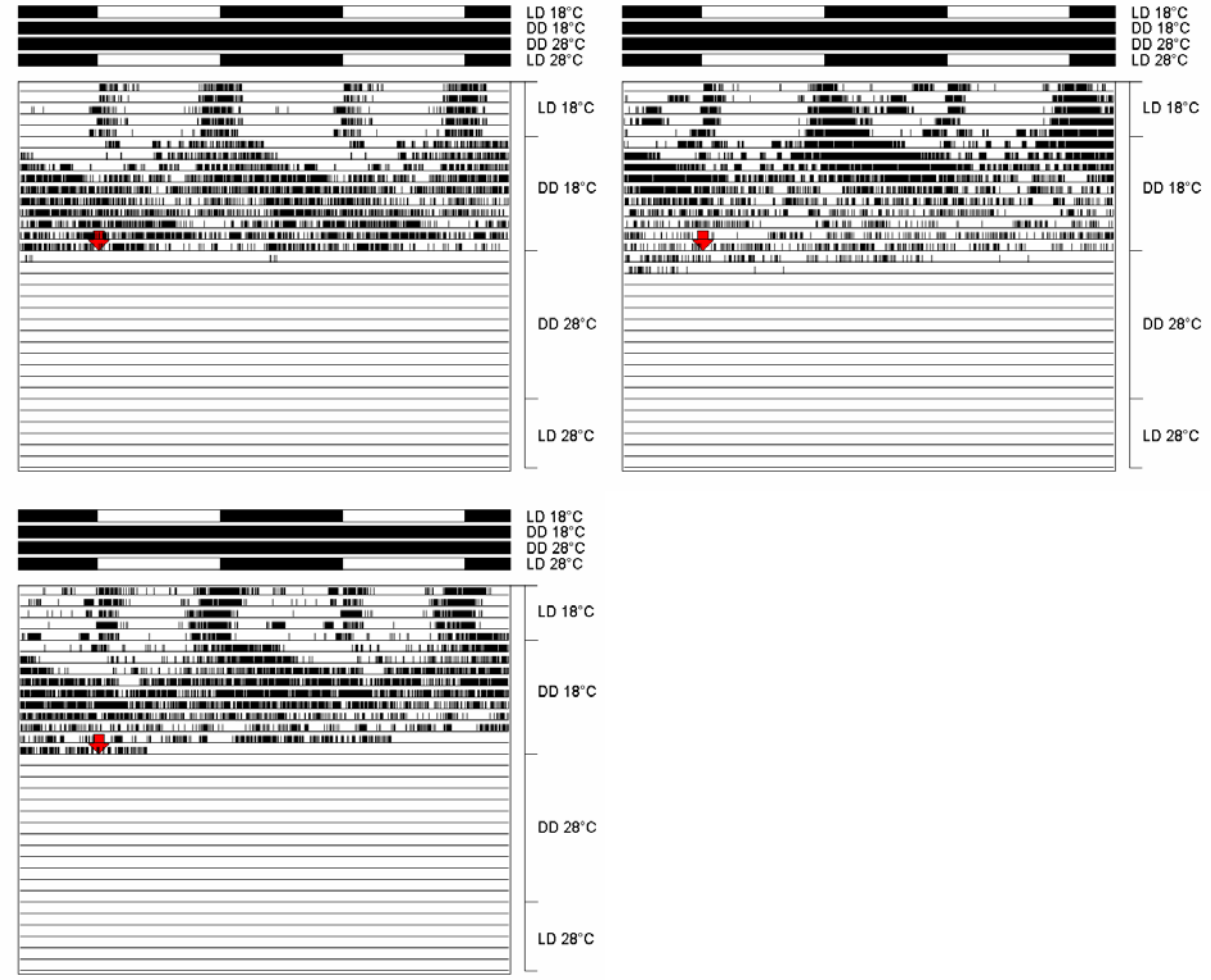


Abb. 22 Fortsetzung siehe nächste Seite

e) *Pdf-GAL80;cryBN-GAL413 ,UAS-shi^{tsl}*

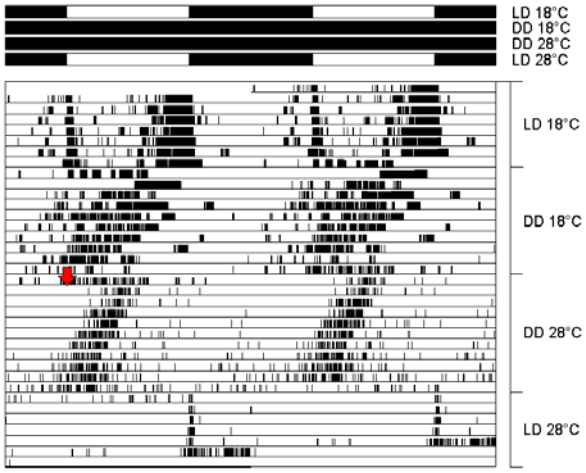


Abb. 22: Hier sind typische Aktogramme der Kontroll und Versuchstiere dargestellt, die einen Überblick über das Aktivitätsmuster der einzelnen Stämme geben sollen. Waren die Stämme in ihrer Laufaktivität nicht homogen, sind zur Veranschaulichung mehrere Diagramme angegeben.

Deutlich erkennbar ist, dass die Versuchs- aber auch die Kontrollstämme unterschiedlich auf die Temperaturerhöhung reagieren: *Pdf-GAL4* und *tim-GAL4* beispielsweise reagieren kaum. Sehr gegensätzlich dazu ist *tim-GAL4 UAS-shi^{tsl}* zu sehen, wo alle Tiere wenige Tage nach der Temperaturerhöhung starben.

3.3. Einfluss von Shibire^{tsl} auf die Freilaufperiodenlänge

Zunächst soll die Aktivität im DD bei18°C und 28°C betrachtet werden. Die Fliegen waren zuerst im DD bei 18°C. Die Temperatur wurde dann auf 28°C erhöht (siehe Beispielaktogramm einer Kontrollfliege im DD, Abb. 23). Aus diesen Daten wurden die Periodenlängen und Stärke des Rhythmus (Power) der einzelnen Fliegen bei 18°C und bei 28°C erstellt und dann für die einzelnen Stämme gemittelt (Tab. 2). Eine augenscheinliche Ausnahme ist *tim-GAL4 UAS-shi^{tsl}*. Diese Fliegen überlebten 28°C nicht länger als 48h.

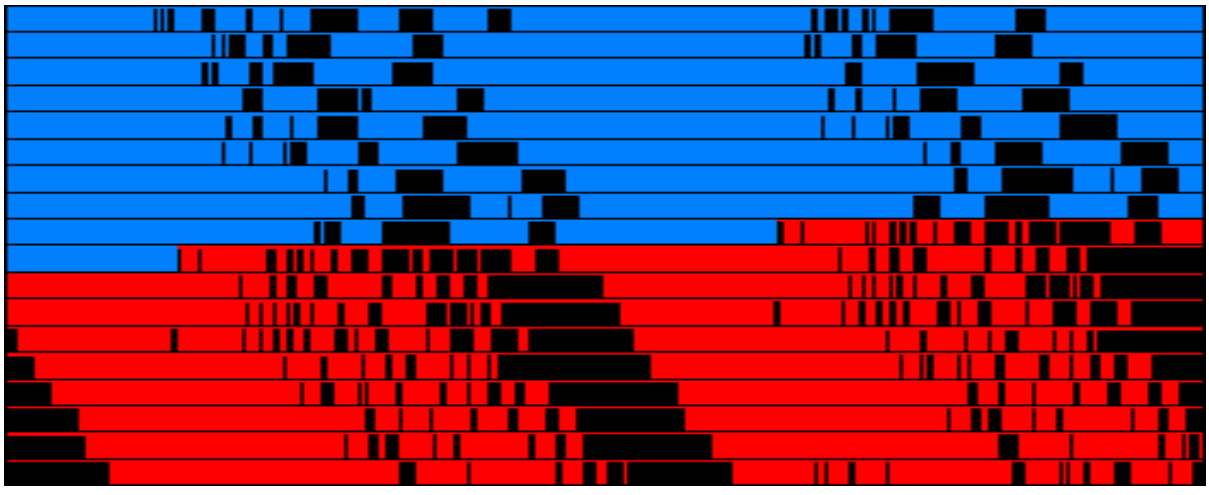


Abb. 23: Typisches Beispielaktogramm einer Kontrollfliege im Freilauf. Blauer Hintergrund bedeutet 18°C Umgebungstemperatur; rot bedeutet 28°C.

Ansonsten ist Tab. 2 auch zu entnehmen, dass immer mindestens 80% der Fliegen rhythmisch waren. Jedoch fällt auf, dass bei 28° mehr arhythmische Fliegen zu beobachten waren. Die Power des Rhythmus änderte sich bei fast allen Stämmen nicht wesentlich in der höheren Temperatur. Manche zeigten einen etwas besseren, andere einen schlechteren Rhythmus.

Tab. 2: Durchschnittliche circadiane Größen der einzelnen Fliegenstämme bei 18°C und 28°C

	18°C				28°C		
Stamm	**n**	**Arrhyth.(%)**	**Periode (h)**	**Power**	**Arrhyth.(%)**	**Periode (h)**	**Power**
Canton S	25	0	23,95 ±0,10	27,39 ±1,39	0	24,39 ±0,07	21,25 ±2,06
UAS-shi^{ts1}	36	0	24,72 ±0,05	26,02 ±1,45	11,11	24,48 ±0,07	36,00 ±2,65
R6-GAL4	20	0	23,48 ±0,09	20,01 ±0,87	0	24,25 ±0,08	22,83 ±2,05
R6-GAL4 UAS-shi^{ts1}	19	0	24,14 ±0,05	26,31 ±1,53	0	24,48 ±0,05	25,40 ±2,12
Pdf-GAL4	42	0	24,51 ±0,05	30,67 ±1,55	0	25,12 ±0,09	39,21 ±2,33
Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}	85	0	25,16 ±0,04	35,96 ±1,21	5,88	27,03 ±0,09	39,71 ±1,36
Pdf-GAL80;cry-GAL4	9	0	23,94 ±0,21	20,32 ±2,08	11,11	23,66 ±0,13	25,44 ±3,80
Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-shi^{ts1}	31	12,9	23,59 ±0,10	19,92 ±1,10	3,23	23,71 ±0,07	27,79 ±1,74
cry-GAL4	17	0	24,49 ±0,10	28,77 ±2,07	17,65	24,30 ±0,18	22,11 ±2,37
cry-GAL4 UAS-shi^{ts1}	19	0	24,67 ±0,04	31,74 ±2,50	10,53	24,42 ±0,11	39,51 ±2,11
tim-GAL4	11	0	24,65 ±0,25	35,78 ±4,29	18,18	25,23 ±0,18	35,64 ±4,19
tim-GAL4 UAS-shi^{ts1}	12	16,67	27,33 ±0,30	21,64 ±1,70	----	----	----

Die Periodenlängen der einzelnen Stämme bei 18°C und 28°C sind in Abb. 24 zusätzlich grafisch aufgearbeitet. Es gibt signifikante Unterschiede ($F(22/594)=115,15$; $p \leq 0,01$) zwischen den Stämmen bei den verschiedenen Temperaturen. Auffällig ist hierbei, dass *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* bei 28°C eine deutlich längere Periodenlänge hat als bei 18°C ($p \leq 0,01$). Bei *tim-GAL4 UAS-shi^{ts1}* fällt ins Auge, dass bei 18°C die Periodenlänge, im Vergleich zu *tim-GAL4* ungekreuzt, sehr lang ist ($p \leq 0,01$). Innerhalb der Stämme sind noch bei *R6-GAL4* und *Pdf-GAL4* signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) zu verzeichnen. Die restlichen Periodenlängen bewegen sich alle in einem engen Rahmen und sind innerhalb der einzelnen Stämme auch nicht signifikant verschieden.

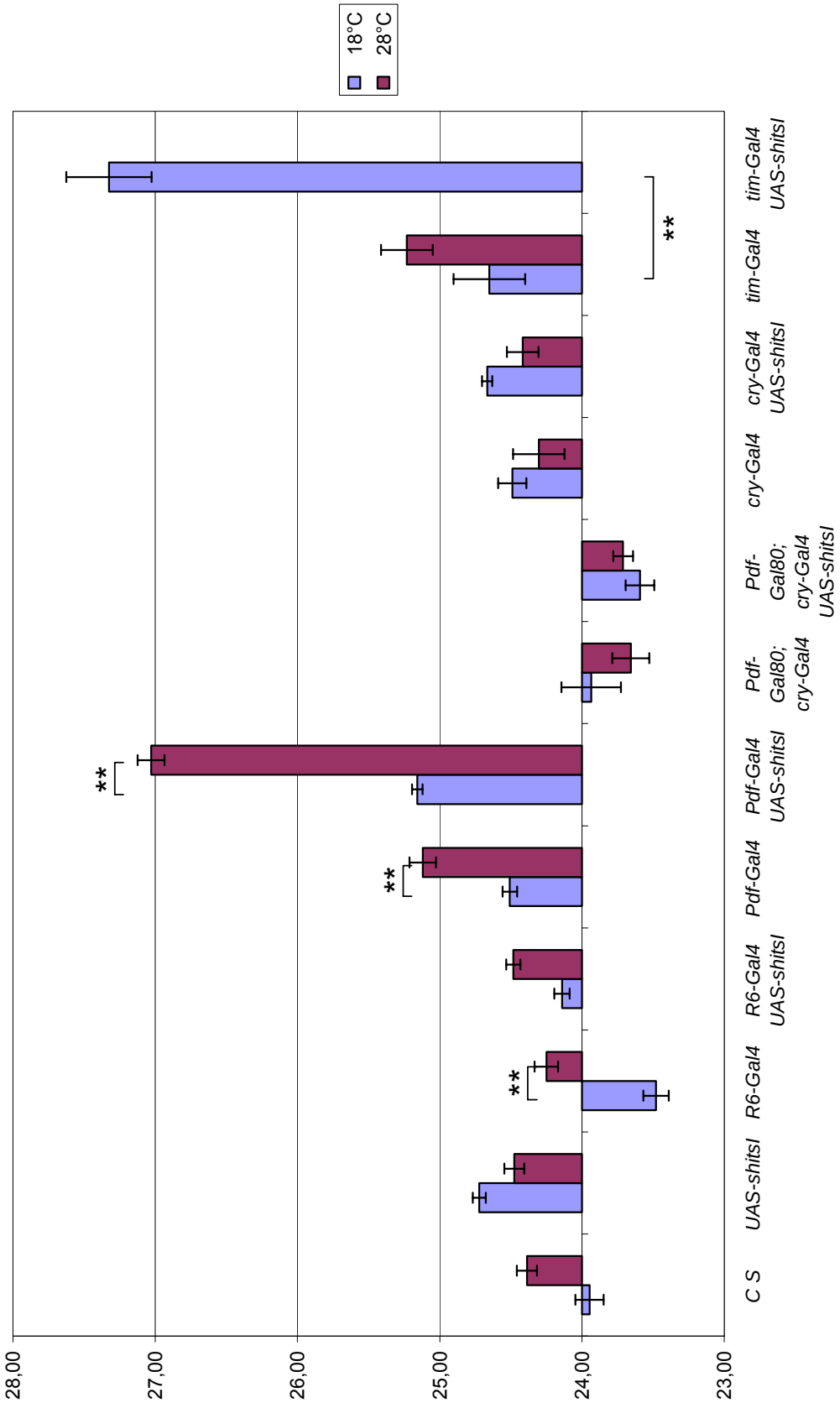


Abb. 24: Periodenlängen der einzelnen Stämme bei 18°C bzw. 28°C. Signifikante Veränderungen sind mit Sternchen markiert (★: p≤0,05; ★★: p≤0,01).

Abb. 25 verdeutlicht die Periodenveränderungen der einzelnen Stämme. Hier wurde bei jeder Fliege die 18°C Periodenlänge von der 28°C Periodenlänge abgezogen und dann alle Werte eines Stammes gemittelt. Die Periodenveränderung ist stammabhängig (F(10/281)=45,48; p≤0,01). Jedoch ist nur von *Pdf-GAL4* zu *Pdf-GAL4 UAS-shi^{tsl}* eine signifikante Veränderung (p≤0,01) bemerkbar. Alle anderen Stämme zeigen keine Unterschiede zu den mit *UAS-shi^{tsl}* gekreuzten Tieren.

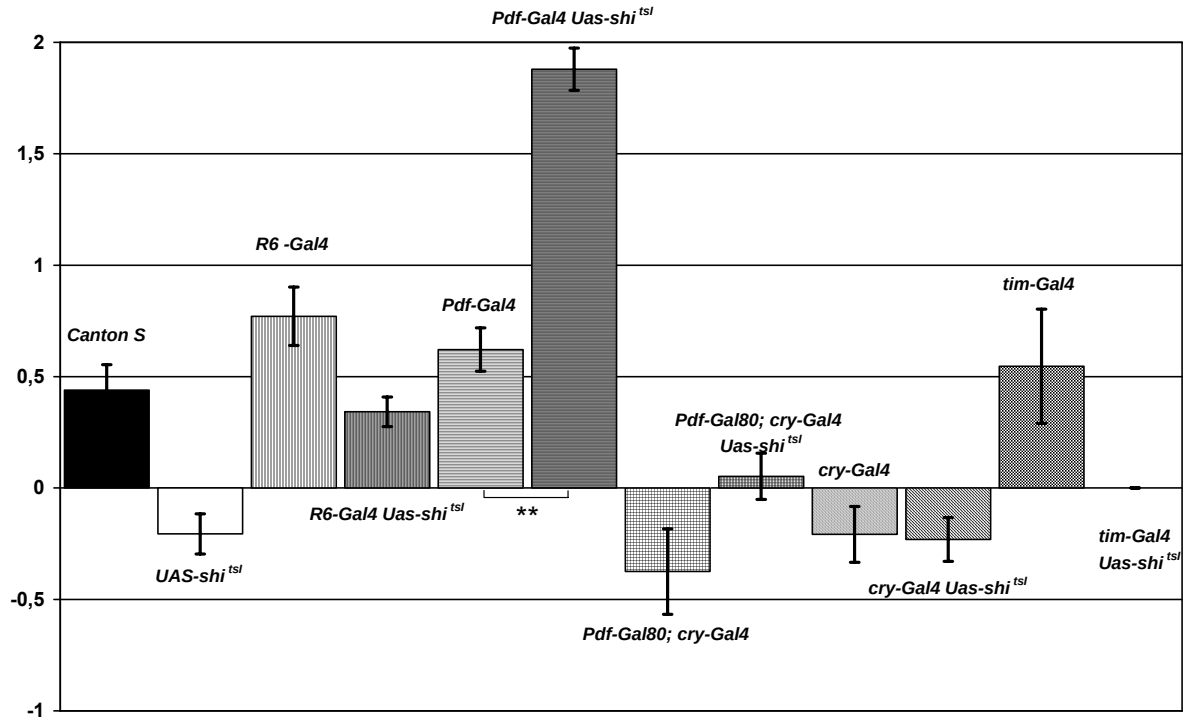


Abb. 25: Periodenlängenveränderung von 18°C nach 28°C der einzelnen Fliegenstämme. Signifikante Veränderungen wurden hier nur vom GAL4 - Elternstamm zum gekreutzten Stamm untersucht. Signifikanzen sind mit Sternchen markiert (★: p≤0,05; ★★: p≤0,01).

3.4. Expressionsstärke der Treiberlinien

Um festzustellen, ob die vorangegangenen Ergebnisse mit der Expressionsstärke der Treiberlinien zusammenhängen, wurden diese mit GFP gekreuzt und dann bei 20°C bzw. 28°C präpariert. Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der Intensitätsevaluierung in den LN.

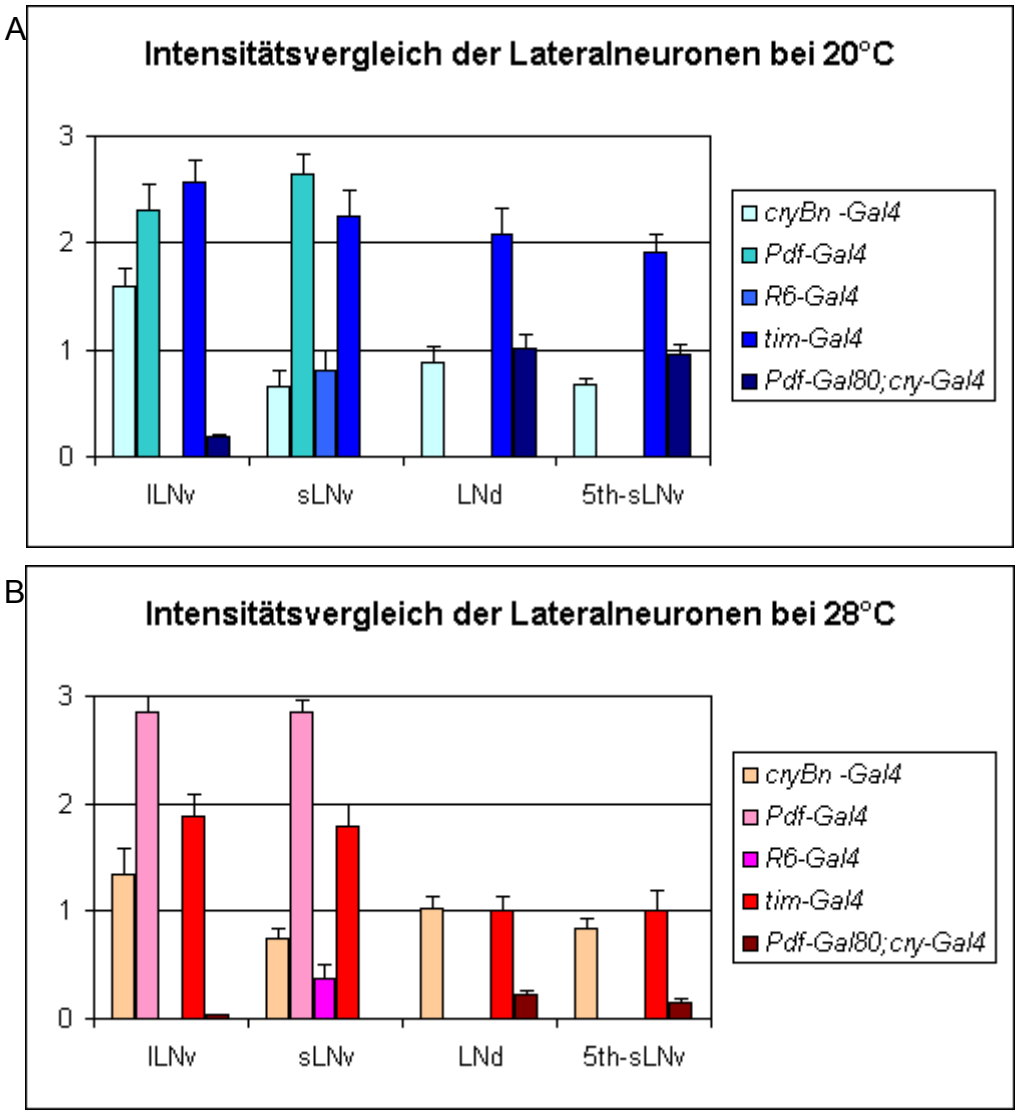


Abb. 26: Hier ist die Auswertung der GFP Expression zu sehen. A zeigt die GFP-Intensität und somit die Expressionsstärke in den LN der verschiedenen Treiberlinien bei 20°C. B offenbart dasselbe für 28°C.

Darin wird deutlich, dass die Expressionsstärke von Stamm zu Stamm unterschiedlich ist und auch unterschiedlich auf die höhere Temperatur reagiert. Während die Intensität der GFP-Fluoreszenz von *Pdf-GAL4* bei 28° allgemein höher ist als bei 20°C, fällt sie bei *R6-GAL4*, *tim-GAL4* und *Pdf-GAL80;cry-GAL4* ab. *Cry-GAL4* reagiert nicht wirklich auf die unterschiedlichen Temperaturen, was die Expressionsstärke angeht, aber insgesamt war die Expressionsstärke relativ niedrig.

Da nur *Pdf-GAL4 UAS-shi*^{ts1} eine Veränderung der Periodenlänge zeigte und auch die Ergebnisse der Expressionsstärke den Treiber *Pdf-GAL4* hervorhoben, wurden im Folgenden nur die *Pdf-GAL4 UAS-shi*^{ts1} Ergebnisse betrachtet.

3.5. Einfluß von Shibire^{ts1} auf das durchschnittliche Tagesaktivitätsmuster

Wie man an den obigen Aktogrammen sehen kann, hat die Temperatur und evtuell auch Shibire^{ts1} einen deutlichen Einfluss auf das Aktivitätsmuster. Um dies zu verdeutlichen, wurden die durchschnittlichen Aktivitätsprofile aus den 4 Abschnitten des Versuchs (LD und DD bei 18°C, LD und DD bei 28°C) berechnet (=Durchschnittstage).

Die Durchschnittstage in Abb. 27 zeigen die der Elternlinien und der gekreuzten *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* Fliegen. Die Pfeile indizieren die durch extreme Glättung der Kurven ermittelten Aktivitätsmaxima. *UAS-shi^{ts1}* hat im Vergleich zu den anderen Linien ein uneinheitlicheres Aktivitätsmuster, was sich in dem zum Teil höheren Standardfehler zeigt. Die Dunkelhemmung im LD ist hier auch nicht so deutlich ausgeprägt. Im Dauerdunkel ist kaum ein bimodales Muster erkennbar, der Morgenpeak ist nur als eine Schulter des Abendpeaks wahrnehmbar. Diese Schulter verändert sich kaum bei 28°C, d.h. der Morgen und Abendpeak haben sich nicht voneinander entfernt sondern eher angenähert. Keines der *UAS-shi^{ts1}* Tiere hat den zweiten LD bei 28°C erlebt.
Pdf-GAL4 zeigt im Gegensatz zu *UAS-shi^{ts1}* ein durchgängig gleichförmigeres Muster. Im LD zeigte sich, dass die Fliegen bei 28°C eine längere Ruhepause in der Mitte des Tages einlegen als bei 18°C. Der Morgenpeak endet also früher und der Abendpeak beginnt später. Im Dauerdunkel ist bei auch bei diesen Kontrolltieren der Morgenpeak eher eine Schulter oder bei 18°C sogar nur eine Schiefe des Abendpeaks, jedoch ist das Muster, anders als bei *UAS-shi^{ts1}* einheitlich und der Standardfehler klein. Eine Verbreiterung der Aktivitätsphase ist hier im DD sehr gut erkennbar: die Schiefe bei 18°C wandelt sich in 28°C zu einer Schulter, die den Morgenpeak darstellt. Somit liegen hier im Gegensatz zu *UAS-shi^{ts1}* die Peaks bei der höheren Temperatur weiter voneinander entfernt.
Die gekreuzten Versuchstiere unterscheiden sich im LD bei 18°C und 28°C kaum von denen der *Pdf-GAL4* Kontrolltiere, auch sie haben bei 28°C in der Mitte des Tages eine längere Inaktivität als bei 18°C. Hier ist jedoch auch im Dauerdunkel immer eine klare Bimodalität des Aktivitätsmusters zu erkennen, bei 28°C noch etwas deutlicher als bei 18°C. Dies unterscheidet die Versuchstiere von beiden

Kontrollstämmen. Die Aktivitätspeaks liegen im DD bei 28°C ebenfalls weiter voneinander entfernt als bei 18°C, jedoch nicht so deutlich wie bei *Pdf-GAL4*.

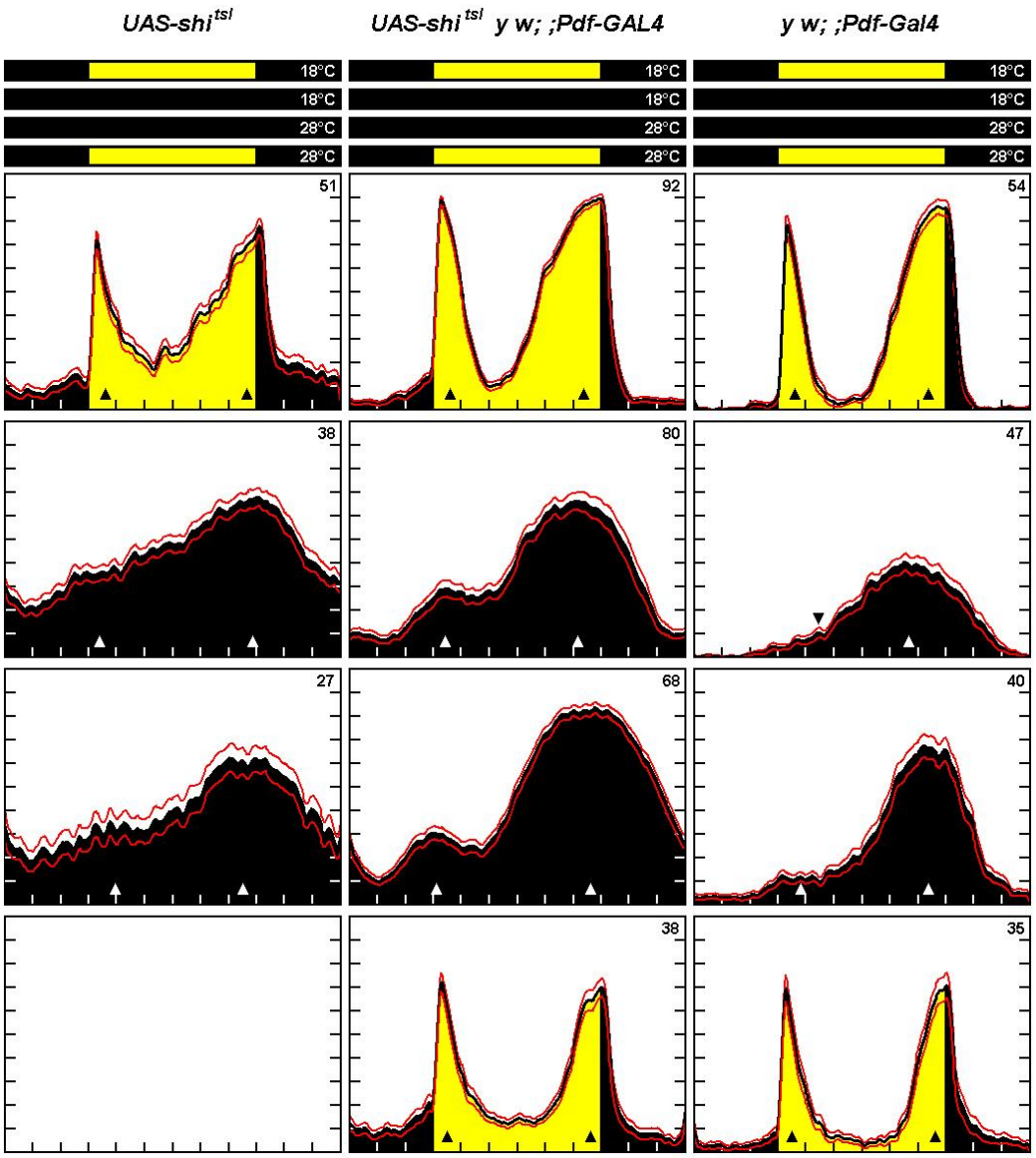


Abb. 27: Durchschnittstage der *Pdf-GAL4; UAS-shi*^{tsl} Fliegen und ihrer Kontrollen. Die Zahlen im oberen Rechten Eck geben die Anzahl der zur Berechnung verwendeten Tiere an. Die Pfeile zeigen die durch Glättung berechneten Aktivitätsmaxima der Stämme an.

3.6. Einfluss von Shibire^{tsl} auf das PDF-cycling in den Terminalen der sLNv

Da Shibire^{tsl} die Periodenlänge von *Pdf-GAL4* verlängerte und aus früheren Studien bekannt war, dass PDF in den Terminalen der sLN_v rhythmisch cycelt (Park et al., 2000), war der nächste Versuch, diese Schwankungen des PDF-Levels in den sLN_v der *Pdf-GAL4 UAS-shi*^{tsl} Fliegen zu untersuchen (Abb. 28 und Abb. 29).

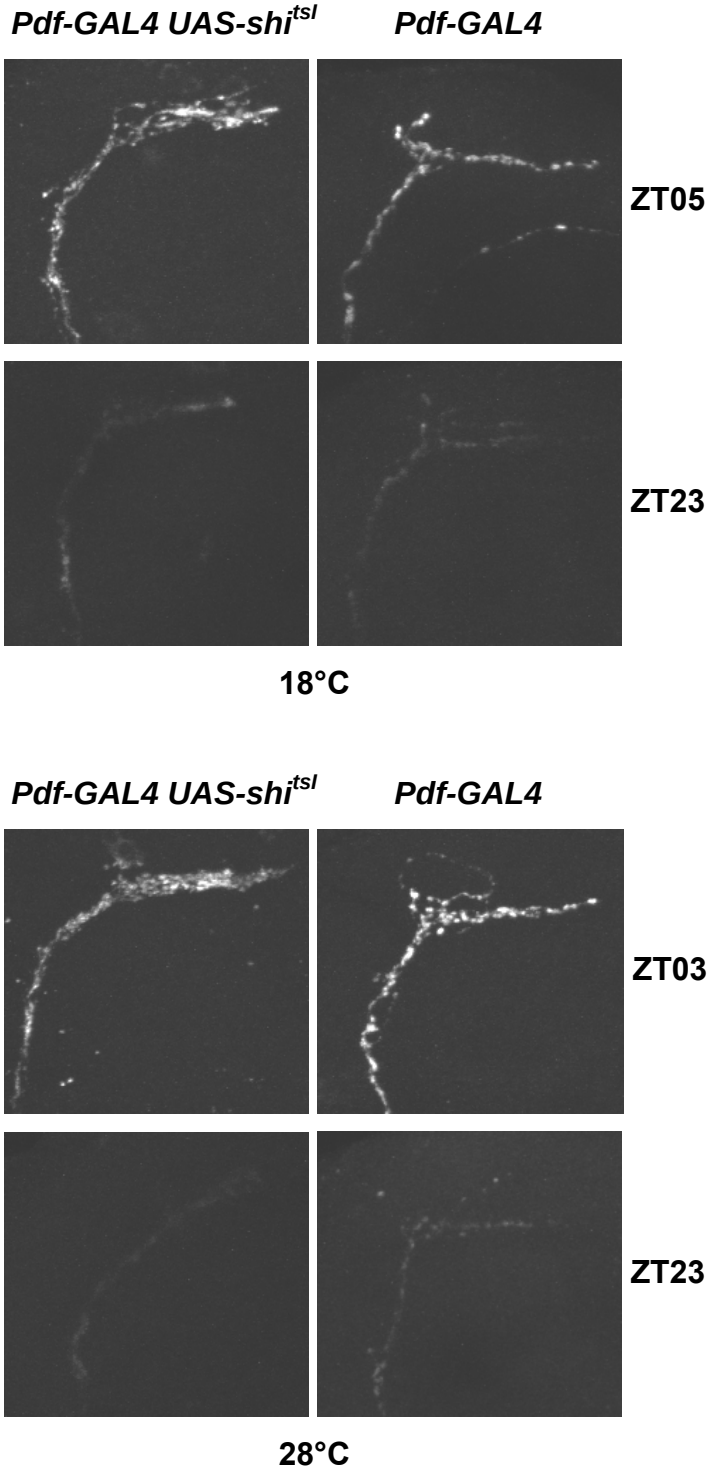


Abb. 28: Anti-PDH-Färbung in den Terminalen der sLNv:

Hier sind 8 repräsentative konfokale Aufnahmen dargestellt, die zeigen, dass die Terminalen der sLNv sowohl in den Versuchs- als auch in den Kontrolltieren bei 18°C und 28°C gleich reagieren, und es, wie schon früher gezeigt (Park et al., 2004), zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich viel PDF in den Terminalen gibt.

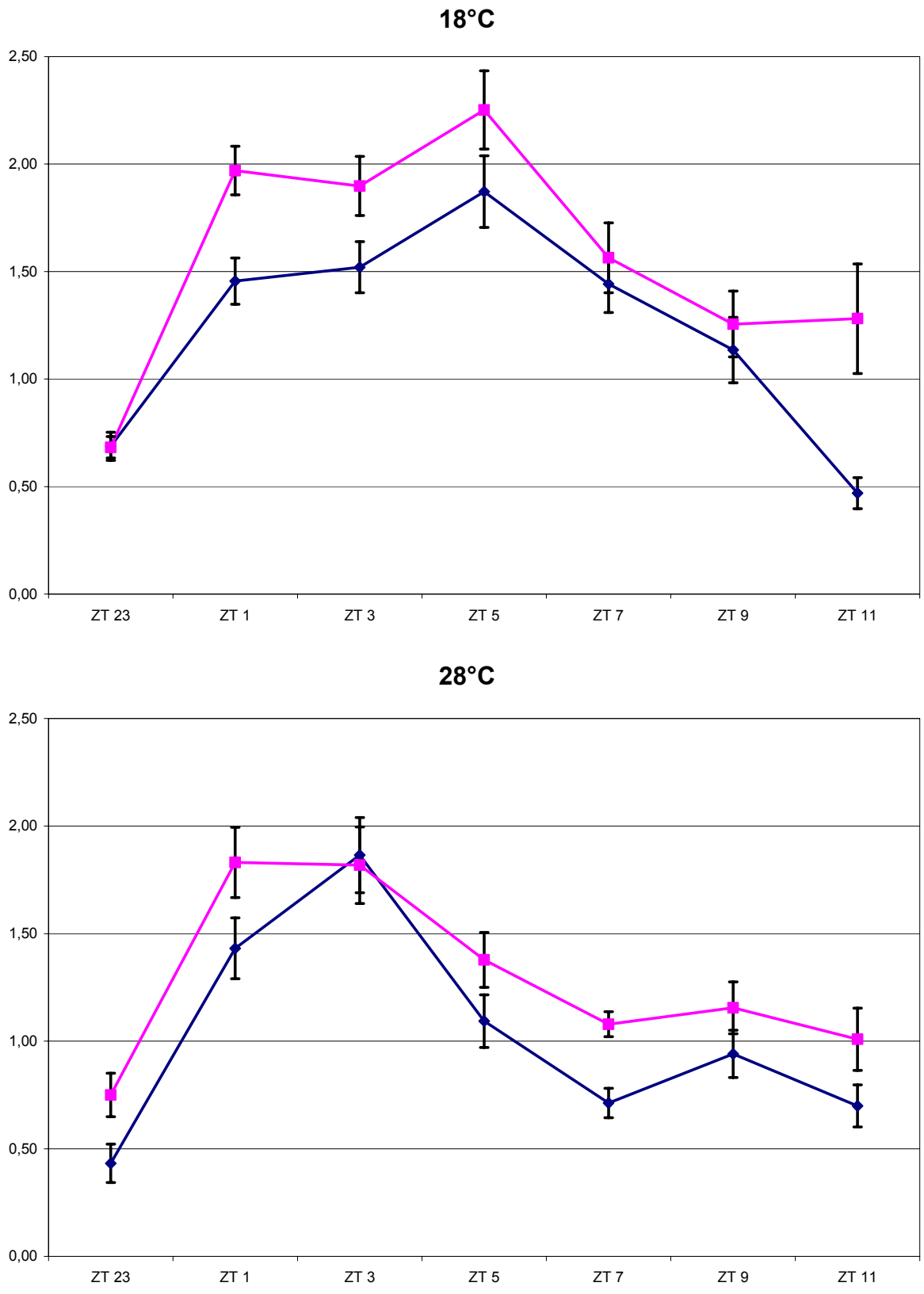


Abb. 29: Durchschnittliche PDF-Färbung der sINv Terminalen in Versuchs- und Kontrolltieren bei 18°C und 28°C zu verschiedenen Zeitpunkten. Es gibt keinen statistischen Unterschied in den Kurvenverläufen, lediglich die Färbe-Intensität war sowohl bei 18°C als auch bei 28°C in den Kontrolltieren signifikant höher als in den Versuchstieren. Kontrolltiere: Pink, Versuchstiere: Blau

Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, dass PDF in den Terminalen der sLNv rhyhmisch vorhanden ist. Bei 18°C ist ein Peak zu sehen, der sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrolltieren bei ZT5 liegt. Bei 28°C existieren 2 Peaks, die zwischen ZT1 und ZT3 und bei ZT9 auftreten. Dieser Einfluss der Temperatur auf den Intensitätsverlauf ist signifikant (p=0,02). Was der ähnliche Verlauf der Kurven in den Grafiken weiter impliziert, bestätigte die statistische Untersuchung: Es gibt keine Wechselwirkung zwischen der Temperatur und den Stämmen, d.h. die Temperatur hat in den Versuchstieren keine andere Wirkung als in den Kontrolltieren (F(1/417)=0,39, p=0,53). Jedoch ist ein Unterschied in der Intensität festzustellen. Sie ist in den Kontrolltieren allgemein höher als in den Versuchstieren (p<0,01).

3.7. Vergleich der Durchschnittstage von *CS* und *y w; ;Pdf*^{01} bei 18°C und 28°C

Um festzustellen, ob PDF in die Peakverschiebungen bei höheren Temperaturen eingreift, wurden *Canton S* und *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen unter denselben Bedingungen wie im *shibire* Versuch aufgezeichnet. Abb. 30 zeigt Beispielaktogramme der beiden Stämme:

Canton S

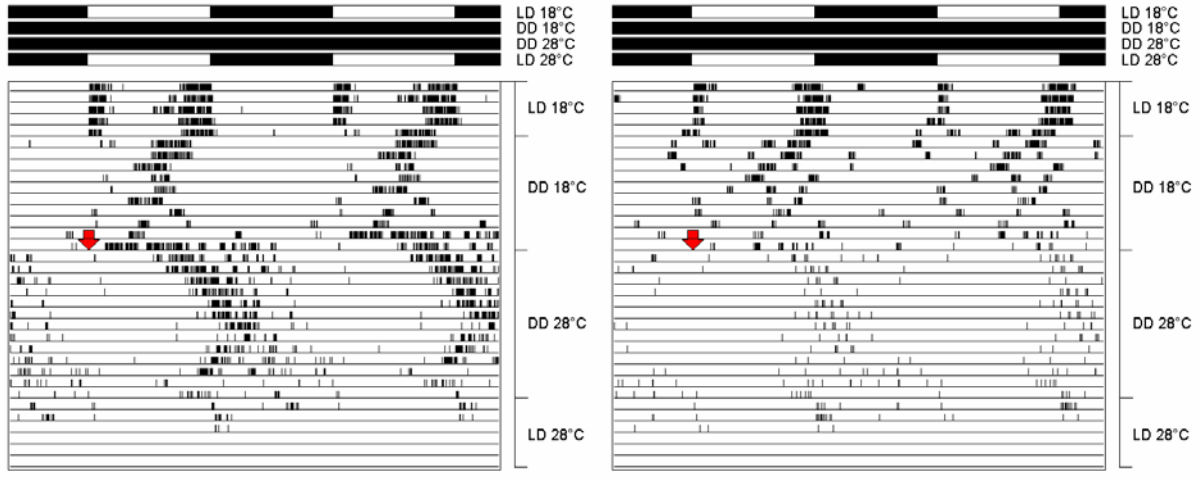


Abb. 30.: Fortsetzung siehe nächste Seite

y w; ;Pdf^{01}

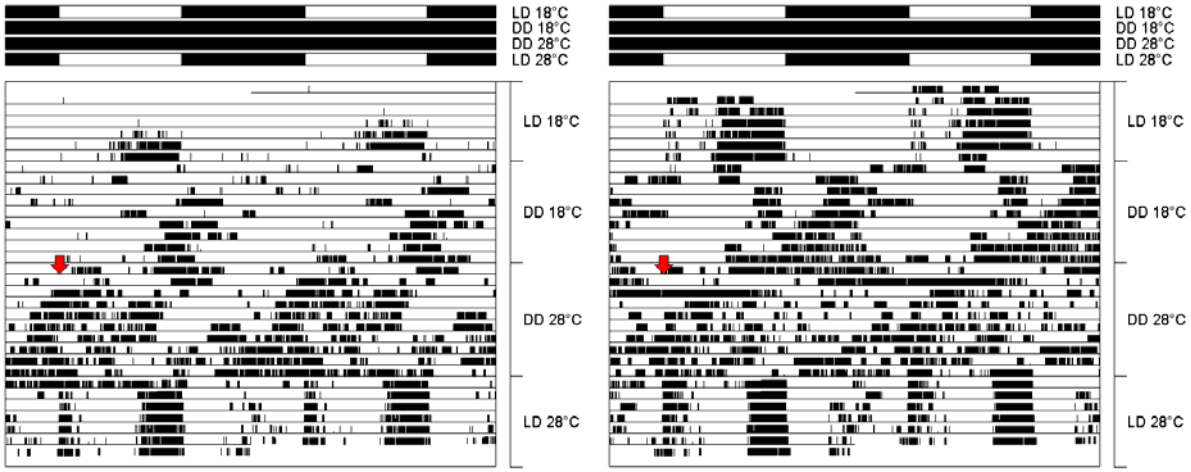


Abb. 30: Beispielaktogramme von Canton S und y w; ;Pdf01, die typische Vertreter der Laufaktivität der beiden Stämme darstellen.

Die daraus resultierenden Durchschnittstage sind in Abb. 31 zu sehen. Da sich die Feststellung der Periodenlänge bei vielen Fliegen als recht schwierig erwies, sind hier jeweils nur diejenigen mit einberechnet, die bei beiden Temperaturen eine klare deutliche Periode zeigten. Bei *Canton S* traf dies auf 6 Tiere zu, bei *y w; ;Pdf^{01}* auf 4. Nur 2 der CS Fliegen waren auch im LD bei 28°C am Leben, deshalb ist dieser Durchschnittstag sehr minimalistisch. Allgemein sind die Durchschnittstage von so wenigen Individuen nicht sehr gleichmäßig in ihrer Struktur, was auch hier zu sehen ist.

Fliegen, welchen das Neuropeptid PDF fehlt, zeigen bei 18°C einen sehr kleinen Morgenpeak – sowohl im LD als auch im DD. Bei 28°C im DD ist er dann anscheinend größer als der Abendpeak. Im LD zeigen die *Pdf^{0}* Tiere 3 Peaks von denen 2 als normale Morgen- und Abendpeaks erscheinen, während der Dritte mitten in der Nacht zu sehen ist.

Anhand der Durchschnittstage ist es nicht möglich, die exakten Peak - Maxima abzulesen, um festzustellen, ob die Peaks sich voneinander entfernen, oder nicht. Deshalb wurden die Einzeldurchschnittstage der Fliegen mit dem Programm Systat stark geglättet und dann von dieser neuen Kurve die Uhrzeit der Maxima bestimmt (Abb. 32). Mittelwerte und Standardfehler aller Fliegen aus diesen Berechnungen sind in dieser Abbildung sichtbar gemacht. Bei *CS* im 2.LD bei 28°C scheint es so, als hätten diese Fliegen einen Peak in der Nacht, jedoch waren hier nur 2 Fliegen auswertbar und diese nur jeweils 3 Tage aktiv (siehe Abb. 30), somit kann nicht gesagt werden, ob es sich um echte Peaks, oder Artefakte handelt und deshalb wurde nicht näher darauf eingegangen.

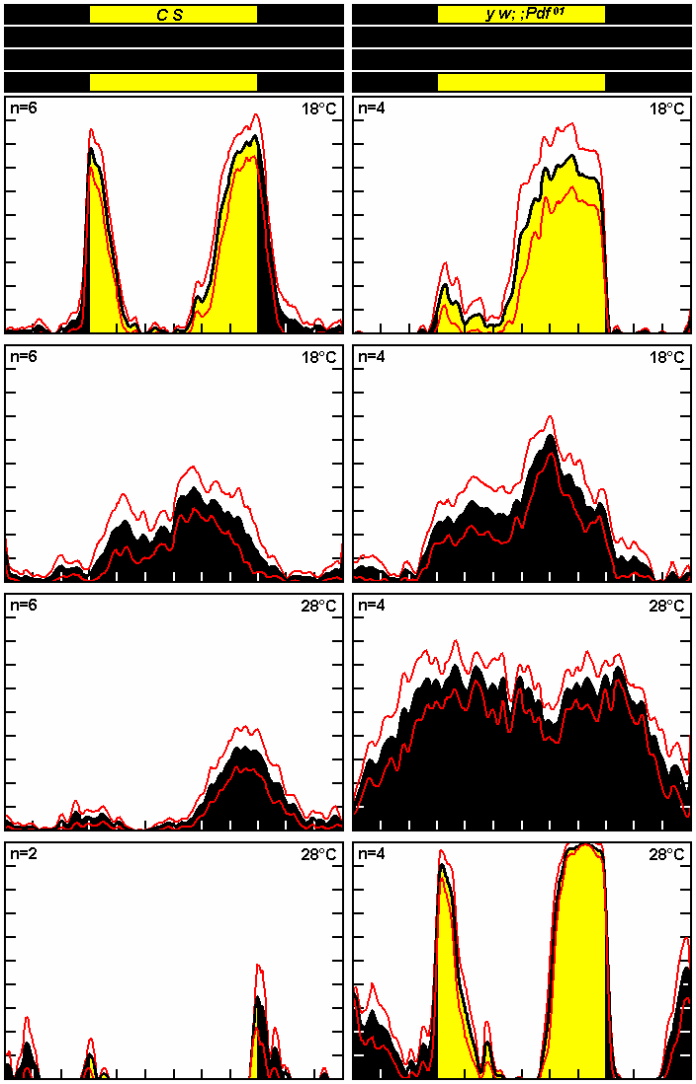


Abb. 31: Durchschnittstage der *CS* Fliegen und der *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen bei 18, bzw. 28°C. Die genauen Anzahlen der Tiere, die für die einzelnen Durchschnittstage verwendet wurden, können in der jeweils oberen linken Ecke abgelesen werden. Die rein schwarzen Durchschnittstage sind DD-Durchschnittstage, bei den Anderen stellt gelb die Lichtphase des Tages dar. Die Temperatur ist in den rechten oberen Ecken der Durchschnittstage zu finden. *CS* ist links, *y w; ;Pdf*^{01} rechts.

Bei *CS* kann man sowohl im LD als auch im DD erkennen, dass die Maxima von Morgen und Abendpeak sich bei 28°C weiter vom Tagesmittelpunkt entfernen als bei 18°C. *y w; ;Pdf*^{01} zeigt mit dieser Auswertungsmethode bereits im DD bei 28°C 3 Peaks, was den Vergleich über das Auseinanderdriften der Peaks zwischen *CS* und pdf0 zunichte machte.

Die im DD gefundenen Peaks sind schwer statistisch miteinander zu vergleichen, da bei 28°C jeglicher Anhaltspunkt für die richtige Lage der Peaks fehlt, deshalb wurden sie für den Grafen anhand der Morgenpeakdaten aus dem LD angeordnet.

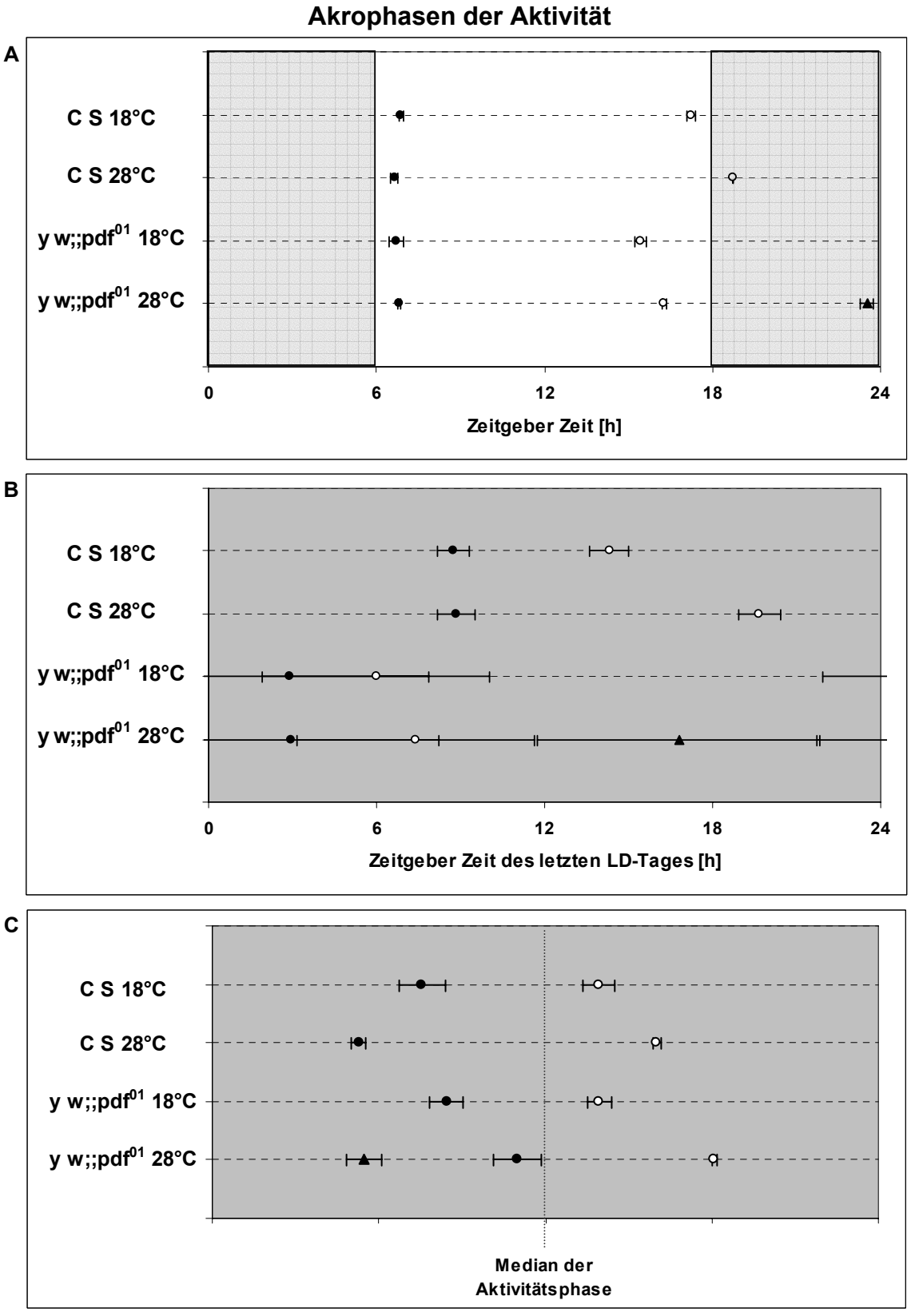


Abb. 32 A-C: Akrophasen der Aktivitätspeaks von *CS* und *y w; ;Pdf^{01}* bei 18°C und 28°C. A: LD Bedingungen (bezogen auf die Uhrzeit). Fliegen ohne PDF haben einen verfrühten Abendpeak und bei 28°C einen 3. Aktivitätspeak in der Nacht. B: DD Bedingungen. Die Zeitpunkte der Maxima wurden auf den letzten LD-Tag zurück extrapoliert. Wieder zeigt *y w; ;Pdf^{01}* 3 Peaks bei 28°C. Unter den pdf0-Fliegen herrscht große Variabilität, was die Vorverschiebung der Aktivität im DD angeht. C: Deshalb wurden die DD Peaks auch noch so geplottet, dass der Aktivitätsmedian auf die 12 Uhr Position gelegt wurde. Hier ist dann zu sehen, dass die Vorverschiebung zwar variabel ist, aber die Phasenlage der Peaks zueinander ist sehr ähnlich.

Statistisch gesehen ist diese Positionierung im DD bei 28°C willkürlich, auch wenn sie auf den Beobachtungen des LD beruht. Deshalb wurden die statistischen Vergleiche auf den LD und den 18°C DD beschränkt. Leider müssen die Ergebnisse trotz dieser Einschränkung mit äußerster Vorsicht betrachtet werden, weil nur sehr wenige Tiere zur Auswertung zur Verfügung standen. Daher lassen sich nur wenige Dinge mit Sicherheit sagen: Der Abendpeak von *y w; ;Pdf*^{01} ist im LD signifikant früher als der von *CS* ($p<0,001$). Die Morgenpeaks unterscheiden sich statistisch nicht, jedoch lässt sich in der Grafik die Tendenz dazu ablesen, dass bei CS der Morgenpeak bei 18°C später liegt als bei 28°C. Bei so wenigen Tieren kann man allerdings keine Aussage drüber treffen, ob dies ein systematisches Phänomen ist, oder nicht. Bei *y w; ;Pdf*^{01} scheint es nicht der Fall zu sein, allerdings gilt auch hier, dass mehr Tiere benötigt würden, um diese Aussage zu verifizieren.
Beide Stämme reagieren gleich auf die höhere Temperatur, nämlich mit einer signifikanten Verschiebung des Abendpeaks nach hinten ($p<0,001$). Im 18°C DD gibt es aufgrund der hohen Variabilität von *y w; ;Pdf*^{01} keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Morgen und Abendpeaks, aber man kann trotzdem deutlich erkennen, das bei den Fliegen ohne PDF die Akrophasen der Aktivitätspeaks sich im Vergleich zum Wildtyp nach vorne verschieben.

Damit die Frage nach der Herkunft des dritten Peaks genauer beleuchtet werden konnte, wurden *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen und y w Fliegen bei 30°C aufgezeichnet. Leider konnte bei diesen Fliegen kaum Nachtaktivität im Durchschnittstag festgestellt werden, und auch im Dauerdunkel war kein 3. Aktivitätspeak festzustellen. Deshalb wird hierauf nicht weiter eingegangen.

4. Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) als Tracer für sLNv-Folgeneuronen

Des Weiteren sollte untersucht werden, über welche Zellen, das PDF-Signal im dorsalen Protocerebrum weitergegeben wird. WGA ist ein Lektin das sowohl anterograd als auch reterograd an der Synapse weitergegeben werden kann (Yoshihara et al., 1999; Tabuchi et al., 2000). Mit dem *GAL4/UAS* System in die Fliege gebracht, sollten Folgezellen sichtbar gemacht werden. Da nach mündlicher Mitteilung von D. Rieger dieses Lektin erst akkumulieren muß, wurden 5 Wochen alte Fliegen präpariert. Die dorsale Region um die Endigungen der sLNv wurde dann genauer betrachtet.

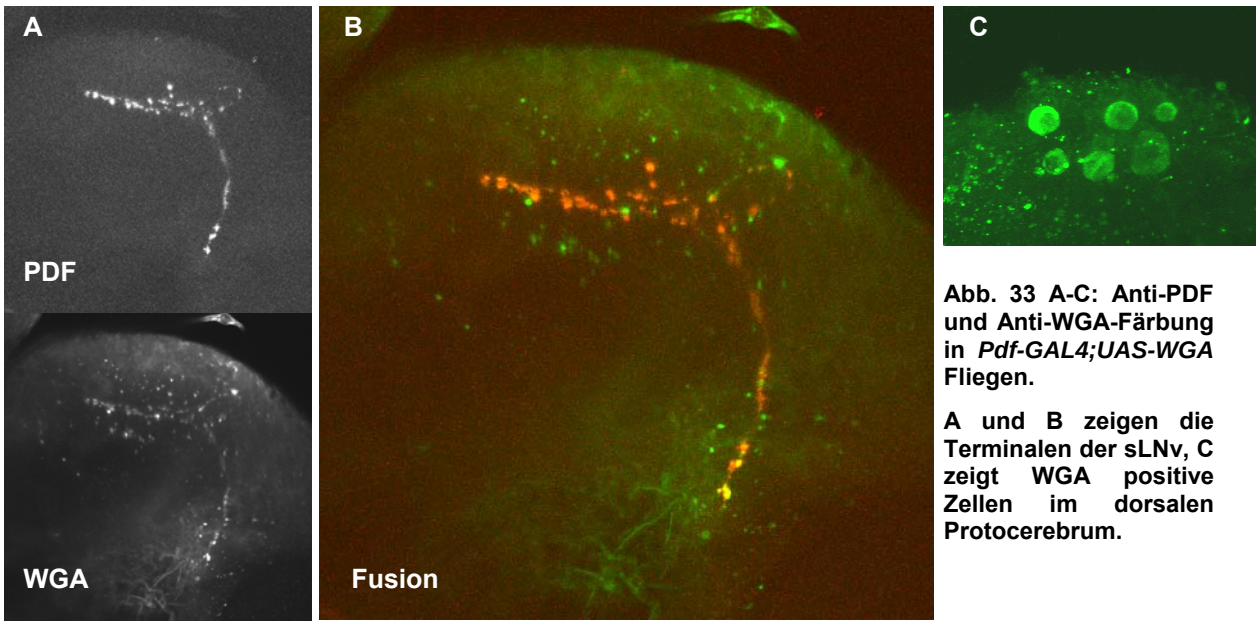


Abb. 33 A-C: Anti-PDF und Anti-WGA-Färbung in *Pdf-GAL4;UAS-WGA* Fliegen.

A und B zeigen die Terminalen der sLNv, C zeigt WGA positive Zellen im dorsalen Protocerebrum.

In Abb. 33 B kann man sehen, dass das WGA sowohl im Trakt der sLNv vorhanden ist, als auch in Verästelungen, in denen kein PDF zu sehen ist. Außerdem sind direkt neben den PDF-Endigungen einzelne grüne WGA-Punkte. Des Weiteren waren wenige Zellen im dorsalen Protocerebrum angefärbt Abb. 33 C. Diese sind von ihrer

Lage her nahe der DN1, jedoch teilweise zu groß um selbst DN1 zu sein. Bei einer Kontrollfärbung mit CantonS Fliegen konnte außerdem festgestellt werden (Abb. 34), dass diese Zellen auch in Wildtypfliegen mit dem WGA-Antikörper anfärbbar sind. Dies bedeutet, dass der Antikörper nicht spezifisch genug ist und diese Zellen wahrscheinlich keine echte WGA-Färbung besitzen.

Zusätzlich sind auch in den Kontrollfärbungen Anti-WGA gefärbte Punkte im dorsalen Protocerebrum zu sehen, allerdings lassen sich keine Punkte sehr nahe an oder in den dorsalen Endigungen der sLNv feststellen, außerdem sind die WGA-Punkte in *CS* signifikant (p=0,004) dunkler als in den Versuchstieren (siehe Abb. 34 C) und sind offensichtlich kleiner. Deshalb kann davon ausgegangen werden dass hier eine spezifische Färbung in den gekreuzten Versuchstieren vorliegt.

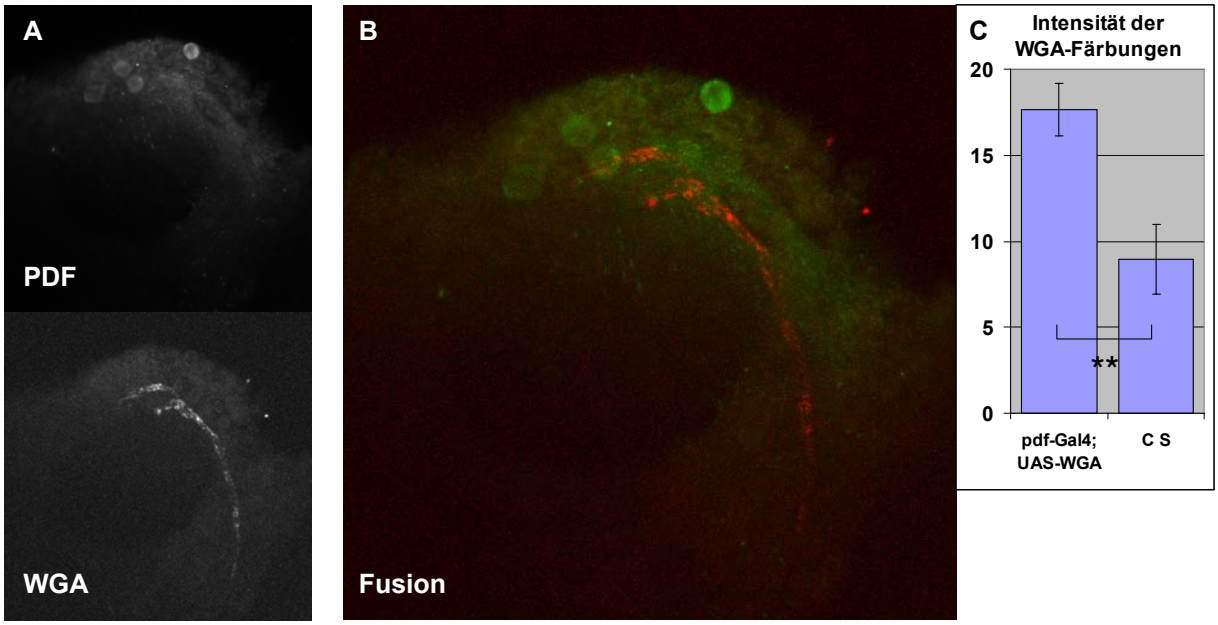


Abb. 34 A-C: Anti-PDF und Anti-WGA-Kontrollfärbung in *CS* Fliegen und Färbequantifizierung
A und B zeigen die Region der Terminalen der sLNv mit angefärbten WGA-positiven Zellen. In C ist die vergleichende Quantifizierung der WGA Färbungen in den Versuchstieren und den Kontrollen zu sehen.

Leider konnte nicht festgestellt werden, welchen Zellen bzw. Zellkörper diese potentiellen nachgeschalteten Synapsen der sLNv entspringen. Jedoch sind Sulfakinin positive Zellen im dorsalen Protocerebrum Kandidaten, die circadiane Information der sLNv aufnehmen und weiterleiten könnten (mündliche Mitteilung C. Förster). Deshalb wurden Antikörperfärbungen mit Sulfakinin durchgeführt.

Abb. 35 zeigt ein Gehirn einer *cry-GAL4 UAS-GFP* Fliege, die zusätzlich mit Anti-Sulfakinin Antikörpern angefärbt wurde. Da sehr viel im Gehirn Sulfakinin – positiv ist, ist es durchaus möglich, dass die kleinen PDF-Zellen über das Sulfakinin

Netzwerk ihre circadiane Information an nachgeschaltete Effektor-Organe weitergeben. Jedoch kann dies nicht mit Sicherheit gesagt werden.

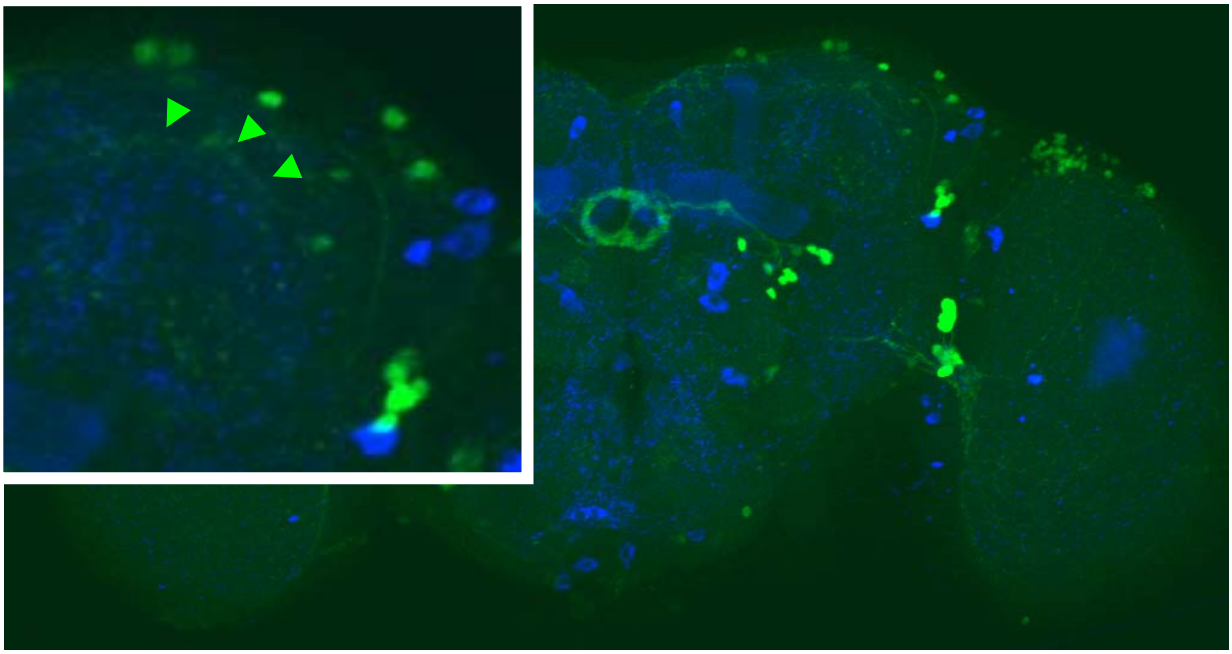
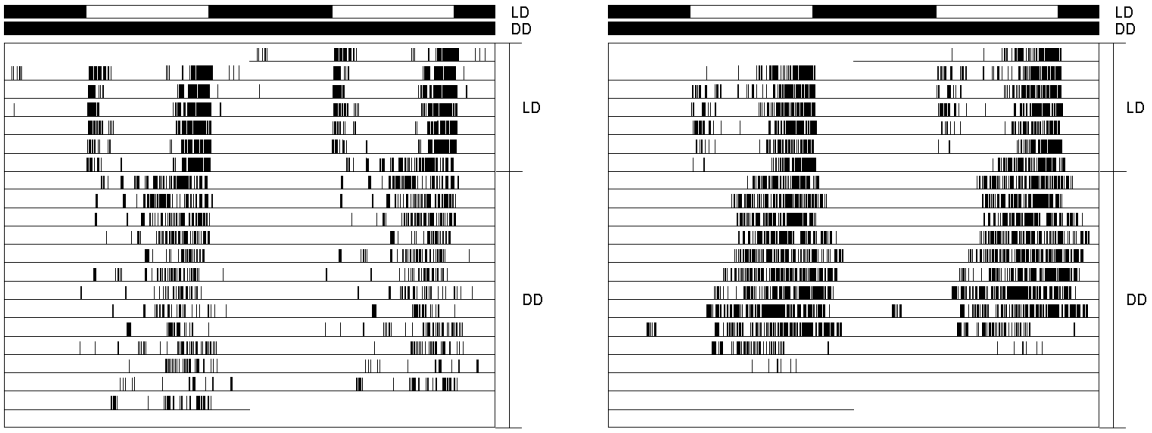


Abb. 35: Sulfakinin und cry Markierungen in einem *Drosophila* Gehirn. (Blau: Sulfakinin, GFP: cry-GAL4-13) In dem vergrößerten Ausschnitt sind die Terminalen der sLNv zu sehen mit sulfakinin-positiven Endigungen in unmittelbarer Nähe.

5. Ablation verschiedener Untergruppen von Uhrzellen

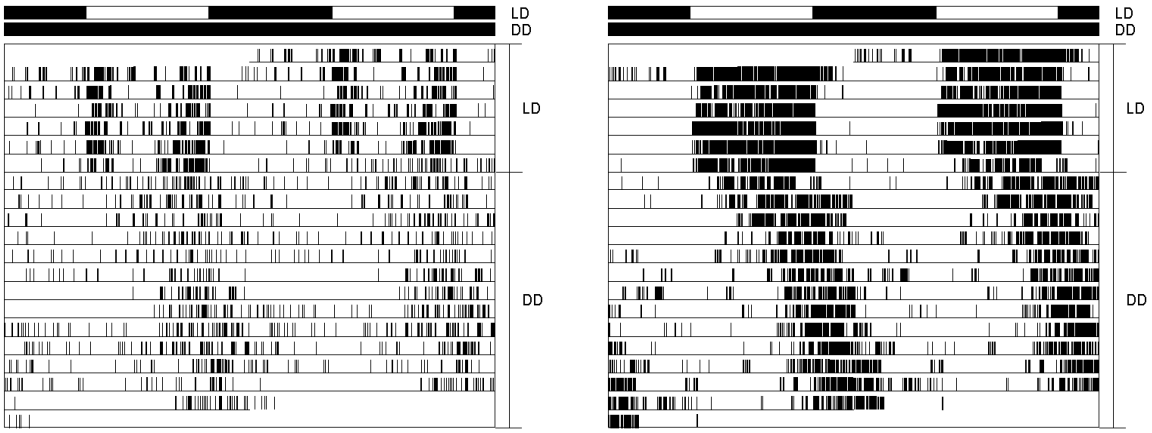
Die bisherigen Versuche zeigen, dass PDF im circadianen Netzwerk eine Rolle in der Signalübertragung spielt. Nun sollte herausgefunden werden, was geschieht, wenn dieses Gefüge durch die Ablation wichtiger Uhrzellgruppen gestört wird. Dafür wurden *UAS-hid* Fliegen mit verschiedenen *GAL4*-Stämmen gekreuzt und dann in ihrer Laufaktivität beobachtet. Die folgenden Abbildungen zeigen typische Aktogramme der einzelnen Versuchs und Kontrollstämme.

1. *UAS-hid*



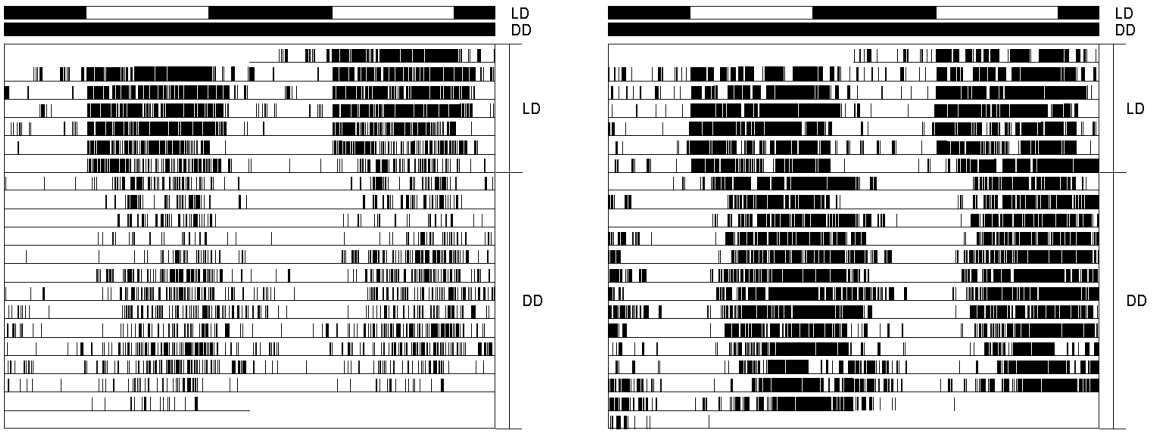
Männchen **Weibchen**

2. GAL4 Stämme
a) *cry-BN-GAL4-13*



Männchen **Weibchen**

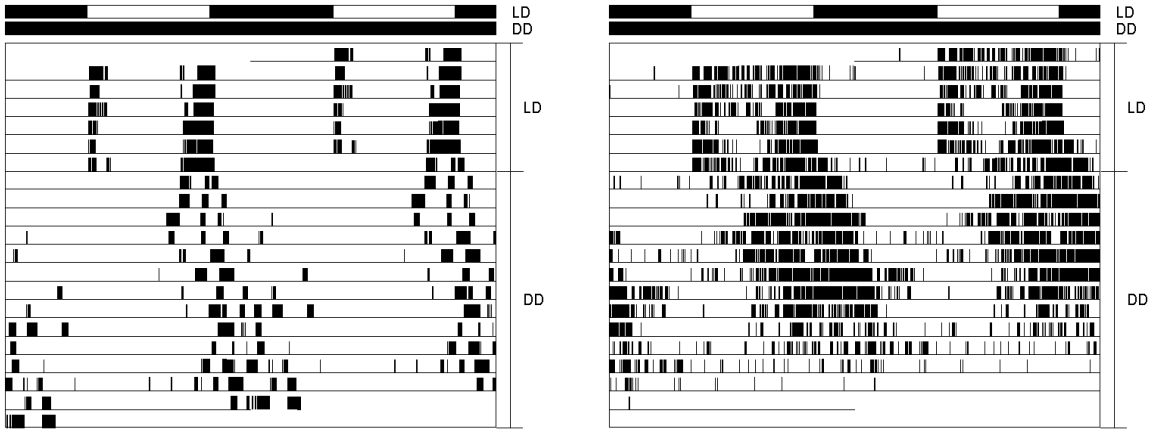
b) *Pdf-GAL80;cryBN-GAL4-13*



Männchen **Weibchen**

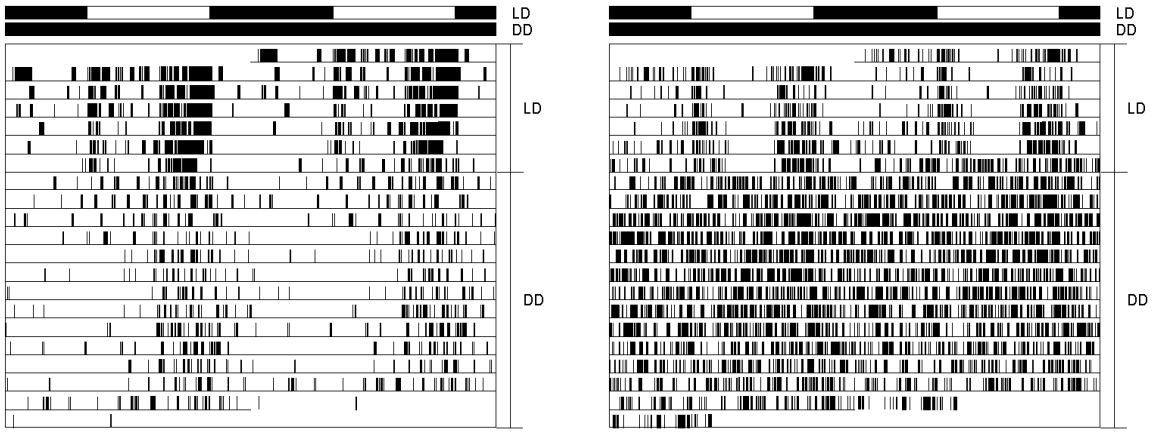
Abb. 36: Fortsetzung siehe nächste Seite

c) *Pdf-GAL4*

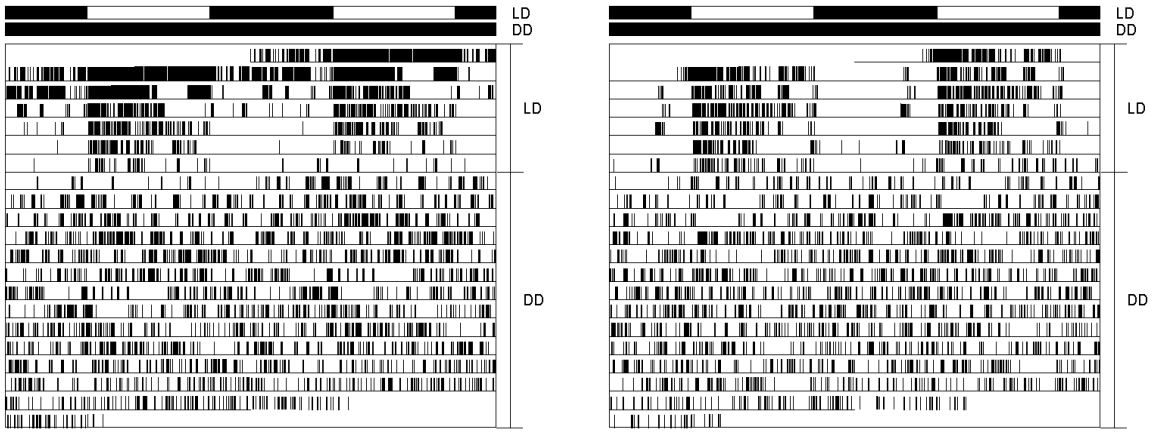


Männchen **Weibchen**

3. Die Versuchsstämme
a) *UAS-hid;cryBN-GAL4-13*



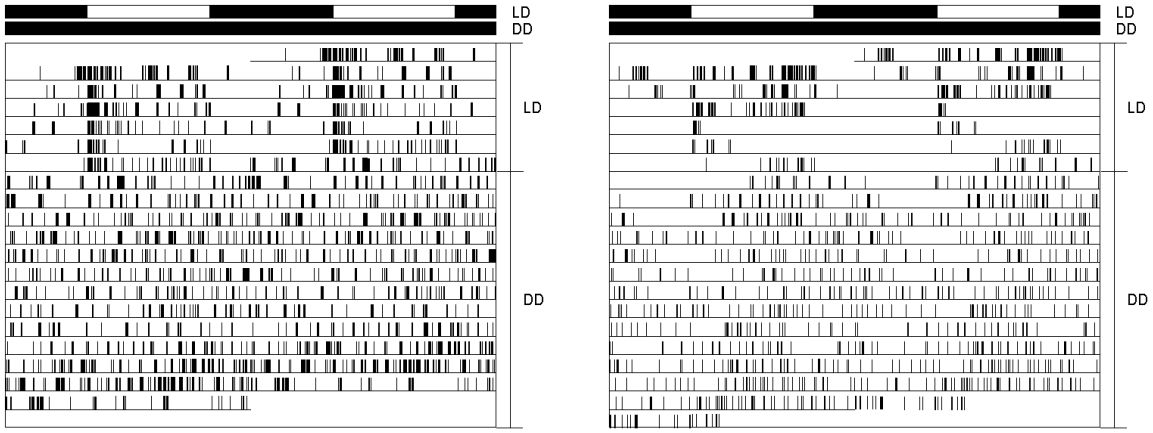
Männchen



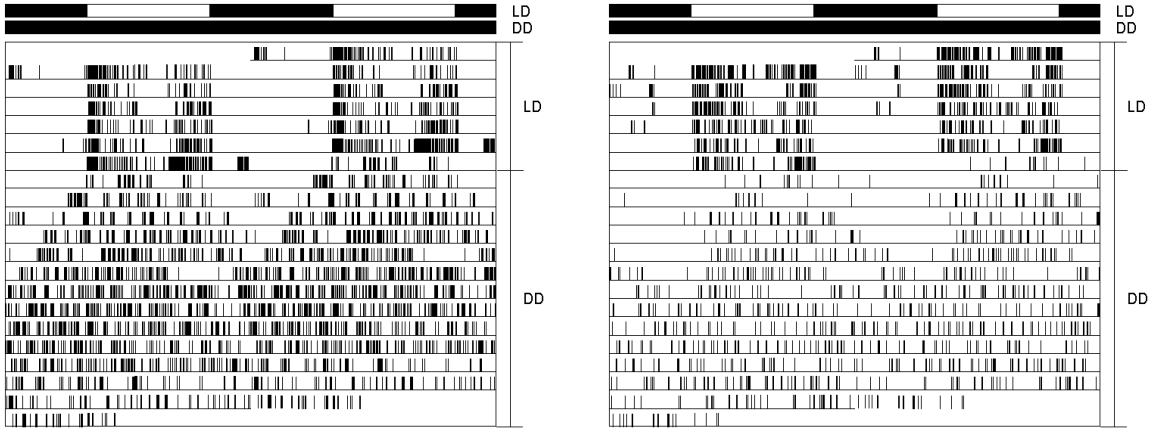
Weibchen

Abb. 36: Fortsetzung siehe nächste Seite

b) *Pdf-GAL80-cryBN-GAL4-13;UAS-hid*

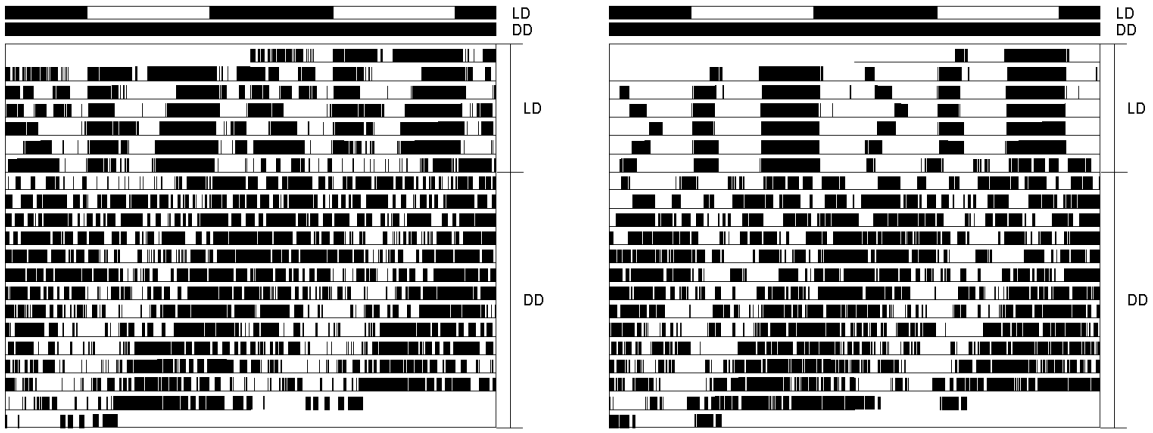


Männchen



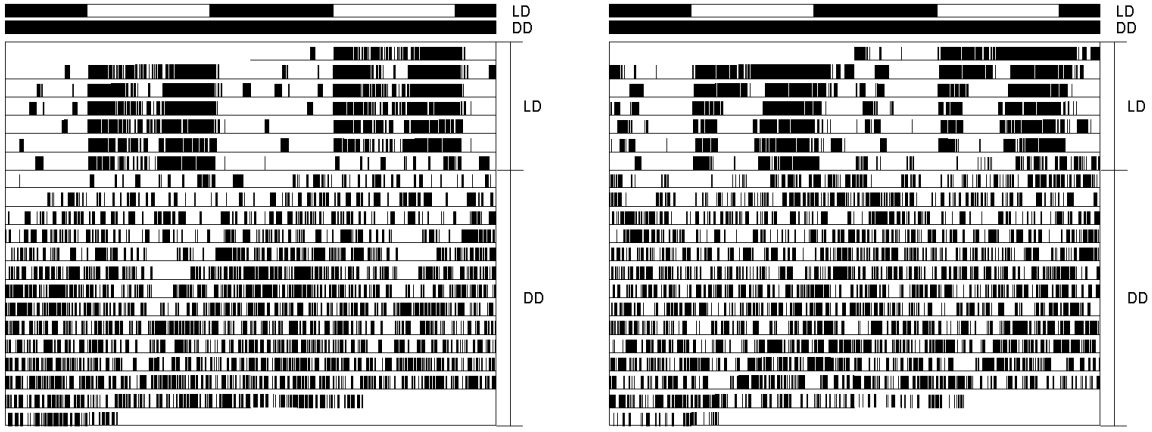
Weibchen

c) *Pdf-GAL4;UAS-hid*



Männchen

Abb. 36: Fortsetzung siehe nächste Seite



Weibchen

Abb. 36: Beispielaktogramme der Versuchs- und Kontrollfliegen des Ablationsversuch. Die Tiere waren bei 20°C ca. 1 Woche im LD, danach wurden sie ins Dauerdunkel transferiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Kontrollstämme in ihrer Rhythmizität nicht beeinträchtigt sind, die Versuchstiere, jedoch, je nach Ablation Probleme haben, unter konstanten Bedingungen ihren Rhythmus beizubehalten.

5.1. Laufaktivitätsversuch der ablatierten Fliegen

Prüft man die Aktivitäten im LD, so fallen vor allem die nächtlichen Aktivitäten bei manchen Stämmen auf. Deshalb wurden die Aktivitätsverteilungen im Durchschnittstag ausgewertet. Die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Zeiträume (Morgen-, Abend- und Nachtaktivität) erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Statistische Analysen der Verteilungen ergaben, dass sich manche Stichproben so sehr voneinander unterschieden ($p<0,000001$) dass für die späteren Varianzanalysen ein sehr hoher Korrekturfaktor nach Glaser (1978), nämlich 10, verwendet werden musste. Damit konnte sichergestellt werden, dass die errechneten Signifikanzen tatsächlich vorhanden waren.

In diesem Versuch wurden sowohl Männchen als auch Weibchen betrachtet. Tatsächlich gibt es auch einen Geschlechterdimorphismus in der Aktivitätsverteilung. Die Weibchen sind prozentual mehr am Morgen ($P=0,015$) und weniger in der Nacht ($p<0,001$) aktiv (o. Abb.). Da sich dieses Ergebnis allerdings in allen Stämmen mit einer teils höheren teils niedrigeren Tendenz gleicht, konnten Männchen und Weibchen gemeinsam betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Parentalstämme (o. Abb.) zeigten nur einen signifikanten Unterschied zwischen den *GAL4* Stämmen und des *UAS-hid* Stammes ($p=0,008$). Deshalb wurden die *GAL4* Stämme zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst.

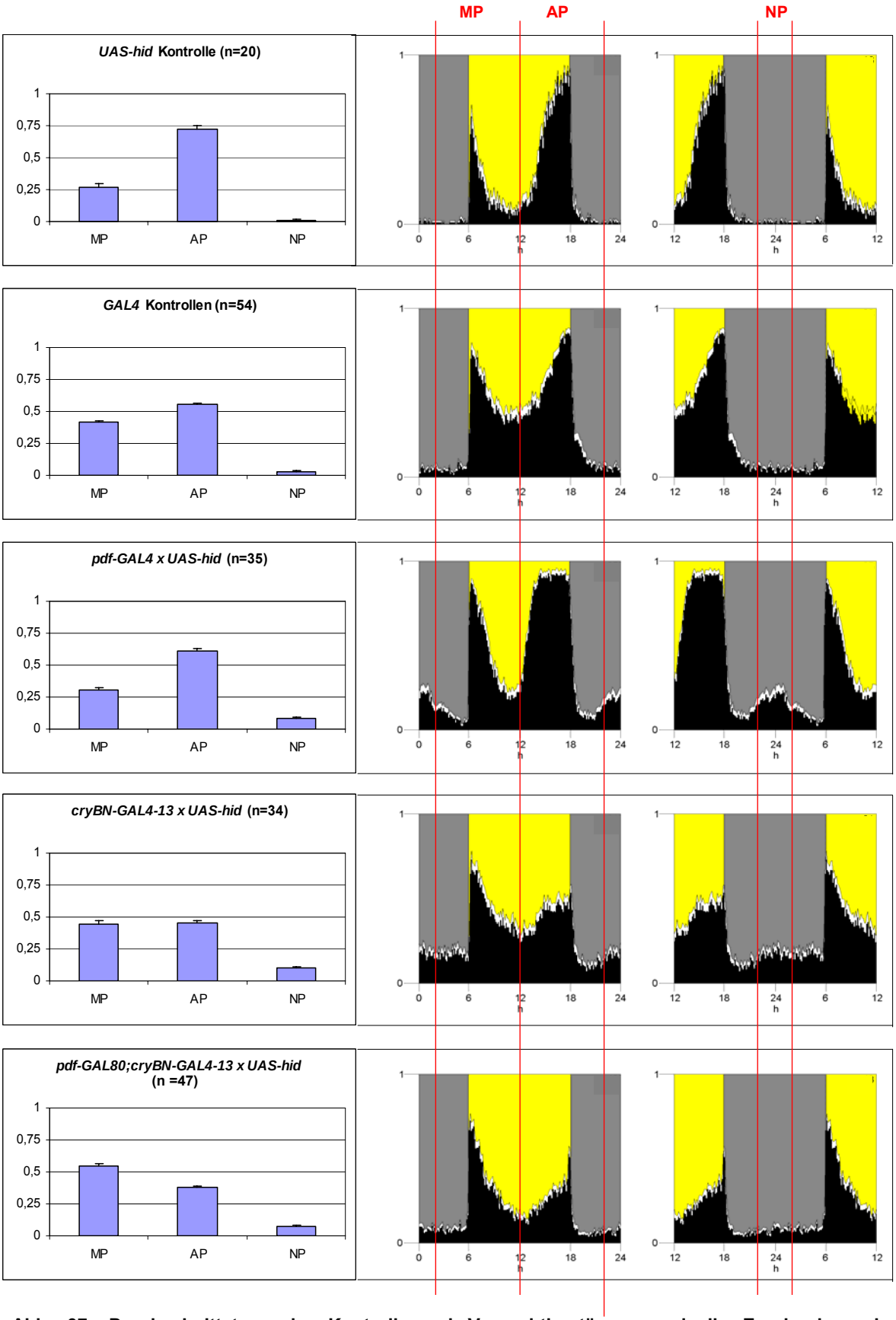


Abb. 37: Durchschnittstage der Kontroll- und Versuchtierstämme und die Ergebnnisse der Quantifizierung der prozentualen Aktivitätsmenge pro Peak. Der zweite Durchschnittstag ist invers geplottet, so dass die Nachtphase als zusammenhängendes Stück gesehen werden kann. Die roten Striche in den Durchschnittstagen zeigen die gewählten Grenzen für die Quantifizierung an. MP: Morgenpeak; AP: Abendpeak; NP: Nachtpeak.

Abb. 37 zeigt alle Durchschnittstage und die Ergebnisse der Quantifizierung der Versuchs- und Kontrollstämme. Die Statistische Auswertung ergab folgendes: Der Morgenpeak verhält sich nicht in allen Stämmen gleich ($F(4/180)=44,00$; $p<0,001$). Ein Post hoc Test zeigte, dass die morgendliche Aktivität von *Pdf-Gal80;cry-GAL4 UAS-hid* signifikant mehr als bei allen anderen Stämmen ist. Die *UAS*-Kontrolle und *Pdf-GAL4 UAS-hid* haben statistisch dieselbe prozentuale Menge an morgendlicher Aktivität, welche geringer als bei allen anderen Stämmen ist. *Cry-GAL4 UAS-hid* und die *GAL*-Kontrollen liegen mit ihrer morgendlichen Aktivität zwischen den anderen Stämmen und unterscheiden sich statistisch nicht. Anders beim Abendpeak der einzelnen Stämme ($F(4/180)=57,88$; $p<0,001$): Hier ist die *UAS-hid* Kontrolle der Stamm mit der prozentual höchsten abendlichen Aktivität und somit signifikant unterschiedlich zu allen anderen Stämmen. *Cry-GAL4 UAS-hid* und *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* haben eine statistisch gleiche geringere abendliche Aktivität, die sich mit allen anderen Stämmen signifikant unterschiedet. Die *GAL4* Kontrollen und *Pdf-GAL4 UAS-hid* liegen diesmal signifikant zwischen den anderen Stämmen.
Wie aus den Grafiken (Abb. 37) ersichtlich ist, ist in den Kontrolltieren die nächtliche Aktivität sehr gering, während sie in den Versuchstieren im Vergleich höher ist ($F(4/180)=18,71$; $p<0,001$).
Der Unterschied in den Stämmen ist signifikant zwischen den Kontrollstämmen und den Versuchstieren. Die Versuchstierstämme sind untereinander nicht signifikant verschieden, jedoch gibt es gewisse Tendenzen: die meiste Nachtaktivität zeigt *cry-GAL4 UAS-hid*, gefolgt von *Pdf-GAL4 UAS-hid*.

Schließlich und endlich lässt sich sagen, dass die Stämme, in denen Uhrzellen ablatiert wurden, nächtliche Aktivitätsanteile haben, während die Kontrollstämme kaum nächtliche Aktivität zeigen. Außerdem scheint sich das Verteilungsmuster der Aktivität beim Fehlen bestimmter Uhrzellen zu verschieben. So ist die morgendliche Aktivität in den Kontrollen immer geringer als der Abendpeak. Fehlen allerdings alle Hauptschrittmacher gleichen sich die Aktivitätsmengen aus. Sind nur die sLNv vorhanden, schlägt die Verteilung sogar um und die Fliegen zeigen mehr Aktivität am Morgen als am Abend.

Danach wurden jeweils 10 Fliegen ohne Rücksicht auf Geschlecht und im Falle der *GAL4*-Kontrollen ohne Rücksicht auf den Stamm zufällig aus den Versuchs- und Kontrollstämmen ausgewählt, um an ihnen die Peaks der einzelnen Aktivitätszeiträume zu bestimmen, so wie auch im vorigen Versuch bei *y w; ;Pdf*^{01} und *CS* geschehen. Abb. 38 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung:

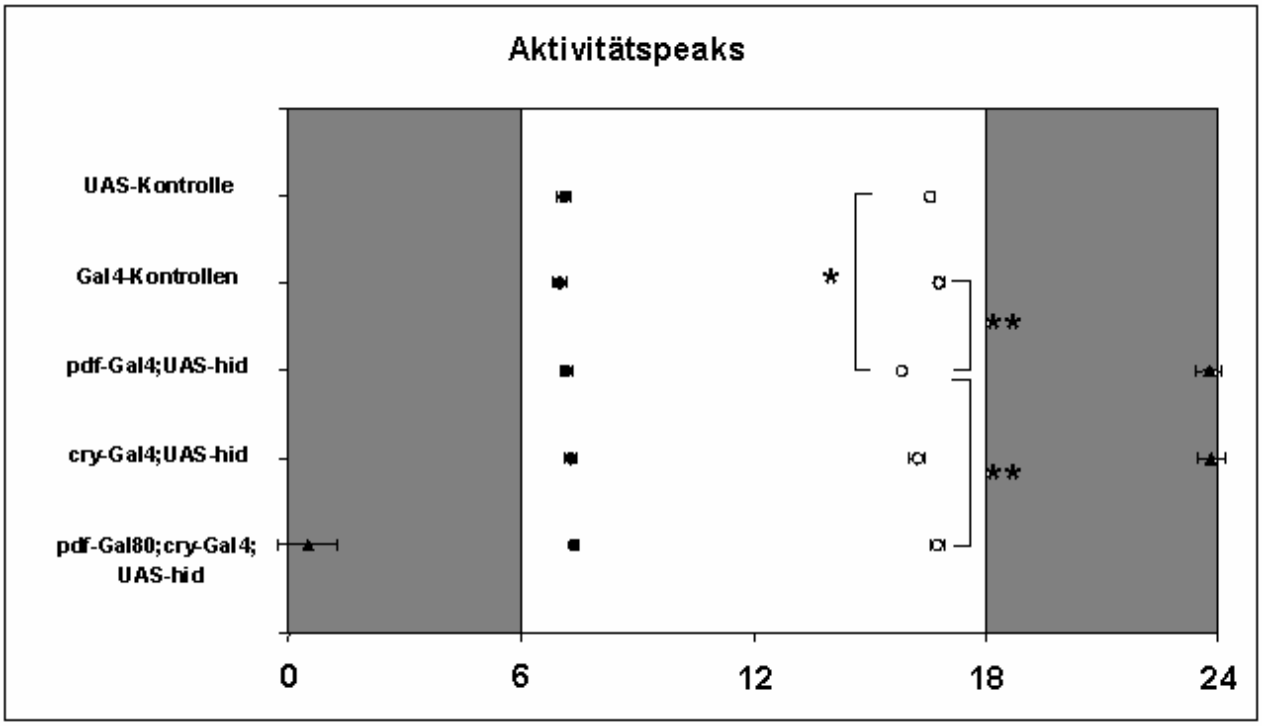


Abb. 38: Akrophasen der Morgendlichen, abendlichen und nächtlichen Aktivität in Kontrollstämmen und Fliegen mir ablatierten Uhrneuronen. Morgenpeak und Nachtpeak treten bei allen Fliegen zur gleichen Zeit auf; das Abendpeak-Maximum ist bei *Pdf-GAL4 UAS-hid* signifikant früher als bei den Kontrollstämmen und *bei Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid*, jedoch nicht früher als das von *cry-GAL4 UAS-hid*. (✱: p≤0,05; ✱✱: p ≤ 0,01)

Die Kontrollen zeigen keinen Nachtpeak, während er in allen Versuchstierstämmen zumindest manchmal auftritt. Bei *Pdf-GAL4 UAS-hid* hatten alle untersuchten Fliegen einen nächtlichen Peak, bei *cry-GAL4 UAS-hid* 70%. Dieser ist in beiden Fällen sehr beständig in der Zeit, wann er auftritt. *Pdf-GAL80; cry-GAL4 UAS-hid* liegt zwischen den Kontroll- und Versuchstieren mit 4 von 10 möglichen nächtlichen Peaks und einer deutlichen Streuung in der Uhrzeit. Zeitlich gesehen liegt der Nachtpeak jedoch bei allen Stämmen statistisch gleich ($F(2/18)=2,02$; $p=0,162$). Auch die Morgenpeaks ereignen sich nicht zu unterschiedlichen Zeiten ($F(4/45)=0,86$; $p=0,486$). Bei den Abendpeaks gibt es jedoch Unterschiede ($F(4/45)=7,24$; $p<0,001$): Der *Pdf-GAL4 UAS-hid*-Peak liegt früher als der der Kontrollen. Auch die *Pdf-GAL80;cry-GAL4* Fliegen haben ihren Abendpeak später als die *Pdf-GAL4 UAS-hid* Fliegen.

Des Weiteren wurden – soweit möglich – die Periodenlängen der einzelnen Stämme ermittelt (siehe Tab. 3). Dabei stellte sich heraus, dass die Rhythmik der einzelnen Versuchsstämme im DD unterschiedlich war. Teilweise waren die Tiere über die gesamte Länge des Versuchs rhythmisch, teilweise ging die regelmäßige lokomotorische Aktivität schon nach wenigen Tagen in Arhythmie über. Dies gestaltete die Periodenlängenbestimmung recht schwierig, jedoch wurden immer alle Aktivitätstage in die Berechnung mit einbezogen. Alle Fliegen, die so schnell in Arhythmie übergingen, dass sie keine signifikante Periodenlänge zeigten, wurden als arhythmisch gewertet.

Tab. 3: Periodenlängen und Rhythmizität der Versuchs- und Kontrollstämme

Stamm	♂/♀	**n**	**davon im DD rhythmisch [%]**	**Periodenlänge [h]**
Pdf-GAL4	♂+♀	18	83,33	24,68±0,17
	♂	8	87,50	24,22±0,19
	♀	10	80,00	25,21±0,10
cry-GAL4	♂+♀	13	100	24,34±0,13
	♂	4	100	24,46±0,23
	♀	9	100	24,23±0,18
Pdf-GAL80;cry-GAL4	♂+♀	10	80,00	24,43±0,86
	♂	3	100	23,92±0,14
	♀	7	71,43	24,73±0,64
UAS-hid	♂+♀	16	100	23,99±0,09
	♂	9	100	23,90±0,15
	♀	7	100	24,11±0,08
Pdf-GAL4 UAS-hid	♂+♀	35	77,14	23,17±0,16
	♂	19	94,74	23,25±0,12
	♀	16	56,25	23,01±0,44
cry-GAL4 UAS-hid	♂+♀	31	16,13	25,08±0,57
	♂	20	15,00	25,31±0,59
	♀	11	18,18	24,75±1,42
Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid	♂+♀	44	20,45	23,92±0,20
	♂	29	13,79	24,27±0,36
	♀	15	33,33	23,63±13,59

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass allerdings mehrere Rhythmische Tage vorhanden waren, wurde in einer Doppelblindstudie von jedem Tier die Anzahl der rhythmischen Tage im DD bis zur Arrhythmie bestimmt. Hier war insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen festzustellen (p=0,291). Deshalb wurden sie gemeinsam betrachtet. Daraus ergibt sich folgende Konstellation: Die Kontrollgruppen und *Pdf-GAL4 UAS-hid* sind sehr lange oder fast durchgängig rhythmisch im DD, während *cry-GAL4 UAS-hid* und *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* im Durchschnitt noch nicht einmal die Hälfte der Gesamtanzahl von

Tagen im DD rhythmisch sind, bevor sie arhythmisch werden. Dieser Unterschied ist hochsignifikant (F(4/148)=49,808; p<0,001)

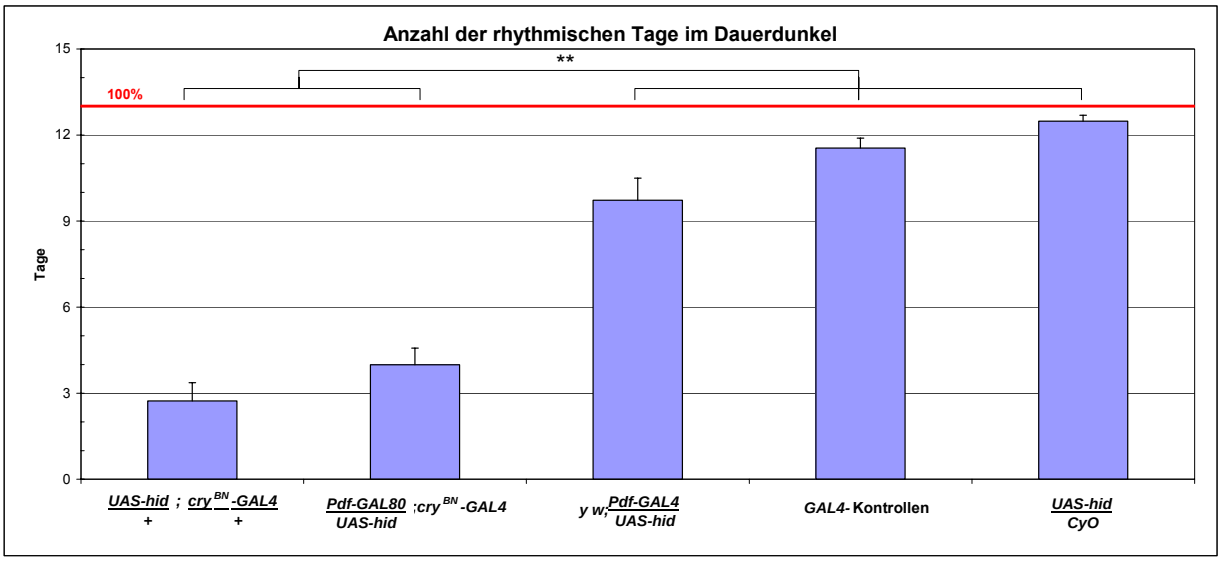


Abb. 39: Anzahl der rhythmischen Tage in Dauerdunkel. Männchen und Weibchen gepoolt. Die rote Markierung indiziert den Tag, an dem die Fliegen alle Tage im DD rhythmisch gewesen wären. Die Asterisken zeigen an, dass die Kontrollen und *Pdf-GAL4 UAS-hid* jeweils gegenüber *cry-GAL4 UAS-hid* und *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* signifikant länger rhythmisch sind. (p≤0,01)

Betrachtet man allerdings die Stämme einzeln getrennt voneinander, so stellt man fest, dass es dann bei zwei Stämmen einen signifikanten Unterschied zwischen Männchen und Weibchen gab. *Pdf-GAL4 UAS-hid* Weibchen werden hochsignifikant früher (p=0,002), nämlich nach gut der Hälfte der DD-Tage, arhythmisch als die dazugehörigen Männchen. Auch bei *UAS-hid* ist der Unterschied zwischen den Geschlechtern signifikant, jedoch werden hier die Weibchen im Durchschnitt erst einen Tag vor Ende des Versuchs arhythmisch. (p=0,012)

5.2. Immunhistochemische Präparationen von *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen

Betrachtet man die Aktogramme der *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen genauer, so stellt man fest, dass die Aktivität im DD nicht wie bei *cry-GAL4 UAS-hid* nach den durchschnittlich ersten 3 Tagen direkt arhythmisch wird, sondern „auseinander“ läuft, d.h. die Aktivitätsphase wird von Tag zu Tag länger, bis das Tier konstant über den gesamten Tag verteilt aktiv ist (Abb. 40) Um diesem Phänomen auf zellulärer Ebene auf die Spur zu kommen wurden Gehirne dieser Fliegen und der Kontrolle *UAS-hid* zu bestimmten Zeitpunkten im DD präpariert (genaues Schema siehe Material und

Methoden) und das Period Protein angefärbt. Über den PER Gehalt in den Zellen sollte festgestellt werden, ob die einzelnen Uhrzellgruppen synchron waren.

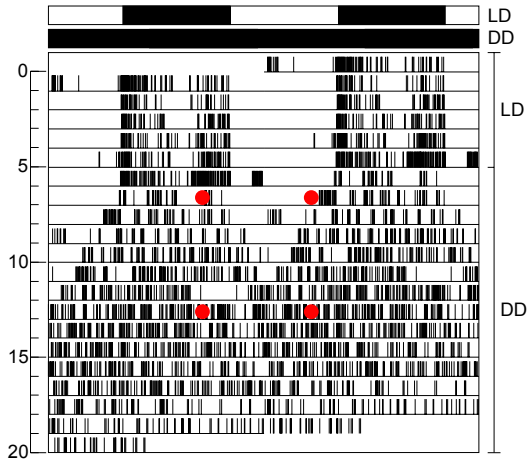


Abb. 40: Beispielaktogramm einer pdf-GAL80;cry-GAL4;UAS-hid Fliege. Im DD ist deutlich die stetige Verbreiterung der Aktivitätsphase bis hin zur Arythmie zu erkennen. Zusätzlich wurden im 1. und 7. Tag DD die Färbezeitpunkte eingezeichnet.

Die Kontrolle UAS-hid wurde gewählt, da sie im DD eine Periodenlänge von 23,99±0,09 h hat. Dies sollte auch bei Färbungen im DD in einheitlichen Ergebnissen resultieren, da die einzelnen Fliegen in ihrem circadianen Status nicht so weit voneinander entfernt sein können, wie bei höheren oder niedrigeren Periodenlängen. Wie im Material und Methoden – Teil beschrieben, wurden zuerst die Intensitäten der einzelnen Zellen der verschiedenen Zellgruppen bestimmt, dann die Zellzahl gezählt und aus diesen beiden Parametern der so genannte Färbeindex berechnet. (Die p-Werte aus diesem Versuch sind aufgrund ihrer Menge im Anhang nachzuschlagen.)

5.2.1. Feststellung des Normalzustandes durch Analyse der Kontrolle

Zuerst sollte überhaupt untersucht werden, was sich vom ersten zum siebten Tag im Dauerdunkel in den einzelnen Zellgruppen ändert. Dazu wurden die Färbeindices der *UAS-hid* Fliegen miteinander verglichen. Die statistische Untersuchung ergab, dass alle LNs sowohl am ersten als auch am siebten Tag im DD zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität signifikant mehr Period Protein beinhalten als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität. Die DN verhielten sich allerdings anders. Sie hatten zwar noch am ersten Tag im DD einen signifikanten rhythmischen Wechsel im PER-Gehalt, jedoch nicht mehr am siebten Tag im DD.

5.2.2. Numerische Analyse der Ablation der Zellen

Die statistische Untersuchung der Unterschiede der Zellzahlen zwischen den Versuchstieren und dem Kontrollstamm bestätigte, was teilweise schon über das Expressionsmuster zu sehen war: Da bei den *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen die lLNv, die 5thsLNv, alle bis auf eine LNd und 4 DN1 fehlen, gab es hier wie

erwartet signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Jedoch konnte in den Versuchstieren auch signifikant öfter nur eine DN2 angefärbt werden.

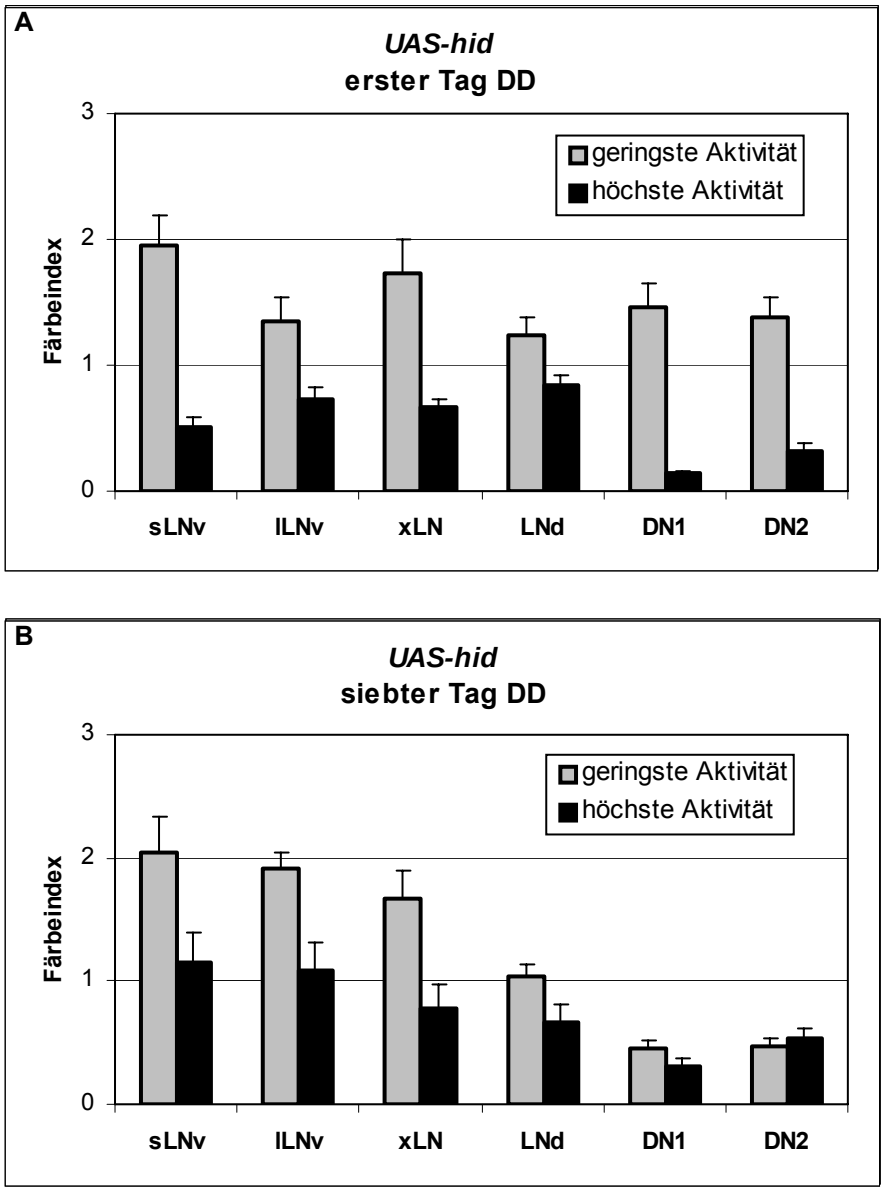


Abb. 41: Färbeindices der PER-gefärbten Uhrzellgruppen der *UAS-hid* Kontrolltiere im 1. Tag (A) und 7.Tag (B) des DD. Alle LN cyceln auch noch am 7. Tag im DD, während die DN anscheinend ausdämpfen.

Bis auf die DN1 hatten aber die Färbezeitpunkte und der Tag im DD an dem die Färbung vorgenommen wurde keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl.

Bei den DN1 waren zu dem Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität signifikant weniger Zellen gefärbt. Nach 7 Tagen im DD waren die DN1 insgesamt signifikant weniger gefärbt. Des Weiteren bestanden signifikante Wechselwirkungen zwischen

den Färbezeitpunkten und den Stämmen und zwischen den Färbezeitpunkten und an welchem Tag im DD die Fliegen präpariert wurden.

5.2.3. Untersuchung der Intensitätsunterschiede in den verschiedenen Zellgruppen

Da signifikante Unterschiede in den Zellzahlen beider Stämmen bestehen, können die Färbeindices bei den Vergleichen zwischen den Stämmen nicht herangezogen werden, da man nur bei angenommener gleicher Grundgesamtheit der Zellen diese verwenden darf. Somit bleibt nur die durchschnittliche Intensität für den Vergleich. Dieser Vergleich wurde in zwei grundsätzliche Gruppen aufgeteilt: einerseits die Zellgruppen, die in beiden Stämmen vollständig erhalten waren (sLNv, DN2) und die Zellgruppen, die teilweise ablatiert wurden (LNd, DN1).

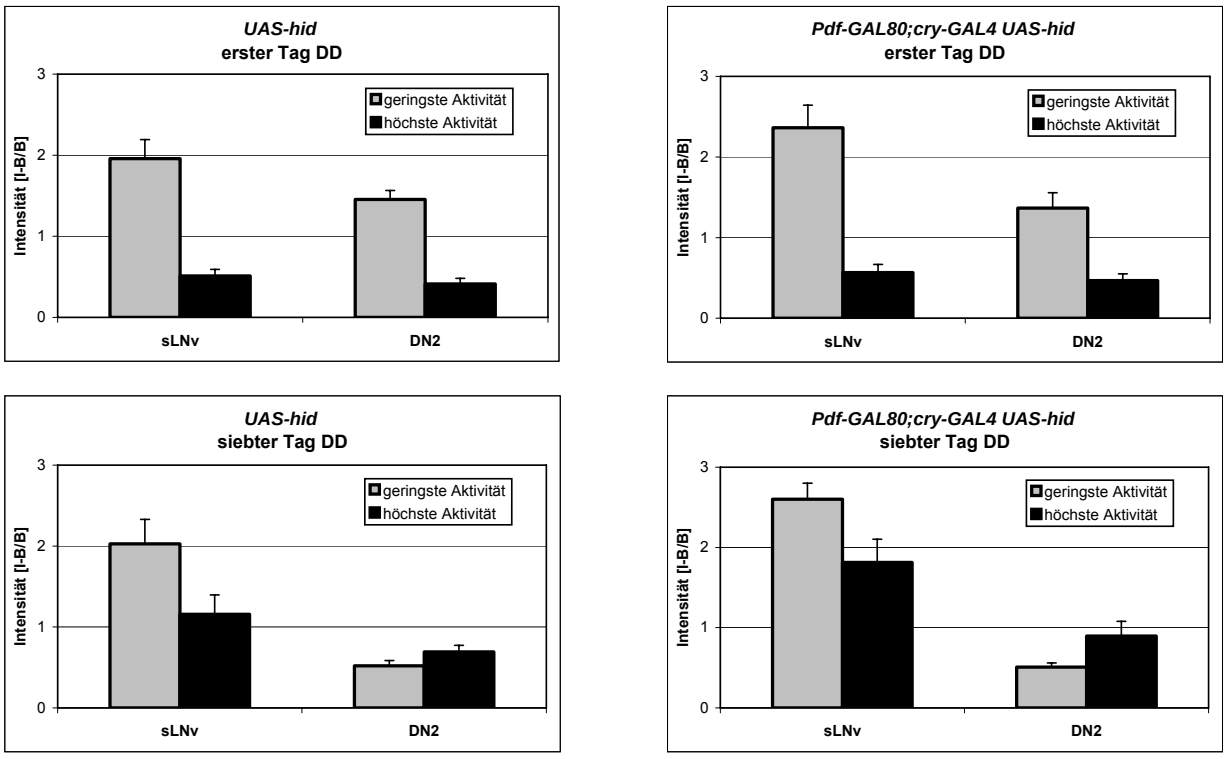


Abb. 42: Intensitätsunterschiede zwischen den Kontrolltieren *UAS-hid* und den Versuchstieren *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* in den sLNv und den DN2, die durch die Ablation unberührt bleiben sollten. Grau: Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität in den Kontrollen; Schwarz: Zeitpunkt der höchsten lokomotorischen Aktivität in den Kontrollen; Oben: 1. Tag im DD; Unten: 7. Tag im DD

A) Zellen, die in beiden Stämmen vollständig erhalten waren

Bei den DN2 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen und auch keine Wechselwirkung zwischen Färbezeitpunkt und Stamm, jedoch waren die Färbezeitpunkte jeweils signifikant voneinander unterschiedlich.

Auf die sLNv traf am ersten Tag im DD dasselbe zu, wie auf die DN2. Am siebten Tag im DD jedoch gab es durch die höhere Intensität in den Versuchstieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Aber auch hier war keine Wechselwirkung zwischen Stämmen und Färbezeitpunkt gegeben, d.h. beide Stämme reagierten gleich, nur war in den Kontrolltieren weniger PER (siehe auch Abb. 42).

Um genauere Schlüsse ziehen zu können, wurde bei den sLNv zusätzlich die Lokalisation von PER untersucht. Abb. 43 zeigt die Ergebnisse dieser Bewertungen. Die statistischen Berechnungen zeigten, dass in der Tat zwischen den beiden Stämmen Unterschiede bestehen. Die Lokalisation von PER zu den Färbezeitpunkten war in den Kontrolltieren sowohl am 1. als auch am 7.Tag im DD statistisch voneinander unterschiedlich. Im Gegensatz dazu war dies bei den Versuchstieren nur am 1. Tag im DD der Fall. PER bleibt hier mehr im Kern als zwischen Kern und Zytoplasma zu wechseln.

B) Zellen, die in den Versuchstieren teilweise ablatiert wurden

Bei den LNd zeigte sich bei beiden Testtagen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Die Kontrolltiere waren jeweils intensiver gefärbt als die Versuchstiere. Am 1. Tag im DD offenbarten beide Stämme einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Färbezeitpunkten, d.h. die Zellen hatten unterschiedliche PER-Level. Dieser war zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität höher als zu jenem Zeitpunkt, wenn die Fliegen am meisten umherlaufen. Am 7.Tag im DD existierte dieser Unterschied nicht mehr. Es ließ sich keinerlei Wechselwirkung zwischen den Stämmen und den Zeitpunkten feststellen, was bedeutete, dass die LNd im Freilauf in beiden Stämmen gleich reagieren. (Abb. 44)

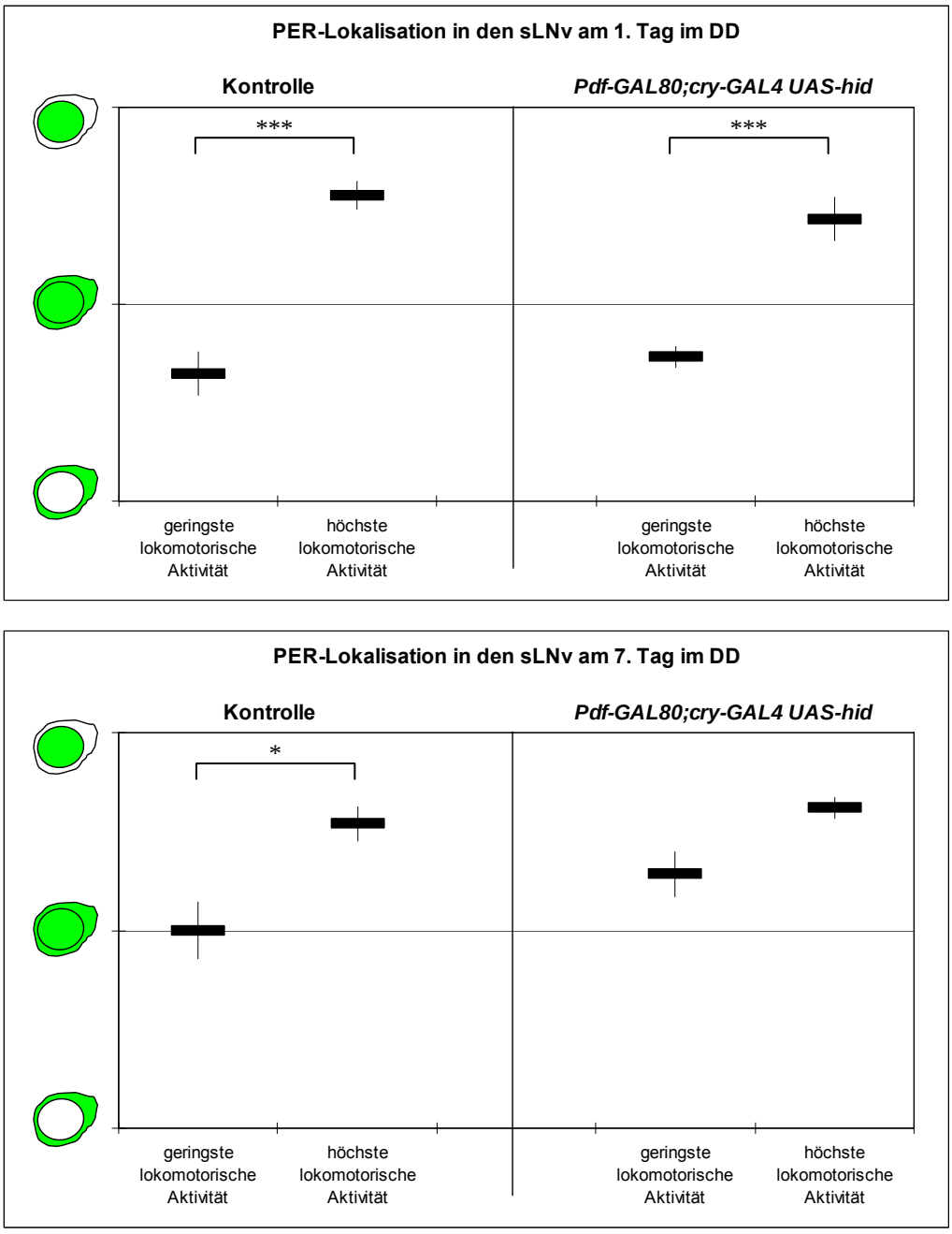


Abb. 43: PER Lokalisation in den sLNv am 1. und 7. Tag im DD in den Versuchstieren und den Kontrolltieren. Während die Kontrolltiere *UAS-hid* auch im 7. Tag im DD noch signifikante Wanderungen von PER aus dem Zytoplasma in den Kern und umgekehrt vermuten lässt, bleibt in den Versuchstieren in den beiden präparierten Zeitpunkten PER eher im Kern. Asteriske zeigen signifikante Unterschiede (★: p≤0,05 ★★★: p≤0,001)

Auch die DN1 waren in beiden Stämmen signifikant unterschiedlich intensiv gefärbt: Die DN1 der Kontrollfliegen besaßen mehr PER als die der Versuchstiere. Da auch der PER-Gehalt der DN1 periodisch wechselte, war insgesamt zu den 2 verschiedenen Färbezeitpunkten ein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 44).

Es ließ sich auch zum ersten Mal eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Stämmen und den Zeitpunkten finden, was bedeutete, dass die PER-Menge der DN1 in den Kontrolltieren am 1. Tag im DD einen anderen Verlauf hat als in den Versuchstieren.

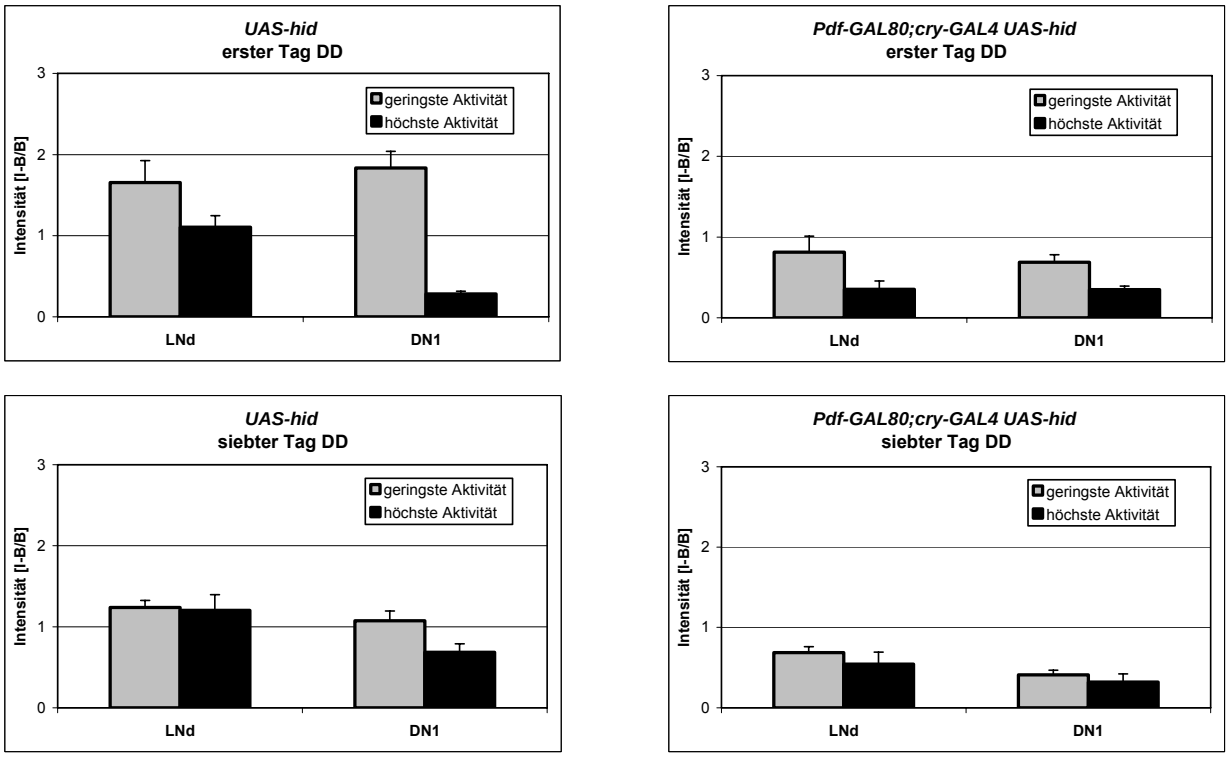


Abb. 44: Intensitätsunterschiede zwischen den Kontrolltieren *UAS-hid* und den Versuchstieren *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* in den LNd und den DN1.Von den LND existiert nach der Ablation nur noch eine Zelle, die DN1 haben 4 Zellen weniger. Grau: Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität in den Kontrollen; Schwarz: Zeitpunkt der höchsten lokomotorischen Aktivität in den Kontrollen; Oben: 1. Tag im DD; Unten: 7. Tag im DD

Dieser Unterschied basierte auf der Tatsache, dass bei den Kontrolltieren ein hochsignifikanter Unterschied in der Intensität zwischen dem Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität und dem Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität bestand, während dies bei den Versuchstieren trotz einer Tendenz in diese Richtung nicht der Fall war. Am siebten Tag im DD war diese Wechselwirkung jedoch nicht mehr vorhanden. Die Stämme waren zwar noch signifikant unterschiedlich intensiv gefärbt und auch das Cycling in den Zellen konnte noch nachgewiesen werden, jedoch reagierten jetzt wieder beide Stämme zu beiden Zeitpunkten gleich.

Diskussion

1. Western Blot Analyse von *y w* und *y w; ;Pdf*^{01}

In der Literatur wurde von Petri und Stengl (2001) postuliert, dass PDF auf die innere Uhr zurückwirkt und diese über die Einwirkung auf die Phosphorylierung von PER beeinflusst. Um diese Hypothese, die für Schaben aufgestellt wurde, bei *Drosophila* zu testen, wurden Western Blots von *y w* und *y w; ;pdf*^{01} durchgeführt, und dann auf die Period-Menge über den Tag verteilt untersucht. Mit dem Oddyssey Infrared Imaging System war es außerdem möglich zwei Phosphorylierungsbanden zu determinieren, die sich in ihrem Molekulargewicht unterschieden und deshalb aufzutrennen waren. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den pdf0 Fliegen im Verlauf der Kurven der Phosphorylierungsbanden über den Tag. Jedoch kann per Auge eine Tendenz dazu gesehen werden, dass die pdf0 Fliegen im Vergleich zur Kontrolle früher einen PER-Anstieg in der niedrig phosphorylierten Bande zeigen und später mehr PER in der höher phosphorylierten Bande haben. Diese leichten Abweichungen führen wahrscheinlich zu dem signifikanten Unterschied in der Menge an PER in *y w; ;Pdf*^{01}. Mehr Per in *Pdf0* Fliegen würde für einen Eingriff von PDF in die Phosphorylierung von PER sprechen, denn Per wird durch Doubletime phosphoryliert und ist dann dem Abbau preisgegeben (Übersicht siehe Edery, 2000). Allerdings ist der Kurvenverlauf statistisch nicht unterschiedlich, was damit zusammen hängen könnte, dass es sich um Untersuchungen im normalen LD handelt. Würde man dieselben Versuche nach ein paar Tagen Dauerdunkel wiederholen, so könnten sich durchaus ein Unterschied ergeben, jedoch ist dies ein schwieriges ja fast unmögliches Unterfangen, da jedes Tier eine individuelle Periodenlänge hat, die dann berücksichtigt werden müsste, d.h. die Tiere aufzeichnen und zum richtigen Punkt absammeln. Bei einer Wiederholung des hier diskutierten Experiments mit 25 Tieren pro Zeitpunkt und Stamm (12 Zeitpunkte und 3 Wiederholungen) wären hierfür insgesamt mindestens 1800 Tiere notwendig (backups nicht eingerechnet). Und selbst dann wäre ein schlüssiges

Ergebnis unsicher, da leider sehr viel mehr Augenzellen PER enthalten als Uhrzellen, das bedeutet, die Ergebnisse spiegeln immer den Zustand der Augen wieder, nicht den des circadianen Systems und wenn PDF die Augenzellen nicht beeinflusst, ist wahrscheinlich kein Effekt auf dem Western Blot zu sehen. Western Blots mit augenlosen Fliegen könnten hier möglicherweise Aufschluss geben, jedoch müssten dann mehr Versuchstiere pro Zeitpunkt gesammelt werden, da ja dann weniger PER vorhanden ist und außerdem muss bei der Interpretation auf die verlängerte Periodenlänge von *so*^{01} Rücksicht genommen werden. Genau um diese verlängerte Periodenlänge von *sine oculis* ging es im nächsten Versuch, der darauf abzielte, ob diese Verlängerung auf PDF zurückzuführen ist, oder nicht.

2. Laufaktivität von *so*^{01}

so hat verkleinerte optische Loben (Fischbach, 1983). Wohl auch durch diese Verkleinerung und dem damit verbundenen Platzmangel, ziehen Fasern der lLNv vermehrt in den hinteren optischen Trakt und von dort aus unüblicherweise entlang der Fasern der sLN$_v$ auch ins dorsale Protocerebrum (Helfrich-Förster und Homberg, 1993).

Die Periodenlänge von *so*^{01} ist länger als 24 h (Helfrich, 1986). Ob wie bereits erwähnt diese Verlängerung mit der zusätzlichen Menge an PDF in akzessorischen Medulla und im dorsalen Gehirn von *Drosophila* zusammenhängt, sollte dieser Versuch klären.

Zuerst wurde analysiert, inwiefern potentielle Augenreste die Periodenlänge beeinflussen. Da aber selbst große Augenreste keinen signifikanten Effekt auf die Periodenlänge haben, mussten die Versuchstiere nicht auf jedes Restommatidium unterm Mikroskop untersucht werden, sondern konnten mit einem Binokular aussortiert werden.

Warum die Augen keinen Effekt auf die Periodenlänge haben, kann möglicherweise mit einer fehlenden funktionstüchtigen Verschaltung der Restaugen zum Gehirn zusammenhängen. Sollte das nicht der Fall sein, so tragen die Komplexaugen eventuell einfach nicht zur Periodenlänge bei.

Die Arhythmie-Ergebnisse der Doppelmutante *so*^{01}*;Pdf*^{01}, bei der ja ähnlich wie bei

y w; ;Pdf^{01} über ein Viertel der Fliegen nach einer gewissen Zeit arhythmisch werden, sprechen dafür, dass normalerweise PDF auf die Uhr zurückwirkt, denn sie zeigen einmal mehr (Renn et al., 1999), dass der Verlust der rhythmischen lokomotorischen Aktivität erst nach gewisser Zeit auftritt. Damit ist klar, dass die Informationsübertragung im circadianen Netzwerk noch funktioniert und nur der Rhythmus selbst nach und nach seinen Takt verliert. Ob diese Arhythmie allerdings durch eine Desynchronisation der verschiedenen Schrittmacher zustande kommt oder tatsächlich die Uhr still steht, ist hier in diesem Versuch nicht zu ersehen.

Die lange Periodenlänge von *so*-Fliegen ist eindeutig auf die *so* Mutation zurückzuführen, denn die Fliegen aus den Kreuzungen mit den Defizienzstämmen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Periodenlänge.

Da die Doppelmutante *so;pdf*^{01} eine ähnlich kurze Periodenlänge hat wie *y w; ;Pdf*^{01}, kann außerdem davon ausgegangen werden, dass PDF für die Verzögerung der inneren Uhr verantwortlich ist. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass die lLNv keinen offensichtlichen Rhythmus in der PDF-Abgabe haben. Dies könnte bedeuten, dass im Falle von *so*^{01} mehr PDF als gewöhnlich konstitutiv von den lLNv abgegeben wird. Auf diese Weise könnte ein fortwährend stärkeres PDF-Signal entstehen, welches die innere Uhr ständig verlangsamt und *so*^{01} zu einer langen Periode führt. Laut Hyun et al. (2005) und Mertens et al. (2005) liegen im dorsalen Gehirn einige Neuronen welche den pdf-Rezeptor exprimieren. Teilweise sind diese Neuronen Uhrzellen, wie beispielsweise die DN1a, welche mit ihren Verzweigungen lichtmikroskopisch gesehen mit den Verzeigungen der sLN_v überlappen und so möglicherweise direkte Verbindungen zu den pdf-Zellen haben (Förster et al., 2007). Neuere Ergebnisse von Shafer et al (2008) haben aber gezeigt, dass nicht, wie bisher angenommen (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005; Mertens et al., 2005) die lLNv den PDF-Rezeptor besitzen und die sLNv nicht, sondern im Gegenteil die sLNv auf pdf mit einer Erhöhung des zyklischen AMP reagieren (= Konsequenz der Bindung von PDF an den Rezeptor) und die lLNv nicht. Somit gibt es zwei mögliche Orte im Gehirn von *Drosophila*, wo der beobachtete Effekt seinen Ursprung haben könnte: Einmal die Terminalen im Gehirn, deren nachgeschaltete Zellen das stärkere PDF-Signal empfangen, oder die akzessorische Medulla, wo die lLNv auf die sLNv verschalten und damit das erhöhte PDF seine Wirkung stärker entfalten kann. Diese Möglichkeiten konnten mit dem vorliegenden Versuch nicht auseinanderdividiert werden, jedoch stand dieses Experiment in Zusammenhang mit einigen anderen

Versuchen, deren Ergebnisse in Wuelbeck et al. (2008, submitted) zusammengefasst und diskutiert wurden. Die Versuche von Wülbeck et al. zeigen, dass der Effekt der längeren Periodenlänge nicht im dorsalen Protocerebrum entstehen kann, da im Falle einer signifikant höheren PDF-Ausschüttung nahe der sLNv Terminalen komplexe Rhythmen entstehen die aus 2 Komponenten bestehen, eine kürzere und eine längere (Helfrich-Förster et al., 2000). Die Periodenlänge der kürzeren Komponente hängt direkt von der Anzahl der Varikositäten im dorsalen Protocerebrum ab. Bei so1, welches nicht signifikant mehr PDF im dorsalen Protocerebrum hat, entstehen allerdings keine komplexen Rhythmen, weshalb von der Theorie der Entstehung der langen Periodenlänge im dorsalen Gehirn abgesehen werden sollte. Wülbeck et al (2008) konnten zudem in PDF-Färbungen nachweisen, dass die Intensität der Färbung in der akzessorischen Medulla bei Wildtyp Fliegen signifikant geringer ist als bei so-Fliegen. Danach sind die Dendriten der sLNv in der akzessorischen Medulla diejenigen, die von den lLNv die vermehrte PDF Information über den PDF-Rezeptor erhalten und deshalb entsteht die lange Periodenlänge. Somit wurden im Folgenden Experimente durchgeführt, in denen die Signalübertragung der Uhrneuronen (mit speziellem Fokus auf den PDF-Neuronen) gestört war.

3. Expression des thermosensitiven Allels *shibire*^{ts1} in diversen Untergruppen der Uhrneuronen

Dynamin ist für die Abschnürung der Vesikel in das Zellinnere wichtig. Blockiert man mit Hilfe des *Gal4/UAS* Systems diesen Vorgang mit dem mutierten *Drosophila* Dynamin *shibire*^{ts1}, so muss man sich darüber im Klaren sein, welche Vorgänge in der Zelle damit beeinflusst sind: Zuerst ist hier der Reuptake von Transmittern aus dem synaptischen Spalt zu nennen, dann die postsynaptische, Rezeptor gesteuerte Endozytose von Neuropeptiden und schließlich endocytotische Vorgänge in Gliazellen auch betroffen. Awasaki und Ito (2004) konnten nämlich zeigen, dass mit Shibire blockierte Endocytose in Gliazellen auf die Entwicklung der Fliege Einfluss

nimmt. Während des frühen Puppenstadiums, kurz vor Beginn der Axondegeneration, verschwinden simultan Cluster von benachbarten Varikositäten, die je zu verschiedenen Neuronen gehören. Glia sind in diesen Prozess mit eingebunden, indem sie die Vrikositäten umschließen. Wird den Gliazellen die Möglichkeit zur Endocytose genommen (über Shibire) so wird dieses Umschließen und damit der Abbau der Varikositäten gehemmt, was das notwendige Ausdünnen der Axone und ihrer Kontakte in der Entwicklung von *Drosophila* schwerwiegend verzögert. Somit ist bewiesen, dass die Gliazellen Endocytose betreiben, die von Shibire abhängig ist. Da PDF ein Neuropeptid ist, war in diesem Versuch vor allem die Rezeptor gesteuerte Endozytose von Belang. Zunächst mussten allerdings vor dem eigentlichen Versuch die Expressionsmuster der einzelnen *Gal4* Linien untersucht werden, um hinterher Aussagen über die Effekte von Shibire tätigen zu können.

3.1. Expressionsmuster der verwendeten *GAL4* – Linien

Die verschiedenen *GAL4* – Linien sind ideal geeignet die einzelnen Uhrneuronengruppen getrennt voneinander anzusteuern. *R6-GAL4* treibt zwar nicht nur in den sLNv, sondern zum Teil auch in den Tracheen (Helfrich-Förster et al., 2007); dies war jedoch für die folgenden Versuche, die ja mit der synaptischen Übertragung interferieren, irrelevant. So konnte ich mit *R6-GAL4* die sLNv anpeilen, mit *Pdf-GAL4* die sLNv und lLNv, was nach Vergleichen zu Aussagen über die Funktion der beiden Neuronencluster beitragen könnte. *cry-GAL4* treibt in allen LN-Gruppen, jedoch lässt sich ohne vergleichende PER-Färbungen leider nicht sagen, ob diese Treiberlinie in allen LNds treibt, oder nicht. Anderen Untersuchungen zufolge gibt es wohl mindestens eine LNd, die nicht von dem *cry*-Treiber erfasst wird (Helfrich-Förster, mündl. Mitteilung). Weiterhin exprimiert diese *cry-GAL4* Linie in vier DN1 und zwei DN3. Zwei der DN1 sind die DN1a, die Shafer et al 2006 beschrieben haben. Sie haben eine Verbindung zur akzessorischen Medulla (Helfrich-Förster et al., 2007). Insgesamt gesehen lassen sich hiermit Aussagen über die Funktion der LN treffen, jedoch muss immer die Einschränkung gelten, dass ein Teil der Effekte auch von den DN1a, DN1 oder DN3 stammen könnten und umgekehrt, dass sozusagen fehlende Effekte durch das Vorhandensein der einen LNd erklärt werden können.

In den *Pdf-Gal80;cry-Gal4* Fliegen wird die GAL4 Expression in den sLNv vollständig gehemmt. Trotz der Expression von GAL80 in den lLNv ist erstaunlicherweise trotzdem noch eine geringe GAL4 Menge vorhanden. möglicherweise ist hier die Menge an GAL80 nicht ausreichend, um jegliche GAL4 Bildung zu hemmen. Auch diese Linie exprimiert ebenso wie *cry-Gal4* in einer LNd kein GAL4 aber treibt in 4 DN1 und 2 DN3. Dies muss auch in diesem Fall für die Ergebnisse mit in Betracht gezogen werden.
Tim-GAL4 treibt in allen Uhrneuronen, einigen ektopischen Nervenzellen und zusätzlich in einer Menge Gliazellen. Da noch nicht vollständig bekannt ist, wie umfassend die Funktionen der Glia sind, können deshalb Ergebnisse mit *tim-GAL4* nur annähernd interpretiert werden.

3.2. Laufaktivität und Freilaufperiodenlänge von Fliegen mit mutiertem *Shibire* in verschiedenen Neuronen unter 18°C bzw. 28°C

Die Laufaktivität ist ein guter Anzeiger für den Zustand der Rhythmizität des Tieres. Es lässt sich einfach ablesen, ob die Uhr verlangsamt, beschleunigt, oder gar arhythmisch gemacht wurde. Wie im Ergebnisteil gezeigt, ist bis auf *tim-GAL4 UAS-shi^{ts1}* keiner der untersuchten Stämme stark in seiner Rhytmik beeinträchtigt worden. *Tim-GAL4; UAS-shi^{ts1}* Tiere hatten schon bei 18°C eine deutlich längere Periode als die Kontrollstämme und starben nach 1-3 Tagen bei 28°C. Dies ist möglicherweise auf die ektopischen Neuronen und/oder die Gliazellen zurückzuführen, in denen das shibire^{ts1} offensichtlich bereits bei 18°C eine Funktionsstörung hervorrief, die dann bei 28°C so verstärkt wurde, dass die Tiere nicht mehr lebensfähig waren.
Der einzige andere bemerkbare *shi^{ts1}*-Effekt trat bei *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* auf. Diese Tiere verlängerten ihre innere Periodenlänge um fast 2 Stunden. Diese markante Veränderung lässt darauf schließen, dass hier an den Synapsen der s- und/oder lLNv tatsächlich etwas geschehen ist. Die Veränderungen der anderen Stämme waren nicht signifikant. Da *R6-GAL4* keine Periodenverlängerung zeigte, scheint der Effekt bei *Pdf-GAL4* nicht auf die sLNv zurückführbar, sondern fußt auf einer Signalverzögerung über die lLNv. Laut Petri und Stengl et al. (2001) lösen PDF-Injektionen in die akzessorische Medulla bei *Leucophea madaerae* zu jeder Tageszeit Rhythmusverzögerungen aus. Auf demselben Weg könnte möglicherweise der Shibire Effekt über permanente Delays bei *Drosophila* wirken. Somit ist PDF ein

guter Kandidat für den Transmitter, über den der Verlängerungseffekt bei *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* läuft.

Bei *cry-GAL4* trat auch keine signifikante Veränderung ein, deshalb ist es möglich, dass die LNd oder die DN1a entgegen der lLNv wirken. Dieser Effekt würde auch bei *Pdf-GAL80;cry-GAL4* erklären, dass nichts geschieht, denn hier wird ja immer noch in den lLNv Shibire^{ts1} exprimiert. Welche Substanz für den möglichen, gegenläufigen Effekt der LNd verantwortlich ist kann zu diesem Zeitpunkt leider noch nicht gesagt werden, da deren Neurotransmitter bzw. Neuropeptide noch nicht bekannt sind. Bei den DN1a ist IPNamid ein möglicher Kandidat (Shafer et al., 2006), dessen Wirkungsweise allerdings noch überhaupt nicht erforscht ist und ich somit auch in diesem Fall keine Aussagen treffen kann.

Bei den vorliegenden Ergebnissen scheint es also so zu sein, dass die lLNv für die Verlängerung der Periode in *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* zuständig sind, und die LNd gemeinsam mit den DN als Gegenspieler der lLNv fungieren.

Leider passen hierzu allerdings nicht Ergebnisse anderer Untersuchungen: Da laut neuesten Ergebnissen von Shafer et al. (2008) die sLNv und nicht die lLNv den PDF-Rezeptor besitzen, ist zu vermuten, dass in der akzessorischen Medulla die lLNv circadiane Signale an die sLNv weitergeben. Dies widerspricht im Prinzip noch nicht dem gefunden Ergebnis, dass die lLNv für den genannten Effekt zuständig sind, denn sie könnten ja durch einen gestörten Transmitter Reuptake länger auf die sLNv signallisieren. Allerdings muss man hierzu folgendes beachten: Neuropeptide werden im Allgemeinen in den synaptischen Spalt abgegeben und dann nicht an der Präsynapse via Reuptake recycelt, sondern an der Postsynapse über Rezeptor gesteuerte Endozytose zum Abbau internalisiert (Nässel, 2002). Dies bedeutet, dass, wenn PDF für den oben genannten Verlängerungseffekt in *Pdf-GAL4* zuständig sein sollte, nur postsynaptische Strukturen in den hier angesteuerten Zellen beachtet werden dürfen. Da die lLNv keinen PDF-Rezeptor besitzen und die sLNv nur Dendriten in die akzessorische Medulla ausbilden (Helfrich Förster et al., 2007) kann ein PDF gesteuerter, periodenverlängernder Effekt in diesem Fall nur von den sLNv ausgehen. Ist in den sLNv nun die Endozytose blockiert und somit das Signalende verzögert, kann PDF an den Rezeptoren länger signalisieren. Warum konnte dann der Effekt von *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* nicht mit *R6-Gal4*, das ja nur in den sLNv treibt, wiederholt werden? Eine mögliche Erklärung lag in den Expressionsstärken der *GAL4* Linien.

3.3. Expressionsstärke der Treiberlinien

Sieht man sich dann die Gal4 Expression der einzelnen Treiberlinien bei den verschiedenen Temperaturen tatsächlich an, so muss man feststellen, dass die Stämme sehr unterschiedlich mit ihren Expressionsstärken auf die Temperaturen reagieren: Während *R6-GAL4*, *Pdf-GAL80;cry-GAL4* und *tim-GAL4* die Expression reduzieren, steigert *Pdf-Gal4* die Produktion von GAL4. *cry-GAL4* hingegen bleibt in seiner Expressionsstärke bei beiden Temperaturen mehr oder weniger gleich. Die beiden expressionsstärksten Linien sind *Pdf-GAL4* und *tim-GAL4*. Diese starken Treiber sind auch die Einzigen, bei denen sich Effekte von Shibire^{ts1} in der Laufaktivität zeigten. Dies deutet darauf hin, dass nur in ihnen so viel GAL4 und damit fehlerhaftes Shibire exprimiert wurde, dass es überhaupt erst zu Buche schlug. Somit muss leider davon ausgegangen werden, dass die Abwesenheit der Effekte bei den anderen Treibern nicht durch eine Aufhebung des lLNv-Effekts über die LNd oder DN1a verursacht wurde, sondern durch die Tatsache, dass eine zu geringe Menge an Shibire^{ts1} die Übertragung an den Synapsen nicht weiter beeinträchtigt. Dies muss in jedem Fall für kommende Experimente mit *shibire^{ts1}* in Betracht gezogen werden und steht in eindeutigem Gegensatz zu der landläufigen Meinung, GAL4 zeige bei höheren Temperaturen eine höhere Aktivität und damit würde das Gen des *UAS*-Responders stärker exprimiert (Duffy, 2002). Es kann durchaus sein, dass die GAL4 Aktivität mit höheren Temperaturen zunimmt. Es ist aber ebenso denkbar, dass die Promotoren, unter deren Kontrolle das GAL4 steht, temperaturbeeinflusst sind und im Normalfall zwar ihre Aktivität mit höherer Temperatur steigern, jedoch ist eben die circadiane Uhr von *Drosophila* temperaturkompensiert, ja sogar überkompensiert. Als rein spekulative aber dennoch mögliche Erklärung der Expressionsabnahme steht deshalb eine ebenso überkompensierte und somit temperaturabhängige Aktivität der Promotoren der verwendeten *GAL4* Linien im Raum. Als Ausnahme in dem hier vorliegenden Fall reagiert nur *Pdf-GAL4* so wie es die Literaturmeinung wiedergibt. Als Schlussfolgerung ist es für alle folgenden Auswertungen deshalb durchaus angebracht, nur auf *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* einzugehen. Eine weitere Fragestellung, die sich allerdings zusätzlich aus diesen Ergebnissen ziehen lässt, ist: Ist PDF temperaturkompensiert? Unerwarteter Weise ergaben die Ergebnisse des folgenden Versuches hierzu genaueren Aufschluss.

3.4. Einfluss von Shibire^{ts1} auf das PDF-cycling in den Terminalen der sLNv

Dass PDF in den Terminalen der sLNv zyklisch zu- und abnimmt, ist, wie erwähnt, schon länger bekannt (Park et al., 2000).
Dieses cyceln kann man sich zunutze machen, um den Zustand der jeweiligen inneren Uhr verschiedener Stämme vergleichen zu können, denn wie Park et al. zeigten, erschien der PDF-Peak der kurzperiodischen per^{s} Mutante früher als der des Wildtyp.
Die verschiedenen Zeitpunkte rund um das erwartete PDF-Maximum sollten also eine Möglichkeit darstellen, den Einfluß von Shibire auf die innere Uhr während des LD anzuzeigen.
Wie in dem Ergebnisteil erwähnt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren im Verlauf der Kurven festgestellt werden, was bedeutet, dass eine verlängerte Wirkungsdauer von PDF im synaptischen Spalt keine Auswirkung auf die innere Uhr im LD hat, denn sonst hätten sich die Kurvenverläufe in der höheren Temperatur unterscheiden müssen.
Allerdings hat die Temperatur an sich einen signifikanten Effekt auf die rhythmische Anwesenheit von PDF in den Terminalen der sLNv. Dieser interessante Aspekt bedarf in Zukunft noch genauerer Untersuchung, soll aber hier schon einmal diskutiert werden. Da *y w;Pdf-GAL4* - Fliegen, welche als Kontrolle dienten, keinerlei Verhaltensauffälligkeiten zeigten und somit wildtypisch anmuteten, war es vertretbar, sie mit den Wildtypdaten von Park et al. zu vergleichen. Zur Verdeutlichung habe ich die Kurven der Kontrolltiere mit der Wildtypkurve von Park et al. gemeinsam in Abb. 45 dargestellt. Die Experimente von Park et al wurden bei 25°C durchgeführt (persönliche Mitteilung Förster, 2006). Die Maxima der einzelnen Kurven sind mit Pfeilen unterhalb der Grafiken verdeutlicht.
Der erwähnte Effekt der Temperatur ist deutlich zu sehen. Je höher die Temperatur, desto früher das PDF-Maximum in den sLNv Terminalen. Genauer gesagt, liegt es bei 18°C bei ZT5, bei 25°C bei ZT3 und bei 28°C zwischen ZT1 und ZT3, also ungefähr bei ZT2. Dies ergibt pro 3,5°C eine Vorverschiebung der Maximalphase um ca. 1h. Diese Korrelation besagt, dass sich die Phasenbeziehung des PDF-cycling zum Licht Dunkelwechsel je nach Temperatur verändert. Diese Veränderung steht in krassem Gegensatz zur ansonsten temperaturkonstanten inneren Uhr.

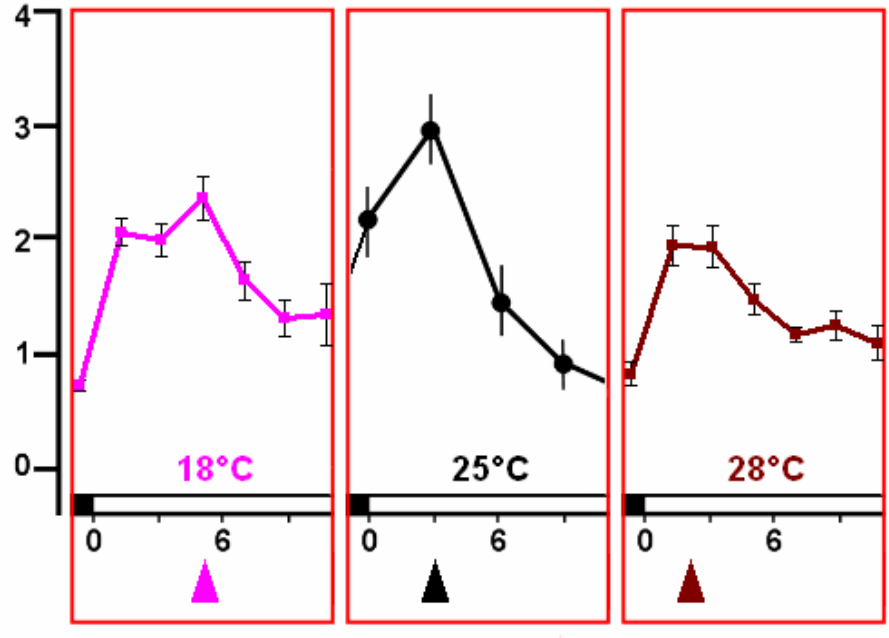


Abb. 45: Vergleich der pdf-Färbungen der sLNv Terminalen bei 18°C 25°C und 28°C. Die 25°C Daten sind Park et al. (2000) entnommen. Die Pfeile geben das wahrscheinliche Färbemaximum an.

Zusätzlich ist es ein weiterer Hinweis darauf, dass das Cycling von PDF in den Terminalen nicht temperaturkompensiert ist und auf diese Weise vielleicht der inneren Uhr als Stellgröße bzw. Anzeiger für die richtige Positionierung der Aktivität in höheren Temperaturen dient, doch dazu später mehr. Zuerst sollte noch der durchschnittliche Aktivitätsverlauf über den Tag auf shibire Effekte untersucht werden.

3.5. Einfluß von Shibire ^{ts1} auf das durchschnittliche Tagesaktivitätsmuster

Da shibire^{ts1} im LD auf das PDF-cycling in den Terminalen der sLNv keinen Einfluss hat, war nicht zu erwarten, dass die Durchschnittstage im LD groß beeinflusst werden. *Pdf-GAL4 UAS-shi^{ts1}* zeigt im LD einen fast identischen Kurvenverlauf wie *Pdf-GAL4*, und dies sowohl bei 18° als auch bei 28°C. Also kann Shi^{ts1} hier keinen Einfluss ausüben. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von *Pdf-GAL4* und den Versuchstieren ist die Tatsache, dass die Peaks bei der höheren Temperatur weiter voneinander entfernt sind als bei 18°C.

Dies ist ein bekannter Effekt, den Majercak et al 1999 bereits beschrieben haben (Abb. 46). Bei meinen Versuchstieren im DD ist ein deutlicher Unterschied zu den Kontrolltieren zu sehen: Sie haben immer ein eindeutig bimodales Aktivitätsmuster

mit klarem Morgenpeak, was nicht der Normalität entspricht (vgl. Majercak et al 1999). Da dieser Effekt schon bei 18°C auftritt kann man davon ausgehen, dass nicht Shi^{tsl} dafür verantwortlich zeichnet, sondern Hintergrundeffekte der Kreuzung eine Rolle spielen. Die Reaktion auf die höhere Temperatur ist aber normal: Die Maxima der Aktivität entfernen sich voneinander.

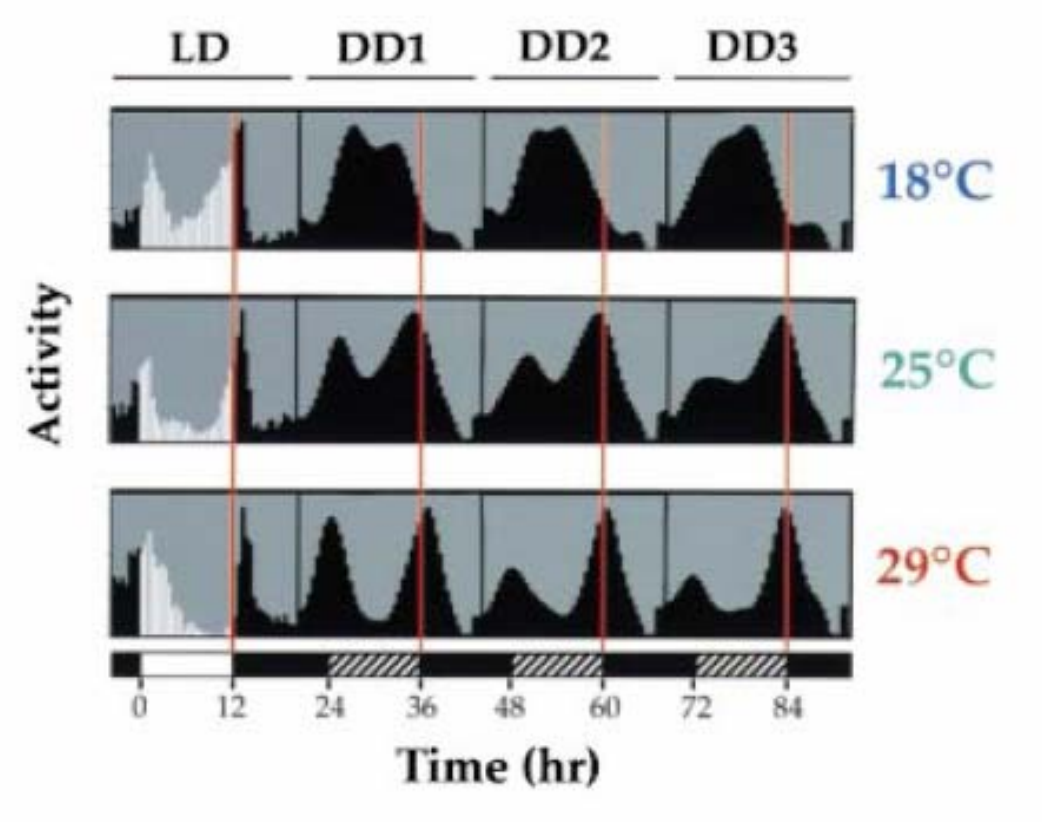


Abb. 46: Majercak et al 1999. Diese Grafik verdeutlicht, dass die Aktivitätspeaks von *Drosophila* normalerweise je nach Temperatur im DD näher zusammen sind oder auseinander driften.

Pdf-GAL4 hat im DD bei 18°C entweder nur einen Aktivitätspeak oder beide Peaks sind ineinander verschmolzen. Für letzteres spricht die Schiefe des Peaks nach vorne hinaus. Bei 28° ist dann deutlich eine Morgenpeak-Schulter zu sehen. Die Entfernung der Peaks voneinander ist bei pdf-gal4 deutlicher und größer als bei den anderen Stämmen. Möglicherweise sind auch hier Hintergrundeffekte verantwortlich. Schlussendlich muss man zu der Auffassung kommen, dass ein längeres PDF-Signal in der akzessorischen Medulla keine Auswirkungen auf die Aktivitätsverteilung über den Tag hat.

Bleibt jedoch erneut die Frage, ob PDF in den Terminalen der sLNv bei Temperaturunterschieden mit für Peakverschiebungen verantwortlich ist?

3.6. Vergleich der Durchschnittstage von *CS* und *y w; ;Pdf^{01}* bei 18°C und 28°C

Laut Rieger et al. (2006), liegt in den sLNv der Oszillator, der im Dualen Oszillator System zumindest teilweise für den Morgenpeak als auch den Abendpeak verantwortlich ist. Verschiebt sich das pdf-Maximum bei höherer Temperatur in den Terminalen der sLnv nach vorne, könnte dies die Vorverschiebung des Morgenpeaks zur Folge haben. Sollte bei *Pdf^{0}*–Fliegen die Vorverschiebung nicht mehr oder nur in geringem Maße vorhanden sein, spräche es für diese These. Leider waren für diese Auswertung nur zu wenige Tiere vorhanden um ein statistisch fundiertes Ergebnis zu präsentieren. Dieser Versuch sollte noch einmal mit demselben Versuchsaufbau überprüft werden.

Zunächst musste dafür aber erst einmal überprüft werden, welche Eigenschaften die Aktivitätspeaks von *Pdf^{0}* haben: Die an den Einzeldurchschnittstagen bestimmten und später gemittelten Aktivitätsmaxima zeigen zunächst bereits bekanntes: *y w; ;Pdf^{01}* hat im LD im Gegensatz zu *CS* einen in seiner Akrophase verfrühten Abendpeak (Renn et al., 1999). Diese Vorverschiebung ist bei 18°C im Morgenpeak möglicherweise vorhanden aber durch die geringe Anzahl der Tiere hier statistisch nicht nachvollziehbar. Diese Beobachtung jedoch zeigt bereits, inwiefern die Aussage, dass *y w; ;Pdf^{01}* keinen Morgenpeak mehr besitze (Stoleru et al., 2004) zutrifft: In meinem Versuch ist bei 18°C im LD der Morgenpeak zwar recht klein, jedoch eindeutig vorhanden und nicht nur eine Reaktion auf Licht$_{an}$, denn für eine reine Schreckreaktion ist der Peak fast zu spät. Bei 28°C im LD ist der Morgenpeak dann sogar sehr deutlich und nicht zu übersehen. Die Diskrepanz meiner Ergebnisse zur Literatur könnte an der unterschiedlichen Auswertungsweise liegen. In der in dieser Arbeit angewandten Methode der Durchschnittstagsberechnung wird der Tag in 360 4-Minuten-Intervalle geteilt, während bei den meisten anderen Auswertmethoden der Durchschnittstag 48 Halbstunden-Werte hat. Auf diese Weise gehen wichtige Nuancen, wie beispielsweise der schnelle überschießende Licht$_{an}$-Effekt, der dann nach kürzester Zeit in einen Morgenpeak übergeht, verloren. Licht$_{an}$-Reaktion und Morgenpeak verschmelzen zu einem Peak, der dann fälschlicherweise für eine reine Schreckreaktion auf Licht gehalten wird. Nun da geklärt war, dass Fliegen auch ohne PDF einen Morgenpeak besitzen, konnte die These, dass PDF an dem Auseinanderdriften der Peaks bei höheren Temperaturen mit verantwortlich ist, angegangen werden.

Doch leider konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob PDF tatsächlich etwas mit dieser Peakverschiebung zu tun hat, denn *y w; ;Pdf*^{01} zeigte erstaunlicherweise in diesem Versuch 3 Aktivitätspeaks bei 28°C was eine Bewertung der Entfernung der Peaks unmöglich macht, aber neue Fragen in Bezug auf PDF als Kopplungsfaktor aufwarf. Abb. 47 zeigt eine solche *y w; ;Pdf*^{01} Fliege.

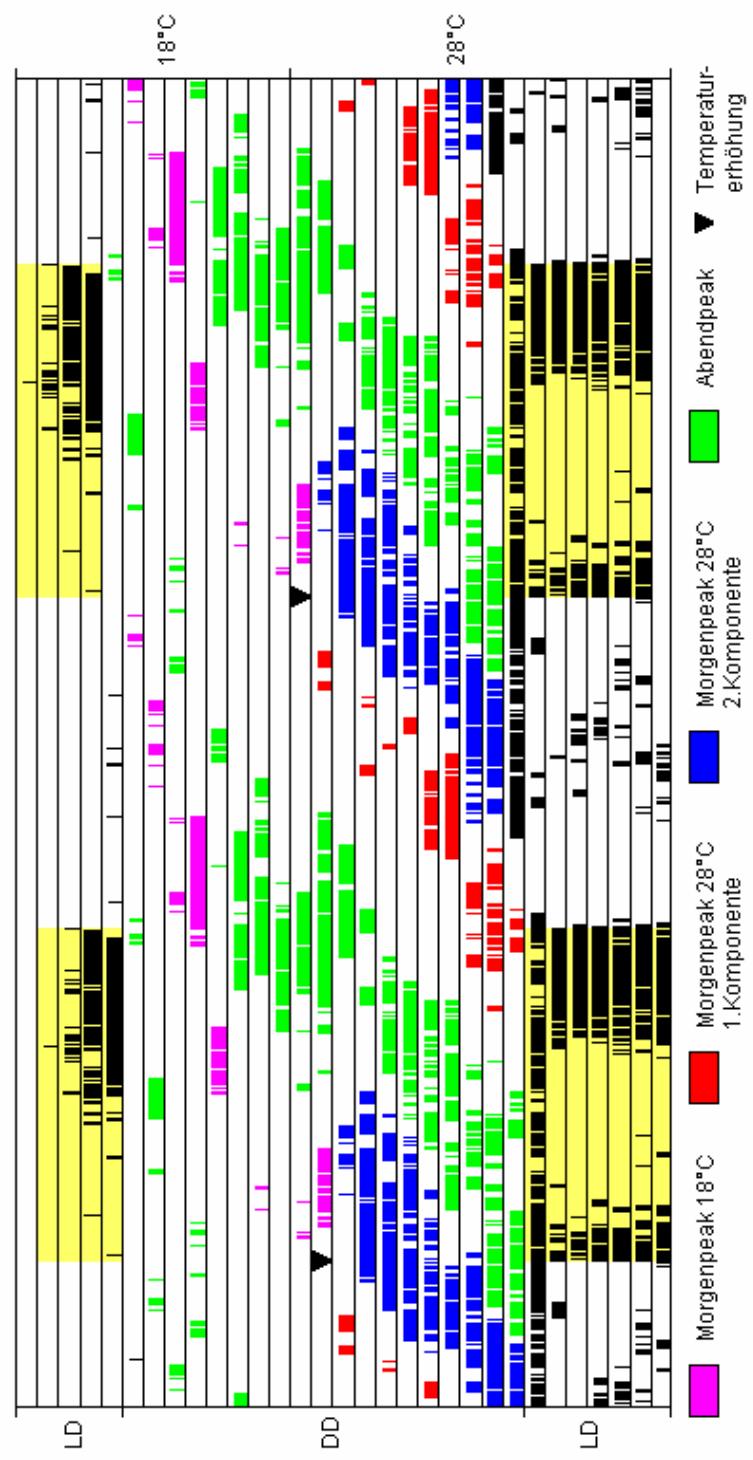


Abb. 47: Aktogramm einer *y w; ;Pdf*^{01} Fliege. Die Einfärbungen sollen verdeutlichen, welche Aktivität bei28°C ursprünglich aus welcher Aktivität bei 18°C hervorgeht. Gelb: Lichtphase im LD; Grün: subjektive Abendliche Aktivität; Pink: subjektive Morgenaktivität bei 18°C; Rot und Blau: 2 Komponenten der subjektiven Morgenaktivität bei 28°C

Hier wurde das Aktogramm im DD so eingefärbt, dass die verschiedenen Aktivitätsschwalle voneinander zu unterscheiden sind: Erst zeigt die Fliege aufgrund der Erhöhung der Temperatur insgesamt eine Verbreiterung der Aktivität, wobei 2 der nun 3 Peaks einen Shift nach hinten ausführen, während der vordere Teil der Aktivität sich weiter nach vorne verschiebt. Bei keiner anderen Fliege war es möglich die Aktivität so klar in 3 Komponenten aufzuteilen, jedoch zeigten die geglätteten Kurven alle deutlich 3 Aktivitätsmaxima.

Eine definitive Aussage, woher der 3.Peak stammt, ist nicht möglich. Trotzdem sprechen die ersten Ergebnisse dafür, dass er einen Teil der ursprünglich morgendlichen Aktivität darstellt, wenn man die durchschnittlichen Akrophasen der Peaks zu Rate zieht. Hier zeigt sich nämlich, dass die Standardfehler des Morgens- und des Nachtpeaks von *y w; ;Pdf*^{01} bei 28°C überschneiden, die vom Abendpeak aber nicht. Das heißt, dass dieser Nachtpeak durchschnittlich näher am Morgenpeak als am Abendpeak liegt. Da bei den 6 *CS* Fliegen im 28°C – DD eben nur ein Morgenpeak sichtbar ist, könnte dies darauf deuten, dass diese 2 Komponenten anscheinend aneinander gekoppelt sind. In der circadianen Forschungswelt herrscht die allgemeine Überzeugung, PDF sei neben seiner Output - Funktion auch ein Kopplungsfaktor. Also könnten die beiden Komponenten zumindest teilweise über PDF gekoppelt werden und bei einem Fehlen von PDF in höheren Temperaturen diese Kopplung verlieren. Dies bedeutet aber zusätzlich, dass ein noch unbekannter Transmitter in niedrigen Temperaturen die Kopplung übernehmen muss, denn bei 18°C und 20°C existiert kein Nachtpeak.

Man könnte spekulieren, dass die sLNv über die dorsalen Terminalen per PDF diese Kopplung steuern, denn im *shibire* Versuch zeigte zusätzliches PDF in der akzessorischen Medulla keinen gegensätzlichen Effekt (eine teilweise Verschiebung des Morgenpeaks nach hinten). PER-Färbungen im 28°C DD zu verschiedenen Zeitpunkten in *Pdf*^{0} Fliegen könnten über sLNv Folgezellen, die als Empfänger dieser Information in Frage kämen, Aufschluss geben. Im genaueren Fokus sollten dabei die DN1a liegen, die auch durch ihren PDF-Rezeptor (Mertens et al., 2005; Hyun et al., 2005) gute Kandidaten für diese Aufgabe wären.

Letztliches Fazit aus diesem Versuch ist, dass leider keine genauen Ergebnisse vorliegen, die eine Funktion von PDF im Auseinanderdriften der Peaks bei hohen Temperaturen belegen würden. Allerdings wurde festgestellt, dass PDF wahrscheinlich Einzelkomponenten der morgendlichen Aktivität aneinander koppelt.

3.7. Abschließende Bemerkungen über die Verwendung von *shibire*^{ts1}

Wenn man *shibire*^{ts1} als Tool verwenden will, muss man sich vorher über die Expressionsstärke des gewünschten Treibers informieren. Dies genügt allerdings nicht nur bei Zimmertemperatur, sondern muss unbedingt auch bei den höheren Temperaturen durchgeführt werden, bei denen dann das thermosensititve *shibire* Allel nicht mehr als GTPase funktioniert. In meinen Versuchen war deutlich festzustellen, dass verschiedene Treiber unterschiedlich auf Temperaturerhöhungen reagieren. Im Allgemeinen muss jedoch vor allem festgestellt werden, ob der Treiber genügend GAL4 produziert um überhaupt einen Effekt auszulösen – trotz der semidominaten Eigenschaften von *shi*^{ts1} könnten zwei *shi*^{ts1} Kopien möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen.
Leider ist bei Verwendung von *shibire*^{ts1} im Gehirn von *Drosophila* trotz der Spezifität mancher Zellen nicht gesagt, welcher Neurotransmitter präsynaptisch und welches Neuropeptid postsynaptisch länger im Spalt bleibt und damit länger signalisieren kann. Dies macht eine Interpretation der Ergebnisse äußerst schwierig und kann im Zweifelsfall zu falschen Annahmen führen. Für die vorliegenden Versuche könnte man in Zukunft als Nachweis dafür, dass PDF den Periodenverlängerungseffekt begründet, einen weiteren Versuch im *Pdf*^{0} Hintergrund oder im *PDF-Rezeptor*^{0} Hintergrund durchführen. Sind die Periodenverlängerungen in dieser Größenordnung dann verschwunden, muss PDF ursprünglich dafür verantwortlich sein.

4. Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) als Tracer für sLNv-Folgeneuronen

Dieser Versuch sollte, nachdem in den vorangegangenen Versuchen vor allem die Synapsen der PDF-Neuronen im Blickpunkt standen, die Neuronen sichtbar machen, die den PDF-Zellen vor- bzw nachgeschaltet sind. Da WGA sowohl anterograd als auch reterograd an den Synapsen weitergegeben wird (Yoshihara et al., 1999; Tabuchi et al., 2000), konnte es über das *GAL4/UAS* System in die Fliege gebracht,

als Tracer benutzt werden. Leider erwies sich der Antikörper gegen WGA als teilweise unspezifisch, denn nicht nur in den Versuchstieren *Pdf-GAL4 UAS-WGA*, sondern auch in *CS* konnten Strukturen im optischen Lobus und Zellen im dorsalen Gehirn angefärbt werden. Die Färbungen direkt neben den PDF-Varikositäten in den Versuchstieren sind aber wahrscheinlich spezifisch, denn sie sind im Vergleich zu *Canton S* intensiver gefärbt und liegen näher an den PDF-Färbungen. Also handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Postsynaptische Strukturen der Folgezellen der sLNv. Da keinerlei weitere Strukturen dieser Neurone angefärbt werden konnten, muss auch weiterhin über den genauen Übertragungsweg der circadianen Information spekuliert werden.
Aus reiner Neugier wurden jedoch dann Gehirne gegen Sufakinin gefärbt, einem Myotropin, dessen Rolle noch nicht ganz erfasst werden konnte, jedoch gehen Nichols et al. (2002) davon aus, dass myotrope Peptide als Hormone, Transmitter und Modulatoren wirken können. Ideal also, um wie PDF die Information der circadianen Uhr weiterzuleiten. Die Färbung zeigt, dass die Endigungen der Sulfakinin-Zellen und der sLNv nahe beieinander sind, jedoch kann man nicht genau sehen, ob sie sich überlappen.
Es sollten in Zukunft aber weitere Färbungen, die Aufschluss über die Folgezellen geben können, durchgeführt werden.

Die Frage, was mit den Aktivitätspeaks geschieht, wenn diese nachgeschalteten Zellen gar keinen Kontakt mehr zu den LN haben, weil diese ganz oder teilweise ablatiert wurden, sollte im nächsten Versuch geklärt werden.

5. Ablation verschiedener Untergruppen von Uhrzellen

5.1. Laufaktivitätsversuch

Leider konnte in diesem Versuch die *R6-GAL4* Linie, die nur in den sLNv treibt, nicht verwendet werden, da sie auch in den Tracheen treibt (Förster et al., 2007) und

somit die Fliegen nicht überlebensfähig sind, wenn man sie mit *UAS-hid* kreuzt. Bei den restlichen Treiberlinien konnte durch die Expressionsversuche mit GFP glücklicherweise genau vorausgesagt werden, welche Zellen ablatiert wurden. *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* sind hierbei besonders interessant, da man die sLNv retten kann.

Im LD zeigte sich erneut, dass bei manchen Stämen wie bei *y w; ;Pdf*^{01} in dem Temperaturversuch, nächtliche Aktivität auftrat. Sieht man sich die Aktivitätsverteilung der einzelnen Versuchsstämme und der Kontrollen an, so bemerkt man, dass manche Versuchstiere mehr Nachtaktivität zeigten als die Kontrolltiere. Diese auffällige Nachtaktivität wurde per Quantifizierung der durchschnittlichen Tagesaktivität analysiert. Die Wahl der Grenzen der Aktivitätspeaks stützte sich auf die Kontrolltiere und die Erfahrung mit anderen Experimenten, in denen die Tiere in der Dunkelphase Licht von der Intensität einer sternenklaren Nacht bekamen und man damit die Dunkelhemmung der Tiere reduzieren konnte (Bachleitner et al., 2007). In diesen Experimenten wurde klar, dass der zweite Aktivitätspeak des Tages nicht nur vom frühen Nachmittag bis Licht aus dauert, sondern sich bis in die Mitte der Nacht erstrecken kann.

Die Geschlechterunterschiede im Morgenpeak ergeben bei der Betrachtung der Lebensweise von *Drosophila* durchaus einen Sinn, da die Weibchen morgens ihre Eier ablegen (Sheeba et al.; 2001) und somit einer der wichtigsten Abläufe zu dieser Tageszeit abläuft. Die nächtliche Aktivität war bei den Männchen höher. Dies könnte darauf hindeuten, dass sie möglicherweise Weibchen zur Paarung suchen. Die circadiane Verteilung der Paarungsaktivität bei *CS* besitzt nämlich 2 Maxima: das erste Maximum liegt 3 h nach Licht-an, während das Zweite in der Mitte der Nacht zu finden ist (Sakai und Ishida, 2001), also genau zu dem hier verwendeten Messzeitraum der nächtlichen Aktivität.

Bei *cry-GAL4 UAS-hid* und *Pdf-GAL4 UAS-hid* kann man in den Durchschnittstagen vor allem sehen, dass sie regelrechte Aktivitätspeaks in der Nacht haben, während *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* nachts durchgehend und diffus ein wenig aktiv ist und die Kontrollen so gut wie keine nächtliche Aktivität haben. Dies spräche erneut dafür, dass die sLNv (in *Pdf-GAL80;cry-GAL4* noch vorhanden) die nächtliche Aktivität an den Morgenpeak koppeln. Allerdings sind bei dieser Kopplung sicher nicht nur die sLNv beteiligt, denn die nächtliche Aktivität ist zwar sehr diffus, aber dennoch mehr vorhanden als in den Kontrolltieren. Auch bei den *cry-GAL4 UAS-hid*, denen

zusätzlich zu den LNv fast alle LNd, die DN1a und zwei DN1p sowie zwei DN3 fehlen, fällt wohl noch ein weiterer Kopplungsvorgang der lokomotorischen Aktivität weg, denn bei ihnen ist die nächtliche Aktivität diffuser als bei *Pdf-GAL4;UAS-hid*. Von welchen Zellen dieser Vorgang ursprünglich ausgeht, ist schwer zu sagen, da mehrere Untergruppen durch die Ablation betroffen sind. Gute Kandidaten wären hier die DN1a und die LNd von denen mittlerweile bekannt ist, dass sie Verbindungen zur akzessorischen Medulla und ins dorsale Protocerebrum haben (Förster et al, 2007) und somit genau wie die sLNv prädestiniert sind, circadiane Informationen von der Augen-Rhythmus-Schnittstelle akzessorische Medulla (Rieger et al., 2006) zum dorsalen Protocerebrum weiterzugeben. So könnte es sein, dass die sLNv in Kombination mit den LNd oder den DN1a oder beiden die Kopplung eines Teils der Aktivität an die Vorgabe der Lichtinformation übertragenden Strukturen übernimmt.

In den vorausgegangenen Experimenten war das Phänomen der nächtlichen Aktivität bei den *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen bei 28°C aufgetreten, was zu der Schlussfolgerung führte, dass PDF über die Terminalen der sLNv beide Morgenpeakkomponenten miteinander koppelt. Die Kombination beider Experimente suggeriert, dass das PDF-Signal von den kleinen PDF-Neuronen für einen Teil der Aktivität die Verbindung mit der Lichtsynchronisation darstellt. Im Falle der sLNv ist PDF als Transmitter in den Terminalen (es ist ja in *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* noch in den sLNv vorhanden) ein Kandidat dafür, diese Kopplungsaufgabe zu übernehmen. Interessant wäre ein Folgeversuch mit *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen im *Pdf*^{0} Hintergrund. Träte dann die Nachtaktivität wie bei *cry-GAL4 UAS-hid* auf, wäre dies ein guter Hinweis darauf, dass PDF beide Komponenten über die Terminalen der sLNv koppelt.

Aber wie schon vorhin angedeutet, kann PDF nicht der einzige Transmitter sein, der die Aktivität koppelt, denn die weiteren Ergebnisse der Aktivitäten zeigten ganz deutlich: Nicht der gesamte Morgenpeak wurde nach vorne verschoben, denn es existiert allen Versuchstieren noch eine Morgenaktivität, die sich im prozentualen Anteil der Gesamtaktivität statistisch gesehen von der der Kontrollen nicht unterscheidet oder sie sogar überstieg. Also wurde dieser Peak von anderen Zellen und anderen Transmittern an den LD gekoppelt.

Er kann nicht von vorgenannten DN1a kontrolliert werden, denn auch in den *cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen ist die Aktivität immer noch in einzelne Peaks aufgeteilt und ist keine bloße Reaktion auf Licht bzw. Dunkelhemmung. Der Morgenpeak ist im

Gegenteil sogar prominenter als gewöhnlich, und der Abendpeak ist reduziert. Dies deutet darauf hin, dass verbliebene Zellen das Aktivitätsprofil zugunsten des Morgenpeaks verschieben. Wenn die sLNv noch vorhanden sind, wird dieser Effekt sogar noch deutlicher, was bedeutet, dass die sLNv im Zusammenspiel mit diesen anderen Zellen den Morgenpeak steuern und die abendliche Aktivität hemmen.

Welche Zellen dies genau sind, die ja sowohl bei den *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* als auch bei den *cry-GAL4* Fliegen vorhanden sein müssen, wurde hier nicht beantwortet, könnte aber durch Färbungen der *cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen im LD beantwortet werden.

Die Akrophasen der Aktivitäten zeigten, dass die sLNv, genauer gesagt, PDF in den sLNv für die Vorverschiebung des Abendpeaks verantwortlich zeichnet, denn wie die Zusammenstellung aller bestimmtem Akrophasen in Abb. 48 darstellt, sind die Lagen der *Pdf-GAL4 UAS-hid* und *y w; ;Pdf*^{01} 20°C Peaks sehr ähnlich, wenn nicht sogar gleich. Sind jedoch die sLNv (mit PDF) wieder vorhanden, dann rutscht der Abendpeak signifikant nach hinten, fast auf Kontrollfliegenniveau. Dies bedeutet, dass im LD PDF in den Terminalen ausreicht, um die abendliche Aktivität zum richtigen Zeitpunkt auftreten zu lassen, also koppelt PDF den Abendpeak über die sLNv Terminalen an den LD.

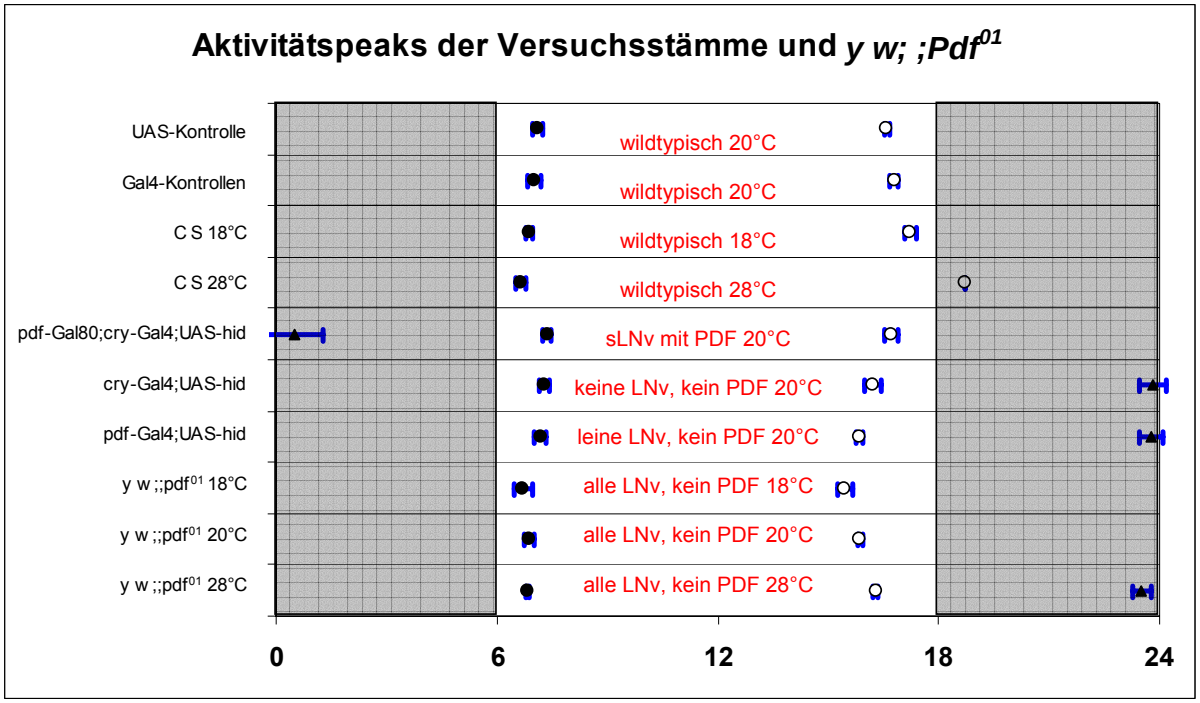


Abb. 48: Akrophasen einiger beobachteter Fliegen. Die ersten 4 Datengruppen sind Kontrollfliegen. Die restlichen Datengruppen sind von Fliegen, die entweder kein PDF mehr haben oder denen ganze Uhrzellcluster fehlen. Auffällig ist hier, dass die *Pdf-GAL4 UAS-hid* Fliegen den *y w; ;Pdf*^{01} Fliegen bis auf die nächtliche Aktivität sehr ähneln.

Fehlt nicht nur PDF, sondern die ganzen LNv, tritt zusätzlich zum vorverschobenen Abendpeak, nächtliche Aktivität auf, die, wenn die sLNv samt PDF wieder da sind ein wenig unterdrückt oder zumindest zerstreut wird. Daraus ziehe ich mit den *y w; ;Pdf*^{01} Ergebnissen den Schluss, das PDF die nächtliche Aktivität oder die Zellen, die dafür verantwortlich sind, normalerweise an den Morgenpeak koppelt. Auch hier konnte nicht festgelegt werden, welche Zellen für den Nachtpeak verantwortlich sind.
Des Weiteren waren das Freilaufverhalten der Versuchstiere untersucht worden. Warum die *Pdf-GAL4 UAS-hid* Weibchen viel schneller arythmisch wurden als die Männchen, bleibt leider ein Rätsel, dessen Lösung wohl auf einem der beiden x-Chromosome oder in ihrer Konkurrenz zu suchen ist.
Gemeinsam betrachtet lässt sich aber ganz deutlich sagen, dass die sLNv alleine nicht ausreichen um den Rhythmus genügend zu stabilisieren, wenn fast alle LNd, die DN1a, 2 DN1p und 2 DN3 fehlen. *Pdf-GAL4 UAS-hid* zeigt noch einen fast wildtypischen Rhythmus im DD (wenn auch mit einer verkürzten Periode), deshalb könnte man annehmen, dass die fehlenden lLNv hier keine große Rolle spielen. Sieht man sich jedoch die Ergebnisse von Helfrich-Förster et al. (2007) an, so zeigen diese, dass die DN1a, Teile der DN3 und vor allem die LNd Kontakte zur akzessorischen Medulla und ins contralaterale dorsale Protocerebrum haben. Dies macht sie zu weiteren Kandidaten der Kopplung der Hemisphären, genau wie die lLNv, die ja auch beide Hemisphären verbinden. Zusätzlich haben diese Zellen aber Kontakt ins dorsale Gehirn, was sie zugleich dazu befähigen könnte Medulla und dorsales Gehirn zu koppeln, wie für die sLNv postuliert. Ohne diese Kopplungen scheint es den Uhrzellen unmöglich zu sein, eine gemeinsame Periode zu finden.
Bei genauerer Ansicht der *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Aktogramme sieht man, dass die Aktivität im Freilauf „auseinanderläuft“, d.h. die Aktivitätsphase wird von Tag zu Tag länger. Das spricht wiederum dafür dass die bis dahin durch den LD (also Cry) synchronisierten Uhrzellen jetzt ihren gemeinsamen Takt nach und nach wegen fehlender Kommunikationsmöglichkeiten verlieren.

5.2. Immunhistochemische Präparationen

Dies sollte in Färbungen von *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Gehirnen im DD überprüft werden. Als Kontrolle diente *UAS-hid*, da diese Fliegen eine Periodenlänge von ungefähr 24h hatten und somit die Einzelfliegen nach mehreren Tagen im DD

trotzdem noch vergleichbare Ergebnisse liefern sollten. Die Ergebnisse zeigen unerwarteter Weise, dass sich die beiden Stämme, was die Färbeintensität angeht, nur in den DN1 signifikant unterschieden, und dies auch nur am 1. Tag im DD nicht mehr im 7. Tag im DD. Sieht man sich die Färbungen genauer an, so zeigt sich, dass die DN1 in den Versuchstieren am 1. Tag im DD weniger Unterschied in der Intensität zu den Färbezeitpunkten zeigen als die Kontrolle. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die DN1 in den Versuchstieren ohne die synchronisierende Information der anderen Uhrneurone kaum eigenes cycling zeigen. Andererseits und viel wahrscheinlicher sind die beiden Färbezeitpunkte im Falle der DN1 falsch gewählt und sie liegen bereits im LD außer Phase zu den restlichen Zellen, denn immerhin sollten sie über Cry genügend Synchronisationsinformation im LD erhalten. Diese verschobene Phasenlage wäre möglicherweise eine Erklärung für die untypische Aktivitätsverteilung im LD, was die DN1p zu Kandidaten machen würde, die im Falle eines Ausfalls der sLNv und den LNd (Rieger et al., 2006) das Aktivitätsprofil steuern.

In Zukunft sollte das Experiment mit weiteren Färbezeitpunkten wiederholt werden um genau diese Hypothese zu überprüfen.

Zurück im DD konnte allerdings für die stetige Verbreiterung der Aktivitätsphase keine Erklärung gefunden werden, denn da die sLNv ja weiterhin in Phase schienen sollte das dorsale Protocerebrum immer noch die Chance auf eine Kopplung mit PDF haben. So wurden die sLNv genauer unter die Lupe genommen. Die Zellen wurden darauf untersucht, ob sich PER im Kern oder im Zytoplasma befand, da die Lokalisation über den Tag verteilt sich ändert (Shafer et al., 2002) und eine Störung in diesem Ablauf möglicherweise die Rhythmusweitergabe beeinträchtigt. Am ersten Tag im DD geben Versuchs als auch Kontrolltiere zu beiden Färbezeitpunkten gleiches preis: zu den Zeitpunkten geringster lokomotorischer Aktivität war PER vor allem im Zytoplasma zu finden. Entsprechend dazu war zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität PER hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Shafer et al. (2002) haben genau dieses Ergebnis auch beobachtet, dass in den sLNv in der circadianen Nacht PER eher im Zytoplasma zu finden ist und am subjektiven Tag im Kern. Die Kontrolltiere zeigen diese Konstellation auch noch nach 7 Tagen im DD. Die Versuchstiere, jedoch, haben nun PER zu den präparierten Zeitpunkten nicht mehr nur im Zytoplasma, sondern mehr im Zellkern. Damit stellt sich die Frage, ob PER einfach weniger ins Zytoplasma wandert, oder ob auch hier eine andere Phase

des Rhythmus beim Präparieren getroffen wurde. Gegen letzteres spricht zum einen, dass die Färbeintensität zu beiden Zeitpunkten in beiden Stämmen die gleichen Unterschiede zeigte und dass zum anderen zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität immer noch wie am 1. Tag im DD Kernfärbung vorherrscht und nicht eine intermediäre Färbung gezeigt wird. Somit wäre die fehlende Synchronisation im dorsalen Protocerebrum, die dann schließlich zur stetigen Verbreiterung der Aktivität führt, erklärt, denn wenn die innere Uhr in den sLNv nicht mehr richtig funktioniert, kann sie auch kein richtiges PDF-Signal an nachgeschaltete Zellen weitergeben. Andererseits lässt sich ebenso daraus schließen, dass die sLNv den Kontakt in der akzessorischen Medulla zu den anderen Uhrzellen benötigen, um die PER-Lokalisation an und für sich zu synchronisieren. Da die DN1p als einzige Zellen in diesem Experiment sich in den Versuchstieren anders verhielten als in den Kontrollen sollten sie in Zukunft genauer betrachtet werden, auch unter dem Aspekt, dass sie die nächtliche Aktivität steuern könnten.

Zusammenfassung

Die circadiane Rhythmik von *Drosophila* ist ein weites Forschungsgebiet, das in der Vergangenheit viel dazu beigetragen hat, die Mechanismen von inneren Uhren im Allgemeinen zu verstehen. Leider gilt dies kaum im Bereich der Weitergabe des zentralen Rhythmus an untergebene Strukturen oder der Kommunikation von Rhythmusgebern untereinander. Diese Arbeit sollte als Grundlagenforschung die Funktionen und Eigenschaften von dem Neuropeptid Pigment Dispersing Factor (Pdf) genauer beleuchten, welches in der Literatur als potentieller Kopplungs- und Outputfaktor gehandelt wird. Es galt, unterschiedlichste Herangehensweisen an das Thema PDF miteinander zu verbinden und damit ein klareres Bild von der Aufgabe dieses Neuropeptids im circadianen Gefüge zu erhalten.

Als sicherlich erstaunlichstes Ergebnis ist die Tatsache zu werten, dass nach dem Verlust von PDF nur bei hohen Temperaturen und dem Verlust der sLNv bereits bei Raumtemperatur Nachtaktivität im LD auftritt, die möglicherweise durch eine Entkopplung im dorsalen Gehirn dieser Komponente vom Rest der Aktivität zustande kommt. Ein Nebenergebnis dieser Versuche ist die Erkenntnis, dass es noch weitere Kopplungsfaktoren im circadianen System von *Drosophila* geben muss. Des Weiteren konnte im Zusammenhang mit anderen Experimenten (Wülbeck et al., 2008) herausgefunden werden, dass ektopisches PDF in der akzessorischen Medulla stark verlangsamend auf die innere Uhr wirkt und kein Splitting verursacht, d.h. weiterhin die nachgeschalteten Zellen miteinander koppelt.

Als Resumee meiner Versuche darf man vermuten, dass von den lLNv ausgeschüttetes PDF in der akzessorischen Medulla über die PDF-Rezeptoren der sLNv auf die innere Uhr zurückwirkt und diese verlangsamt. Gleichzeitig koppelt es über die dorsalen Terminalen der sLNv einen Teil der morgendlichen lokomotorischen Aktivität an restliche Aktivität.

In Zukunft sollte aber nicht nur PDF im Fokus liegen, wenn man die Kopplung der Uhrzellen untereinander studiert, sondern auch die Suche nach dem hier postulierten weiteren – jedoch schwächeren Kopplungsfaktor im circadianen System von *Drosophila*.

Anhang

Rezepte, Konzentrationen und pH-Werte

Zamboni's Fixativ (Zamboni und DeMartino, 1976):

4% Paraformaldehyd

7,5% gesättigte Pikrinsäurelösung

in 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,4

0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) (PP):

Stammlösung A: 0,1M Natriumdihydrogenphosphat ● H_20

Stammlösung B: 0,1M Di-Natriumhydrogenphosphat ● $2H_2O$

Verhältnis Stammlösung A zu Stammlösung B ist ca. 4 zu 1

(am pH-Meter Stammlösung A zu Stammlösung B geben und genauen pH Wert (7,4) einstellen)

PPT (Phosphatpuffer mit Detergenz Triton X-100)

Je nach Bedarf 0,1% oder 0,5% Triton zum PP geben

Ziegenserum zum Blocken:

1% Normal Goat Serum in PPT (0,5% TritonX-100)

Primäre Antikörper:

Whole mounts:

0,02% Natriumazid

1% NGS

in PPT (0,5% Triton X-100)

Anti-PDH (1:2000) (Kaninchen)(Labor Dircksen)

Anti-PDF (nb33/2) (1:100) (Maus)(Labor Hofbauer)

Anti-PER (1:1000) (Kaninchen)(Labor Stanewsky)

Western Blot:

0,02% Natriumazid

2% NGS

in TBS (siehe unten)

Anti-PER (1:10000) (Kaninchen)(Labor Stanewsky)

Sekundäre Antikörper:

Whole mounts:

0,02% Natriumazid

1% NGS

in PPT (0,5% Triton X-100)

Goat Anti Rabbit Alexa Fluor (1:200)

Goat Anti Mouse Alexa Fluor (1:200)

Jeweils in den Wellenlängen 488nm und 543nm

Proteinextraktionspuffer (1ml):

Stocklösung Proteinextraktionspuffer	986 µl
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 50mM	10 µl
Aprotinin 10mg/ml	2 µl
Dithiothreitol (DTT) 1M	1µl
Leupeptin 10mg/ml	0,5µl
Pepstatin A 10mg/ml	0,5µl

Stocklösung Proteinextraktionspuffer (250ml)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) 1M pH 7,5	5ml
Kaliumchlorid (KCl) 3M	8,3ml
Glycerol 50%	25ml
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5M	5ml
Triton X-100 10%	2,5 ml
ß-Glycerophosphat 1M	5ml
Na_3VO_4 10mM pH 10-12	2,5ml

Mit destilliertem H_2O auf 250ml auffüllen

DGLP Gelladepuffer (10 ml):

Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan (Tris)	0,375g
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	1g
Glycerol	5ml
ß-Mercaptoethanol	2,5ml
Bromphenolblau	0,01g

Mit destilliertem H_2O auf 10ml auffüllen

Polyacrylamidgele

Sammelgel:

H_2O, steril	12,3 ml
Tris 1,5M pH 8,8	6,5ml
SDS 20%	125µl
Polyacrylamid (PAA) 30%	4,9ml
Bisacrylamid (BIS) 2%	1ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	125µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	12,5µl

Trenngel:

H_2O, steril	14,1ml
Tris 1M pH 6,8	2ml
SDS 20%	100µl
Polyacrylamid (PAA) 30%	2,96ml
BIS 2%	0,6ml
APS 10%	250µl
TEMED	40µl

Elektrophoresepuffer (5-fach):

Tris	30g
Glycin	144g
SDS 20%	100ml

Mit destilliertem H_2O auf 2000ml auffüllen (zum Benutzen 1 zu 5 mit H_2O verdünnen)

Semi-Dry-Blotting-Buffer:

Tris	5,82g
Glycin	2,93g
Methanol	200ml
SDS 20%	1,875ml

Mit destilliertem H_2O auf 1000ml auffüllen

Tris gepufferte Saline (TBS)

NaCl 5M	28ml
Tris 1M pH 7,5	10ml

Mit destilliertem H_2O auf 1000ml auffüllen

Tris gepufferte Saline mit Tensid (TBST)

NaCl 5M	28ml
Tris 1M pH 7,5	10ml
TWEEN-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) (Tensid) 10%	5ml

Mit destilliertem H_2O auf 1000ml auffüllen

p-Werte des Versuchs über immunhistochemische Präparationen von *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* Fliegen

PER-Färbeindices bei UAS-hid

sLNV

a) Es gibt keinen Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/35)=1,932$; $p=0,173$).

b) Es wurde höchst signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität. ($F(1/35)=19,808$; $p<0,001$).

c) Die Zellen zeigen keine Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/35)= 1,157$; $p=0,289$).

5th sLNv

a) Es gibt keinen Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/35)=0,012$; $p=0,913$).

b) Es wurde höchst signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität ($F(1/35)=20,191$; $p<0,001$).

c) Die Zellen zeigen keine Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/35)= 0,168$; $p=0,685$).

lLNv

a) Es gibt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/34)=9,161$; $p=0,004$). Die Färbeindices sind am 7. Tag DD höher als am 1. Tag.

b) Es wurde höchst signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität ($F(1/34)= 23,211$; $p<0,001$).

c) Die Zellen zeigen keine Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/34)= 0,492$; $p=0,487$).

LNd

a) Es gibt keinen Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/35)=2,739$; $p=0,106$).

b) Es wurde signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität ($F(1/35)= 10,871$; $p=0,02$).

c) Die Zellen zeigen keine Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/35)= 0,013$; $p=0,909$).

DN1

a) Es gibt einen höchst signifikanten Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/34)= 20,075$; $p<0,001$). Die Färbeindices sind im Mittel am 1. Tag DD höher als am 7. Tag.

b) Es wurde höchst signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität ($F(1/34)= 59,409$; $p<0,001$).

c) Die Zellen zeigen höchst signifikante Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/34)= 37,986$; $p<0,001$): Während am 1. Tag im DD noch eine signifikante Schwankung zwischen den Zeitpunkten auftritt, ist dies am 7. Tag im DD nicht mehr der Fall.

DN2

a) Es gibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem 1. und dem 7. Tag im DD ($F(1/34)= 13,760$; $p=0,006$). Die Färbeindices sind im Mittel am 1. Tag DD höher als am 7. Tag.

b) Es wurde höchst signifikant mehr PER zum Zeitpunkt der geringsten lokomotorischen Aktivität angefärbt, als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischen Aktivität ($F(1/34)= 26,866$; $p<0,001$).

c) Die Zellen zeigen höchst signifikante Unterschiede am 1. und am 7. Tag DD in der Art und Weise der PER- Schwankungen ($F(1/34)= 34,950$; $p<0,001$): Während am 1. Tag im DD noch eine signifikante Schwankung zwischen den Zeitpunkten auftritt, ist dies am 7. Tag im DD nicht mehr der Fall.

<u>PER- Intensitäten der beiden Stämme im Vergleich</u>

sLNv

1. Tag DD

a) Es gibt keinen statistischen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen: ($F(1/29)=1,434$; $p=0,240$)

b) Es gibt im Mittel einen höchst signifikanten Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität ($F(1/29)=72,101$; $p<0,001$)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich ($F(1/29)=0,828$;$p=0,370$)

7. Tag DD

a) Es gibt einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen:

UAS-hid hat signifikant weniger PER Färbung (F(1/37)= 4,086; p=0,0499)

b) Es gibt im Mittel einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist hochsignifikant mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität (F(1/37)=7,445; p=0,009)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/37)=0,019;p=0,891)

LNd

1. Tag DD

a) Es gibt einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen:

UAS-hid hat hochsignifikant mehr PER Färbung (F(1/29)= 18,517; p=0,002)

b) Es gibt im Mittel keinen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten (F(1/29)=7,687; p=0,092).

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/29)=0,010;p=0,920)

7. Tag DD

a) Es gibt einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen:

UAS-hid hat höchst signifikant mehr PER Färbung (F(1/33)= 15,910; p<0,001)

b) Es gibt im Mittel keinen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten (F(1/33)=1,812; p=0,187)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/33)=0,009;p=0,804)

DN1

1. Tag DD

a) Es gibt einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen:

UAS-hid hat höchst signifikant mehr PER Färbung (F(1/28)=24,405; p<0,001)

b) Es gibt im Mittel einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist höchst signifikant mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität (F(1/28)=74,290; p<0,001)

c) Die beiden Stämme verhalten sich nicht gleich (F(1/28)=30,623;p<0,001):

UAS-hid zeigt unterschiedliche PER Intensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten (p<0,001) *Pdf-GAL80;cry-GAL4 UAS-hid* nicht (p=0,265)

7. Tag DD

a) Es gibt einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen:

UAS-hid hat höchst signifikant mehr PER Färbung (F(1/37)= 20,328; p<0,001)

b) Es gibt im Mittel einen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist signifikant mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität (F(1/37)=4,355; p=0,043)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/37)=1,739;p=0,195)

DN2

1. Tag DD

a) Es gibt keinen statistischen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen: (F(1/28)= 0,021; p=0,886)

b) Es gibt im Mittel einen höchstsignifikanten Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität (F(1/28)=59,926; p<0,001)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/28)=0,329;p=0,572)

7.Tag DD

a) Es gibt keinen statistischen Unterschied in der PER Färbung zwischen den Stämmen: (F(1/36)= 1,217; p=0,277)

b) Es gibt im Mittel einen signifikanten Unterschied in der PER Färbung zwischen den Zeitpunkten:

Zum Zeitpunkt geringster lokomotorischer Aktivität ist mehr PER in den Zellen als zum Zeitpunkt höchster lokomotorischer Aktivität (F(1/36)=10,166; p=0,0282)

c) Die beiden Stämme verhalten sich statistisch gleich (F(1/36)=1,497;p=0,229)

Literaturverzeichnis

Awasaki T, Ito K. Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during Drosophila metamorphosis. Curr Biol. 2004 Apr 20;14(8):668-77.

Bachleitner W, Kempinger L, Wülbeck C, Rieger D, Helfrich-Förster C. Moonlight shifts the endogenous clock of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3538-43.

Biessmann H. Molecular analysis of the yellow gene (y) region of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Nov;82(21):7369-73.

Blau J, Young MW. Cycling vrille expression is required for a functional Drosophila clock. Cell. 1999 Dec 10;99(6):661-71.

Duffy JB. GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. Genesis. 2002 Sep-Oct;34(1-2):1-15.

Edery I., Circadian rhythms in a nutshell. Physiol Genomics. 2000 Aug 9;3(2):59-74.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. Drosophila CRY is a deep brain circadian photoreceptor. Neuron. 2000 May;26(2):493-504.

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

Glaser, WR. Varianzanalyse. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart-New York. 1978.

Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr Biol. 1996 Feb 1;6(2):178-82.

Helfrich C. Role of the optic lobes in the regulation of the locomotor activity rhythm of Drosophila melanogaster: behavioral analysis of neural mutants. J Neurogenet. 1986 Nov;3(6):321-43.

Helfrich-Förster C, Homberg U. Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type Drosophila melanogaster and of several mutants with altered circadian rhythmicity. J Comp Neurol. 1993 Nov 8;337(2):177-90.

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

Helfrich-Förster C, Täuber M, Park JH, Mühlig-Versen M, Schneuwly S, Hofbauer A. Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in Drosophila melanogaster. J Neurosci. 2000 May 1;20(9):3339-53.

Helfrich-Förster C. PDF has found its receptor. Neuron. 2005 Oct 20;48(2):161-3.

Helfrich-Förster C. Robust circadian rhythmicity of Drosophila melanogaster requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. J Comp Physiol [A]. 1998 Apr;182(4):435-53.

Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie. 2000 May;82(5):427-46.

Hyun S, Lee Y, Hong ST, Bang S, Paik D, Kang J, Shin J, Lee J, Jeon K, Hwang S, Bae E, Kim J. Drosophila GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. Neuron. 2005 Oct 20;48(2):267-78.

Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. Development. 1997 Feb;124(4):761-71.

Kaneko M, Park JH, Cheng Y, Hardin PE, Hall JC. Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of Drosophila cause abnormal behavioral rhythms. J Neurobiol. 2000 Jun 5;43(3):207-33.

Kitamoto T. Conditional modification of behavior in Drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. J Neurobiol. 2001 May;47(2):81-92.

Lear BC, Merrill CE, Lin JM, Schroeder A, Zhang L, Allada R. A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. Neuron. 2005 Oct 20;48(2):221-7.

Lin Y, Stormo GD, Taghert PH. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the Drosophila circadian system. J Neurosci. 2004 Sep 8;24(36):7951-7.)

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Darnell J. Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford. 2001 Okt, 4.Aufl.

Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. Neuron. 1999 Sep;24(1):219-30.

Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, Harmar AJ, Okamura H, Hastings MH. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. Curr Biol. 2006 Mar 21;16(6):599-605.

McNabb SL, Baker JD, Agapite J, Steller H, Riddiford LM, Truman JW. Disruption of a behavioral sequence by targeted death of peptidergic neurons in Drosophila. Neuron. 1997 Oct;19(4):813-23.

Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH. PDF receptor signaling in Drosophila contributes to both circadian and geotactic behaviors. Neuron. 2005 Oct 20;48(2):213-9.

Miskiewicz K, Pyza E, Schürmann FW. Ultrastructural characteristics of circadian pacemaker neurones, immunoreactive to an antibody against a pigment-dispersing hormone in the fly's brain. Neurosci Lett. 2004 Jun 3;363(1):73-7.

Nässel DR, Homberg U. Neuropeptides in interneurons of the insect brain. Cell Tissue Res. 2006 Oct;326(1):1-24.

Nässel DR. Neuropeptides in the nervous system of Drosophila and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. Prog Neurobiol. 2002 Sep;68(1):1-84.

Nichols R, Bendena WG, Tobe SS. Myotropic peptides in Drosophila melanogaster and the genes that encode them. J Neurogenet. 2002 Jan-Mar;16(1):1-28.

Park JH, Helfrich-Förster C, Lee G, Liu L, Rosbash M, Hall JC. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 28;97(7):3608-13.

Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M. Drosophila free-running rhythms require intercellular communication. PLoS Biol. 2003 Oct;1(1):E13. Epub 2003 Sep 15.

Petri B, Stengl M. Phase response curves of a molecular model oscillator: implications for mutual coupling of paired oscillators. J Biol Rhythms. 2001 Apr;16(2):125-41.

Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in Drosophila. Cell. 1999 Dec 23;99(7):791-802.

Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Förster C. Functional analysis of circadian pacemaker neurons in Drosophila melanogaster. J Neurosci. 2006 Mar 1;26(9):2531-43.

Sakai T, Ishida N. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 31;98(16):9221-5.

Shafer OT, Helfrich-Förster C, Renn SC, Taghert PH. Reevaluation of Drosophila melanogaster's neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. J Comp Neurol. 2006 Sep 10;498(2):180-93.

Shafer OT, Kim DJ, Dunbar-Yaffe R, Nikolaev VO, Lohse MJ, Taghert PH. Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of Drosophila revealed by real-time cyclic AMP imaging. Neuron. 2008 Apr 24;58(2):223-37.

Shafer OT, Rosbash M, Truman JW. Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of Drosophila melanogaster. J Neurosci. 2002 Jul 15;22(14):5946-54.

Sheeba V, Chandrashekaran MK, Joshi A, Sharma VK. Persistence of oviposition rhythm in individuals of Drosophila melanogaster reared in an aperiodic environment for several hundred generations. J Exp Zool. 2001 Sep 15;290(5):541-9.

Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of Drosophila. Nature. 2004 Oct 14;431(7010):862-8.

Suster ML, Seugnet L, Bate M, Sokolowski MB. Refining GAL4-driven transgene expression in Drosophila with a GAL80 enhancer-trap. Genesis. 2004 Aug;39(4):240-5.

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

Taghert PH, Shafer OT. Mechanisms of clock output in the Drosophila circadian pacemaker system. J Biol Rhythms. 2006 Dec;21(6):445-57.

Wülbeck C, Grieshaber E, Helfrich-Förster C. Pigment-Dispersing Factor (PDF) Has Different Effects on Drosophila's Circadian Clocks in the Accessory Medulla and in the Dorsal Brain. J Biol Rhythms. 2008 Oct;23(5):409-24.

Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, Kagamiyama H, Jishage K, Ueda O, Suzuki H, Tabuchi K, Sawamoto K, Okano H, Noda T, Mori K. A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. Neuron. 1999 Jan;22(1):33-41.

Zamboni L, De Martino C. Buffered picric acid-formaldehyde: a new, rapid fixative for electron microscopy. J. Cell Biol. 1967;35:148a

Danksagung

Ein riesiges Dankeschön gilt Prof. Dr. Charlotte Förster, für ihre nicht enden wollende Geduld und die Möglichkeit überhaupt die Erfahrung einer Doktorarbeit machen zu dürfen. Auch wenn ich die circadiane Fliegenwelt nicht vermissen werde, so habe ich doch sehr gerne in der Wissenschaft „gastiert“ was mir nicht zuletzt durch das spannende Thema erleichtert wurde.

Des Weiteren möchte ich vor allem meinen Eltern danken, die mich all die Jahre unterstützt haben und weiterhin unterstützen. Diese Arbeit ist allein für Euch…

Ein besonderes Dankeschön auch an Dirk Rieger, dass er für mich noch einmal den Stress des Organisierens der Abgabe auf sich genommen hat und trotz all der räumlichen Distanz Kontakt gehalten hat, mich beherbergt hat, nachgebohrt hat und somit auch einen Teil zum finalen Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz allgemein gilt: Die Kollegen in Regensburg werde ich sehr vermissen. An alle Wegbegleiter mit denen ich viel Zeit verbracht, die mir oft weitergeholfen und mit denen ich so manchen netten Abend im Büro verbracht habe, ein herzliches Dankeschön. Unsere Membranraketen bleiben unvergessen.

Dem Rest meiner Familie und allen Freunden danke ich für viele lustige und heitere Stunden, manch kritische Nachfrage was denn die Arbeit so mache und das Verständnis der ebenfalls Dissertationsgeplagten. Vielen Dank fürs „Tragen“ in zäheren Stunden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

1. .....
2. .....
3. .....

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Tübingen, den

_____