

Fliegende Uhren

Die Uhren der Taufleiege

Wolfgang Engelmann
Institut für Botanik, Tübingen

Tübingen 2009

Publiziert bei Tobias-lib, Universitätsbibliothek Tübingen:

URL: <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3795/>

Lizenz: <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/doku/lizenzen/xx.html>

3. Auflage 2009

Die erste Auflage erschien 2004 unter <http://www.uni.tuebingen.de/plantphys/bioclox>, in der 2. Auflage 2007 wurden Text und Bilder überarbeitet.

Eine englische Version ist bei Tobias-lib, Universitätsbibliothek Tübingen unter <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3796/> publiziert.

Universitäts-Bibliothek Tübingen. ©Wolfgang Engelmann 2009

Dieses Buch wurde mit LyX geschrieben, einem professionellen System zum Erstellen von Dokumenten (<http://www.lyx.org>). Es verwendet das Textsatzsystem L^AT_EX. Die Vektorgrafik-Bilder wurden mit xfig unter Linux angefertigt. Für die Diagramme wurde PyxPlot verwendet. Mareike Förster, Tübingen, fertigte eine Reihe von Bildern nach Vorlagen an. Ihr gilt mein besonderer Dank. Dirk Engelmann, die Lyx-User-Group und die Linux-User-Group Tübingen halfen oft bei technischen Fragen.



as a representative of the
insect world i have often wondered
on what man bases his claims
to superiority
everything he knows he has had
to learn whereas we insects are born
knowing everything
we need to know

*don marquis: the lives and times of archy and
mehitable*

^a

Als ein Vertreter der Insekten-Welt
habe ich mich oft gefragt,
worauf die Menschen ihre Behauptung gründen,
sie seien allen überlegen
alles, was sie wissen, müssen sie lernen
während wir Insekten so geboren werden
dass wir alles wissen, was wir wissen müssen

Inhaltsverzeichnis

Nur eine Fliege ...	9
1 Die Taufliege <i>Drosophila</i> als Modell-System der Genetiker	11
1.1 Lebenslauf einer Taufliege	13
1.2 <i>Drosophila</i> -der ideale Organismus für Wissenschaftler	13
2 Schlüpfen in Zeitfenstern	15
2.1 Zeit zum Schlüpfen	16
2.2 Eine Uhr zum Schlüpfen	20
2.2.1 Mutanten: Schnelle und langsame Tanten	20
2.2.2 Augen der Schlüpfuhr: Von Zeitgebern und Zeitnehmern	21
2.2.3 Temperatur-Kompensation der Schlüpfuhr	23
2.3 Made oder Fliege?	23
2.3.1 Eine Fliege fährt aus der Haut	29
3 Wie wird der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert?	33
3.1 Von der inneren Uhr zu den Beinen	33
3.2 Augen, um die Laufuhr zu stellen	35
3.3 Steuerung des <i>Drosophila</i> Schlafes	37
4 Wo steckt die innere Uhr der Fliege?	39
4.1 Ein Blick ins Fliegenhirn	39
4.2 Eine Uhr für circadianes Schlüpfen und für lokomotorische Aktivität?	41
4.3 Zentraluhr und lokale Uhren	42
4.4 Mutanten	44
5 Das Uhr-Getriebe	49
5.1 Ein Rückkopplungsmodell für Schwingungen: Das Spiel	49
5.2 Die Spieler und die Spielregeln	51
5.3 Wenn Licht hineinspielt	52
5.4 Warum Temperatur keine Rolle spielt	55
5.5 Warum Temperaturpulse eine Rolle spielen	55
5.6 Uhr-getriebene Vorgänge	56
6 Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?	57
6.1 Schlüpfrythmus messen	57
6.2 Laufrythmus messen:	60

7 Bedeutung der Rhythmen	63
8 Jahreskalender der Fliegen	67
8.1 Wie kommt eine Fliege über den Winter?	67
8.2 Woran merkt eine Fliege, daß der Winter naht?	68
8.3 Wie mißt eine Fliege die Tageslänge?	68
8.4 Wie werden die Kurztage gesehen und gezählt?	71
8.5 Wann ist der Winter vorbei?	72
8.6 Diapause und Vererbung	72
9 Weitere Bücher	75
Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis

1.2	Lebenszyklus der Fruchtfliege <i>Drosophila</i>	12
1.1	Balz und Kopulation der Fruchtfliege	13
2.1	Colin S. Pittendrigh	15
2.2	Arthur Winfree	16
2.3	Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i>	17
2.4	Warum schlüpft <i>Drosophila</i> zu bestimmten Zeiten?	18
2.5	Test der drei Hypothesen	19
2.6	Schnelle, langsame und arhythmische <i>Drosophila</i> -Mutanten	21
2.7	Früh und spät schlüpfende <i>Drosophila</i> -Mutanten	21
2.8	Zeitgeber, Zeitnehmer und zeitliche Steuerung	23
2.9	Ein Lichtpuls verschiebt den Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i>	24
2.11	Phasenverschiebung des Schlüpfens von <i>Drosophila</i>	25
2.10	Tagesgang der Empfindlichkeit auf Licht- und Temperaturpulse	26
2.12	Aktionsspektrum auf Lichtpulse beim Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i>	26
2.13	Synchronisation des Schlüpfrythmus durch Temperatur	27
2.14	Umwandlung einer Made in eine Fliege	28
2.15	Nervensystem einer 13 Stunden alten Larve von <i>Drosophila</i>	29
2.16	Kontrolle des Schlüpfens	30
2.17	Was beim Schlüpfen passiert	32
3.1	Laufaktivitäts-Rhythmus von <i>Drosophila</i>	34
3.2	Zentren der Schlafsteuerung	38
4.1	Uhren-Zellen der Laufaktivität und ihre Synchronisation	40
4.2	Aktogramm von <i>Drosophila</i> mit zwei circadianen Komponenten	43
4.3	Leuchtrhythmen von <i>Drosophila</i> -Geweben	45
5.1	Modell mit zwei Rückkopplungskreisen	50
5.2	Modell der Akkumulation von PER, DBT und TIM im Kern	53
5.3	Wie die Temperaturkompensation von <i>Drosophila</i> erklärt werden kann	55
6.4	Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i> -Fliegen mit Ruß-Methode registrieren	58
6.1	Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i> -Fliegen registrieren	59
6.2	Schlüpfen im Zeitfenster	59
6.3	Schlüpfrythmus mit Teflon-Trichter registrieren	60
6.5	Videoregistrierung von <i>Drosophila</i> -Fliegen	61

Abbildungsverzeichnis

7.1	Lebensdauer von <i>Drosophila</i> unter nicht-24-Stunden-Zyklen	63
7.2	Lebensdauer von Fliegen nach Verschiebung des Licht-Dunkel-Zyklus . . .	64
7.3	Prozentsatz von Fliegen mit circadianem Rhythmus	65
8.1	Kritische Tageslänge der Diapause bei <i>Drosophila</i>	69
8.2	Bünning-Modell für photoperiodische Reaktionen	70
8.3	Externes Koinzidenzmodell	71
8.4	Kritische Tageslänge bei arrhythmischer Mutante von <i>Drosophila</i>	72
8.5	Modell zum photoperiodischen Zähler	73
8.6	Kreuzungen zwischen <i>Drosophila</i> -Rassen	74

Nur eine Fliege ...

Herbst. Das Laub wird bunt. Zeit der Ernte. Obst ist reif geworden und in der Küche wimmelt es von kleinen Fliegen. Ganze Wolken von Fruchtfliegen können aus dem Abfalleimer aufstieben, wenn er geöffnet wird, um eine neue Ladung Abfall loszuwerden. Sehr zum Ärger der Hausfrau treiben sich diese *Drosophila* jetzt überall herum. Aber welche Wunder verbergen sich hinter diesen kleinen Flugkünstlern! Nur eine Fliege?

Ich lade Dich zu einer Zeitreise ein. Wir wollen sehen, wie aus dem auf Obst abgelegten Ei eine Fliege wird, die sich mit einer männlichen Fliege paart und wieder Eier ablegt, aus denen schon in zwei Wochen wieder eine neue Generation entsteht. Wie Maden aus den Embryonen im Ei werden, die sich häuten und verpuppen. Früh morgens, wenn es noch kühl und feucht ist, schlüpfen die Fliegen, weil ihnen eine innere Uhr sagt, daß es jetzt Zeit ist, sich aus den Puppenhüllen herauszuarbeiten.

Die geschlüpfte Fliege gehorcht ebenfalls einer inneren Uhr. Diese Uhr gibt den Takt zum Schlafen und Wachen. Der Licht-Dunkel-Wechsel stellt die Uhr, damit sie 'richtig' läuft. Die Umgebungstemperatur kann der Uhr nichts anhaben, sie läuft bei hohen und niedrigen Temperaturen immer gleich schnell.

Nur eine Fliege. Fliegenuhren, fliegende Uhren: *Wo* ticken sie in der Fliege, *wie* ticken sie und *wozu* tun sie das? Eine Zeitreise, die Dir zeigen soll, welche Wunder in so einer kleinen Fliege stecken.

Nur eine Fliege ...

1 Die Taufliege *Drosophila* als Modell-System der Genetiker

Der Lebenslauf der Taufliege Drosophila wird beschrieben. Die Fliegen eignen sich für genetische Untersuchungen. Es gibt zahlreiche Mutanten, bei denen unter anderem auch die Tagesuhr verändert ist.

In der Biologie, der Lehre vom Leben, spielt die Genetik eine zentrale Rolle. Die Genetiker beschäftigen sich mit der Vererbung. Der Augustinermonch Gregor Mendel (1822-1884) hatte schon 1866 entdeckt, daß das Erbgut eines Organismus aus Einzelfaktoren zusammengesetzt ist (Mendel (1866)). Er hatte im Klostergarten in Brünn zwei Erbsensorten miteinander gekreuzt, die sich in einem Merkmal wie zum Beispiel in der Farbe der Blüten unterschieden. Die Nachkommen (F1-Generation) hatten Blüten, deren Färbung zwischen denen der Eltern lagen. Er beobachtete, wie sich bei Kreuzungen zwischen den Nachkommen Pflanzen ergaben, bei denen sich die ursprünglichen Farben der Eltern bei je einem Viertel der zweiten Generation (F2-Generation) wieder zeigten (herausmendelten, wie man heutzutage sagt).

Die Mendelschen Gesetze wurden 1900 von Correns (1864-1933), de Vries (1848-1935) und Tschermak (1871-1896) wiederentdeckt (Correns (1900), Vries (1900), Tschermak (1900)). Diesen abstrakten Erbfaktoren wurden dann die Chromosomen als ein konkretes Substrat zugeordnet. Bateson (1902) zeigte, daß sich die Mendel-Gesetze aus dem Verhalten der Chromosomen (vorher als *Kopplungsgruppen* bezeichnet)

net) bei der Zellteilung und Befruchtung ergeben.

F. Miescher (1844-1895), ein Zeitgenosse Mendels, entdeckte 1869 in Tübingen die Nukleinsäuren (Miescher (1871)). Es dauerte fast 80 Jahre, bis diese als Träger der Erbinformation erkannt wurden (Watson und Crick 1953, Watson (1969)). Als DNS-Doppelhelix erfüllt sie alle Anforderungen, die an die Erbsubstanz zu stellen ist. Bei Mutanten sind einzelne Erbfaktoren, die man Gene nennt, verändert. Die Reihenfolge der Nukleinsäuren des betreffenden Gens hat sich geändert. Wenn also bei einer rot blühenden Erbse durch eine Mutation¹ das Gen für die rote Blütenfarbe verändert wurde, wird der Farbstoff nicht mehr gebildet und die Blüte ist weiß.

Heute weiß man sehr viel über die Gene, wie sie aufgebaut sind, wie sie funktionieren und wie es vom Gen zum Phän kommt, also zum äußeren Ausdruck der Erbinformation (zum Beispiel zur roten Farbe der Blüten). Morgan (1866-1945, Nobelpreis 1933) hat bei seinen Untersuchungen gefunden, daß sich die Fruchtfliege *Drosophila* für genetische Untersuchungen besonders eignet (Morgan (1928)). Es gibt inzwischen zahlreiche Mutanten. Selbst bestimmte Verhaltensweisen dieser Fliegen können zum Teil auf bestimmte Gene zurückgeführt werden. Darüber mehr im Abschnitt 1.2.

¹die zufällig auftreten kann oder durch Bestrahlung mit UV-Licht oder durch 'mutagene Substanzen' induziert werden kann

1 Die Taufliege *Drosophila* als Modell-System der Genetiker

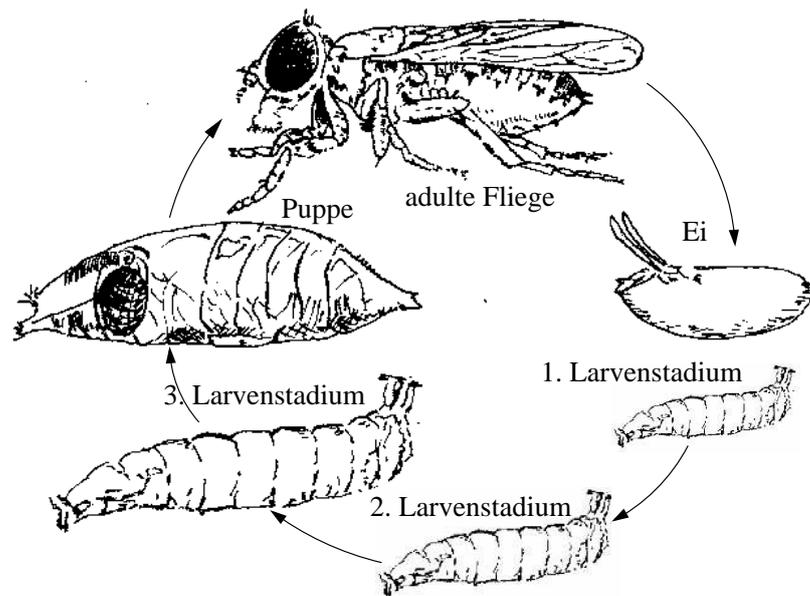
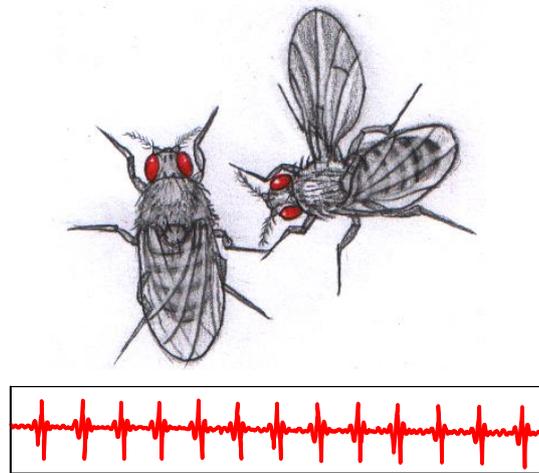


Abbildung 1.2: Lebenszyklus der Fruchtfliege *Drosophila*. Weibliche Fliege (oben) legt Eier (eins rechts gezeigt), aus denen Larven schlüpfen (drei Stadien, drittes Stadium links unten gezeigt). Sie verpuppen sich in einem Puparium (Mitte links) und verwandeln sich in eine Fliege (Metamorphose). Wenn sie fertig ist und die richtige Zeit erreicht wurde, drückt sie einen Deckel auf und schlüpft aus der Puppenhülle. Nach Geibel (1987)

1.1 Lebenslauf einer Taufliege

Fruchtfliegen *Drosophila* finden wir oft an faulem Obst. Die Männchen balzen vor den Weibchen in charakteristischer Weise (Abbildung 1.1). Nach der Kopulation suchen die Weibchen eine geeignete Stelle, um Eier abzulegen. Die Larven ernähren sich von Hefezellen, wachsen und häuten sich dreimal. Am Ende des vierten Larvenstadiums kriechen die Tiere aus dem Futter und suchen trockenere Stellen auf. Sie bilden eine Puppenhülle und in ihr wandelt sich die Larve in eine Fliege um. Sie drückt einen vorgeformten Deckel der Puppenhülle auf und gelangt ins Freie (Abbildung 1.2).



courtship | DROSZIRP | 27.3.2004

1.2 *Drosophila* -ein idealer Organismus für Genetiker, Biologen, Chronobiologen und Molekularbiologen

Drosophila ist ein ideales Objekt für Genetiker, Biologen, Chronobiologen² und Molekularbiologen³. Die Tiere sind klein, sodaß man sie in Glasflaschen im Labor in großen Mengen auf einem einfachen Nahrungs-Brei aufziehen kann. Sie sind aber groß genug, um ihr Verhalten gut beobachten zu können. Mutanten lassen sich durch mutagene Substanzen erzeugen, und es gibt inzwischen sehr viele davon. Selbst für das Verhalten hat man Mutanten gefunden, vor allem durch die bahnbrechenden Untersuchungen von Benzer (Benzer (1967)). Ei-

Abbildung 1.1: Balz und Kopulation der Fruchtfliege *Drosophila*. Männchen (rechts oben) balzt vor Weibchen in charakteristischer Weise, wobei auch das Vibrieren der Flügel (oberes Bild) wichtig ist. Mit einem guten Mikrophon kann man dabei einen Gesang hören. Seine Frequenz ist etwa 1/60 Sekunde. Das Muster des Gesangs ist als rote Kurve gezeigt. Erst nach dem komplizierten Vorspiel der Balz kommt es zur Kopulation mit dem Weibchen (unteres Bild, Weibchen unten). Gezeichnet von Mareike Förster nach Bildern in Greenspan (1995)

²in der Chronobiologie wird die Bedeutung der Zeit und periodischer Zeitabläufe für Organismen untersucht

³die Molekularbiologie versucht, die molekularen Grundlagen biologischer Vorgänge zu verstehen. Wie ist zum Beispiel ein Gen aufgebaut und wie kann es die Erbinformation kodieren und an die Nachkommen weitergeben.

1 Die Taufliege *Drosophila* als Modell-System der Genetiker

ner seiner Studenten, Konopka, hat Mutanten isoliert, deren Tagesuhren verändert waren (Konopka and Benzer (1971)). Bei einer dieser Mutanten ging die Tagesuhr schneller als im Wildtyp, bei einer anderen langsamer, und bei einer dritten war die Uhr defekt. Inzwischen haben auch die Molekularbiologen sehr intensiv diese Mutanten untersucht, um herauszufinden, wie die Uhren molekularbiologisch funktionieren könnten. Darüber mehr in Kapitel 5.

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

Bei der Taufliege *Drosophila* können wir verschiedene Rhythmen beobachten. Wenn sich im Puppenstadium aus den Maden die Fliegen gebildet haben, schlüpfen sie zu einer bestimmten Zeit des Tages aus der Puppenhülle. Durch eine innere Uhr wird ein Zeitfenster geöffnet. Nur während dieser Zeit kann eine Fliege schlüpfen und das ist vorteilhaft für die Tiere. Die Schlüpfuhr wird durch den Licht-Dunkel-Wechsel des Tages synchronisiert. Wir werden die dabei benutzten Licht-Rezeptoren kennenlernen.

Es gibt in den Südstaaten der USA die Fruchtfliegen-Art *Drosophila pseudoobscura*. Bei ihr wurde vor allem durch Pittendrigh¹ und seine Schüler untersucht, zu welchen Zeiten die Tiere schlüpfen (Pittendrigh (1993), Abbildung 2.1, Winfree (1986), Abbildung 2.2). Diese Art lebt in trockenen Gebieten. Die Larven kriechen am Ende des vierten Larvenstadiums in den Boden. In einer Tiefe von etwa 4 bis 10 cm verpuppen sie sich. So tief dringt kein Licht ein und Temperatur-Unterschiede zwischen Tag und Nacht sind gering. Die Larven wandeln sich in etwa 7 Tagen in eine fertige Fliege um. Sie schlüpft aus der Puppenhülle und kriecht zur Erdoberfläche. Dort härtet sich ihre Außenschicht (*Kutikula*) in den ersten Stunden und die Tiere können dann fliegen.

Die noch nicht ausgehärtete *Kutikula* läßt Wasser durch. Damit sie nicht austrocknen, müssen die Tiere zu einer Zeit schlüpfen, zu der die Luft noch feucht ist.

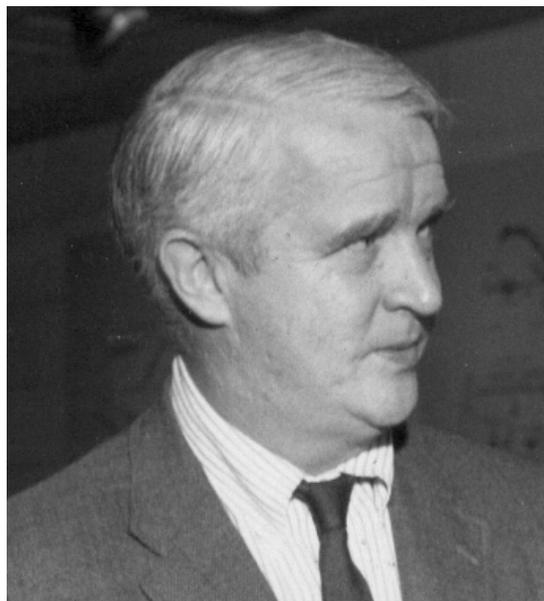


Abbildung 2.1: *Colin S. Pittendrigh, der ‘Darwin’sche Uhren-Beobachter’ (Selbstzeugnis). Universität Durham (England), Columbia Universität (New York, USA), Princeton Universität (New Jersey), Stanford Universität (Kalifornien). Aufnahme von 1967*

¹ein schottischer Name; wird *Pittendrigh* gesprochen

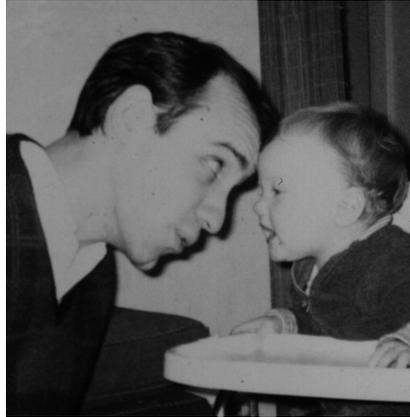


Abbildung 2.2: *Arthur Winfree studierte technische Physik an der Cornell Universität, nahm an einer Seereise des Forschungsschiffes RV Chain teil, Doktorarbeit 1970 an der Princeton Universität (New Jersey) bei Pittendrigh, danach Professor an der Purdue Universität, an der Universität von Californien in San Diego, und an der Universität von Arizona. Hier mit seinem Sohn Erik beim Autor in Tübingen*

Das ist am frühen Morgen der Fall. Eine innere Uhr sagt den neu gebildeten Fliegen irgendwie, daß jetzt die günstigste Tageszeit zum Schlüpfen kommt. Die Tiere öffnen in der Puppenhülle einen vorgeformten Deckel und können herausschlüpfen. Sie kriechen durch die Erde an die Oberfläche. Da die Puppen etwa 7 Tage im Boden sind, muß die Uhr ziemlich exakt sein und genau alle 24 Stunden ein Zeitfenster öffnen, in dem die Tiere schlüpfen können, sobald sie zu fertigen Fliegen entwickelt sind.

Wenn wir sehr viele Puppen beobachten, ist das Schlüpfen aus dem Puppengehäuse nicht gleichmäßig über den Tag verteilt. Es erfolgt vielmehr am frühen Morgen kurz nach Sonnenaufgang. Jede Fliege kann natürlich nur einmal schlüpfen. Sie benutzt dazu ein Zeitfenster von etwa 4 Stunden. Ist sie noch nicht schlüpfbereit, wartet sie bis zum nächsten Zeitfenster am folgenden Tag, um dann zu schlüpfen. [Abbildung 2.3](#) zeigt in der mittleren Kurve die Zahl der geschlüpften Tiere pro Stunde während einer Woche bei einer Temperatur von 21°C . Jeden Tag beobachten wir in den ersten vier Stunden nach Lichtbeginn hohe Schlüpfraten. Nachmittags und nachts schlüpfen keine Tiere.

2.1 Zeit zum Schlüpfen

Woher wissen die Tiere, daß es Zeit zum Schlüpfen ist? Zunächst müssen sie so weit entwickelt sein, daß die Fliege fertig ausgebildet ist. Außerdem müssen sie aber auch wissen, wann das tägliche Zeitfenster (früh am Morgen) zum Schlüpfen offen ist.

So, wie ein Detektiv sich verschiedene Möglichkeiten überlegt, wie ein Verbrechen geschehen ist, können auch wir uns überlegen, wie die Fliegen das Kunststück fertig bringen, zum richtigen Zeitpunkt zu

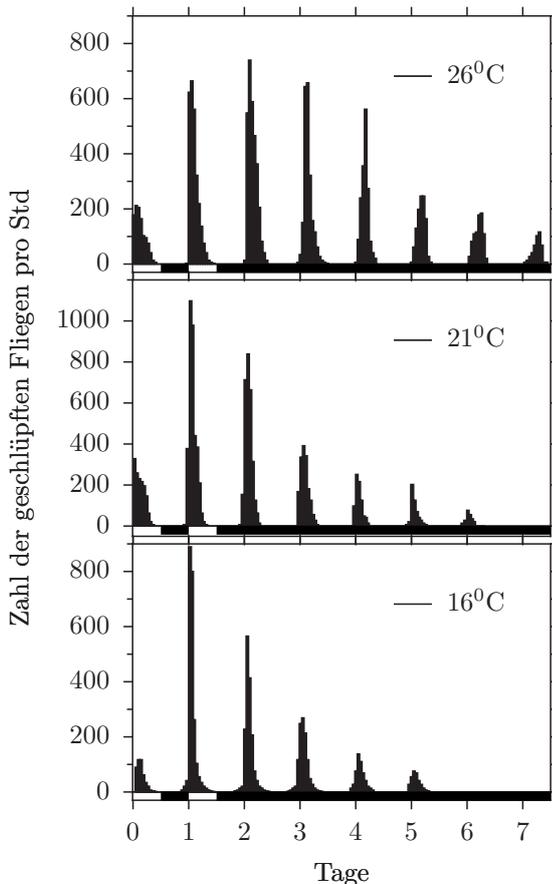


Abbildung 2.3: Zahl der geschlüpften *Drosophila*-Fliegen pro Stunde während einer Woche bei drei verschiedenen Temperaturen. Zunächst wurden die Kulturen für zwei Tage im 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gehalten. In den ersten vier Stunden nach Lichtbeginn hohe Schlüpfraten, nachmittags und nachts schlüpfen keine Tiere. Danach wurde das Schlüpfen in schwachem Dauer-Rotlicht gemessen. Die Fliegen schlüpfen weiterhin tagesperiodisch. Die Periodenlänge ist bei allen drei Temperaturen fast gleich und zeigt somit die Temperaturkompensation des Schlüpfrythmus. Nach [Maier \(1973\)](#)

schlüpfen und an die Oberfläche zu kriechen, wenn die Luft noch feucht ist und sie nicht austrocknen. Wissenschaftler bilden Hypothesen, um ein Problem (hier: Wie finden die Fliegen den richtigen Zeitpunkt zum Schlüpfen) zu lösen. Das wollen wir auch tun. Wie ein Detektiv müssen dann auch die Wissenschaftler ihre Hypothesen testen. Sie tun das meistens durch Experimente.

Hypothese 1: Mit der Morgensonne wird es wärmer. Die steigende Temperatur veranlasst die Tiere, die weit genug entwickelt sind, zu schlüpfen (oberes Diagramm in [Abbildung 2.4](#)).² Wir prüfen diese Hypothese in einem Raum mit konstanter Temperatur ([Abbildung 2.5](#)). Das Sonnenlicht ersetzen wir durch eine weiße Leuchtstoffröhre. Sie wird durch eine Schaltuhr für 12 Stunden angeschaltete und danach für 12 Stunden abgeschaltet. Ergebnis: Trotz konstanter Temperatur schlüpfen die Tiere weiterhin in den ersten Stunden nach Lichtbeginn. Die Tiere schlüpfen also nicht am Morgen, weil dann die Temperatur ansteigt.

Hypothese 2: Das Licht am Morgen ist für die erhöhte Schlüpfrate verantwortlich (mittleres Diagramm in [Abbildung 2.4](#)). Auch diese Hypothese ist überprüfbar ([Abbildung 2.5](#)). Wir bringen unterschiedlich alte Puppen, die in den nächsten Tagen schlüpfen werden, nach einer 12 stündigen Lichtperiode nicht in Dunkelheit, sondern in schwaches Rotlicht. Es bleibt während

²Allerdings sind in der Natur die Tiere in einer Tiefe von im Schnitt 7 cm verpuppt, und es dauert sicherlich einige Zeit, bis diese Bodenschicht von der Morgensonne aufgewärmt ist. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß diese Hypothese für Tiere im Freiland richtig ist. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß im Temperaturwechsel mit höheren Graden am Tage und niedrigeren in der Nacht das Schlüpfen getaktet (synchronisiert) wird.

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

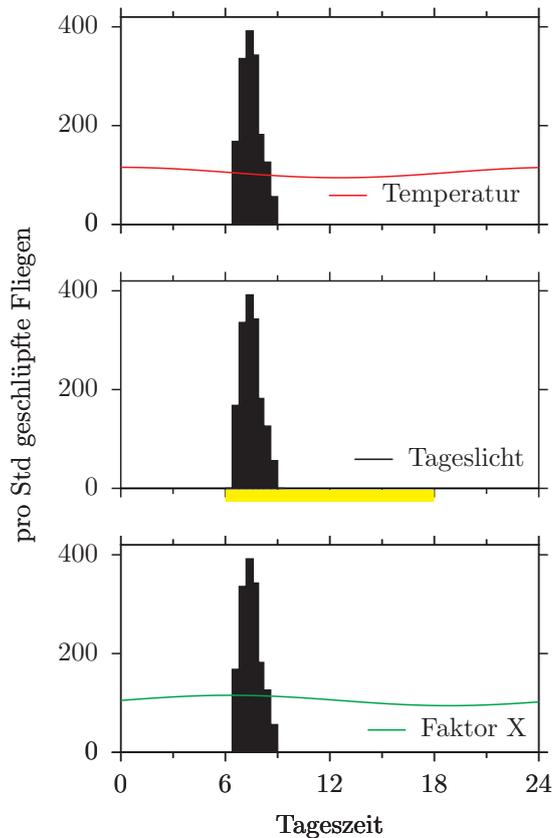


Abbildung 2.4: Warum schlüpft *Drosophila* zu bestimmten Zeiten? Hypothese 1: Eine bestimmte Temperatur (rote Kurve, oberes Diagramm) veranlasst die Tiere, die weit genug entwickelt sind, zu schlüpfen (graue Kurve). Hypothese 2: Das Licht am Morgen ist für die erhöhte Schlüpftrate (graue Kurve) verantwortlich (gelber Bereich, mittleres Diagramm). Hypothese 3: Die Tiere können Umweltfaktoren als Zeitgeber benutzen, die in unserer Kammer trotz konstanter Temperatur und Dauer-Rotlicht weiterhin im 24 Stunden Takt auftreten (Faktor X, grüne Kurve, unteres Diagramm)

der gesamten Beobachtungszeit einige Tage an. Für die Tiere ist das Rotlicht wie Dunkelheit (man nennt es auch Sicherheitslicht). Wir können aber das Schlüpfen der Tiere im Rotlicht beobachten. Erstaunlicherweise schlüpfen wieder viele Fliegen in einem vierstündigen Zeitfenster kurz nach der Zeit, zu der normalerweise das Weißlicht angegangen wäre. Und wenn wir einen weiteren Tag beobachten, finden wir 24 Stunden nach dem Schlüpfen ein weiteres Schlüpfmaximum. Es ist so, als ob die Tiere das Zeitfenster zum Schlüpfen auch ohne äußere Anhaltspunkte (oder *Zeitgeber*) benutzen können.

Hypothese 3: Die Tiere können Umweltfaktoren ('Faktor X') als Zeitgeber benutzen, die in unserer Kammer trotz konstanter Temperatur und Dauer-Rotlicht weiterhin im 24 Stunden Takt auftreten (unteres Diagramm in Abbildung 2.4). Zum Beispiel schwankt das Magnetfeld der Erde tagesperiodisch. Um diese Hypothese zu prüfen, geben wir unterschiedlich alten Puppen vor dem Schlüpfen einen umgekehrten Licht-Dunkel-Wechsel: Die 12 Stunden Lichtperiode wird zur Nachtzeit, die Dunkelperiode zur Tagzeit. Die Tiere schlüpfen jetzt bevorzugt in den ersten Stunden nach Beginn der künstlichen *Lichtperiode*, wenn also in der Natur Nacht ist (Abbildung 2.5). Wenn wir nun nach der umgekehrten Beleuchtung dauernd schwaches Rotlicht geben, schlüpfen die Tiere jeweils 24 Stunden nach den erhöhten Schlüpfraten des inversen Licht-Dunkel-Wechsels. Wären äußere Zeitgeber für das vierstündige Schlüpfmaximum verantwortlich, müssten diese im Dauer-Rotlicht das Schlüpfen auf die normale Schlüpfzeit bringen. Wir sehen also, daß ein Licht-Dunkel-Wechsel ein Zeitgeber für das Schlüpfen ist: Das rhythmische Schlüpfen läßt sich auf andere Tageszeiten verschieben. Aber unter konstanten Be-

2.1 Zeit zum Schlüpfen

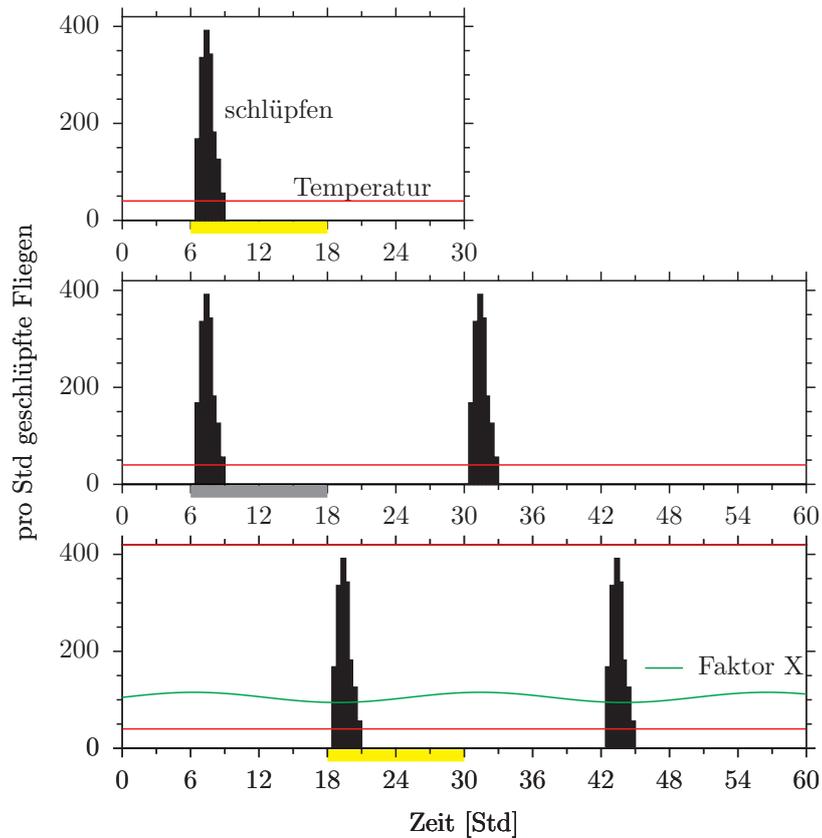


Abbildung 2.5: *Test der Hypothese 1 (oberer Teil): Wenn die Temperaturschwankungen im Laufe des Tages für das Schlüpfen verantwortlich wären, dürfte unter konstanten Temperaturen das Schlüpfen nicht mehr nur zu bestimmten Zeiten erfolgen. Die Tiere schlüpfen aber weiterhin in einem engen Zeitfenster zu Beginn der Lichtperiode.*

Test der Hypothese 2 (mittlerer Teil): Wenn die Lichtperiode für das Schlüpfen verantwortlich wäre, dürfte es ohne Lichtperiode nicht mehr nur zu bestimmten Zeiten erfolgen (die graue Kurve gibt den Zeitraum an, zu dem einen Tag vorher die Lichtperiode gegeben worden war). Es zeigt sich aber, daß die Tiere immer noch zu der gleichen Zeit schlüpfen und auch 24 Stunden später (zwischen 30. und 33. Stunde).

Test der Hypothese 3 (unterer Teil): Die Lichtperiode wurde 12 Stunden später als üblich gegeben (gelber Bereich). Es zeigt sich, daß dadurch der Schlüpfrythmus um 12 Stunden verschoben wird. Wenn der Faktor X (grüne Kurve) für das Schlüpfen verantwortlich wäre, müßten jedoch die Tiere zu den üblichen Zeiten schlüpfen.

Daraus folgt, daß die Tiere zu bestimmten Zeiten schlüpfen, die von einer inneren Uhr bestimmt werden. Die Uhr kann durch Licht verschoben werden (wie die untere Kurve zeigt)

dingungen läuft diese Rhythmik weiter. Es gibt keine versteckten Außenfaktoren wie zum Beispiel das tagesperiodisch schwankende Magnetfeld der Erde, die sie beeinflusst.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die Tiere zu bestimmten Zeiten schlüpfen, die von einer inneren Uhr bestimmt werden. Die Uhr kann durch Licht verschoben werden.

2.2 Eine Uhr zum Schlüpfen

Der vorige Abschnitt hat uns gezeigt: Die *Drosophila*-Fliegen besitzen innere Uhren, die das Schlüpfen nur in bestimmten Zeitfenstern im 24-Stunden-Takt erlauben. Diese Uhren können durch den Licht-Dunkel-Wechsel verschoben werden. Die Tiere brauchen diese innere Uhr, weil sie sich in einer Tiefe verpuppen, in der kein Licht zu sehen ist und Temperatur-Unterschiede nur gering sind. Da es 7 Tage dauert, bis die Larve sich in eine Fliege umgewandelt hat, muß die Uhr ziemlich genau sein und alle 24 Stunden das Zeitfenster öffnen. Übrigens ist die Schlüpfuhr von *Drosophila pseudoobscura* ein ganz seltener Fall, bei dem der Takt genau 24 Stunden ist. Wir werden später andere tagesperiodischen Uhren kennenlernen. Die meisten dieser Uhren laufen unter Konstantbedingungen nicht genau im 24-Stunden-Takt, sondern etwas schneller (zum Beispiel 23.4 Stunden) oder etwas langsamer (zum Beispiel 24.8 Stunden). Man spricht deshalb auch von circadian-Uhren.

Wir hatten auch gesehen, daß es keine versteckten Zeitgeber gibt, die das rhythmische Schlüpfen bewirken. Wenn man nämlich die Tiere in einem umgekehrten Licht-Dunkel-Wechsel hält, kehren sie ihren Schlüpfrythmus ebenfalls um und behalten ihn dann bei, wenn die Tiere dau-

ernd im Dunkeln (oder schwachem Rot als Sicherheitslicht) gehalten werden. Man hat in einer Station am Südpol ebenfalls tagesrhythmische Schlüpfen gefunden, obwohl dort im Sommer oder Winter praktisch keine Zeitgeber für den Tag-Nacht-Wechsel mehr existieren. Stattdessen ist im Sommer Dauerlicht, im Winter Dauerdunkel, und alle anderen physikalischen Größen, die sich an anderen Stellen der Erde tagesperiodisch ändern, sind konstant.

2.2.1 Mutanten: Schnelle und langsame Tanten

Obwohl die Schlüpfrythmik einen genauen 24-Stunden-Takt hat, gibt es auch bei ihr einen Hinweis darauf, dass es sich um eine innere Uhr handelt (bei einer Periodenlänge von genau 24 Stunden liegt immer der Verdacht nahe, dass ein versteckter Zeitgeber die Rhythmik treibt): Von *Drosophila* gibt es Mutanten, deren Uhr schneller (per^s), oder langsamer (per^l) läuft als beim Wildtyp. Das äußert sich in einem kürzer als 24 Stunden Takt (per^s) und einem länger als 24 Stunden Takt (per^l) des tagesperiodischen Schlüpfens. Das Schlüpfen wird also tatsächlich von einer inneren Uhr kontrolliert. Die Aktivitätsrhythmen der Mutanten-Populationen würden ebenfalls kürzere (für per^s), längere (für per^l) und arhythmische (für per^0) Muster zeigen (Abbildung 2.6). Wird das Uhren-Gen der Mutanten repariert, indem das funktionierende Gen des Wildtyps eingeschleußt wird, liegt auch der Schlüpfrythmus wieder normal bei genau 24 Stunden beziehungsweise nahe 24 Stunden beim Aktivitätsrhythmus.

Übrigens gibt es auch Mutanten, die früher als normal (*early*) oder später als normal (*late*) schlüpfen, obwohl die Periodenlänge der Schlüpfrythmik unter Konstantbedingungen genau 24 Stunden be-

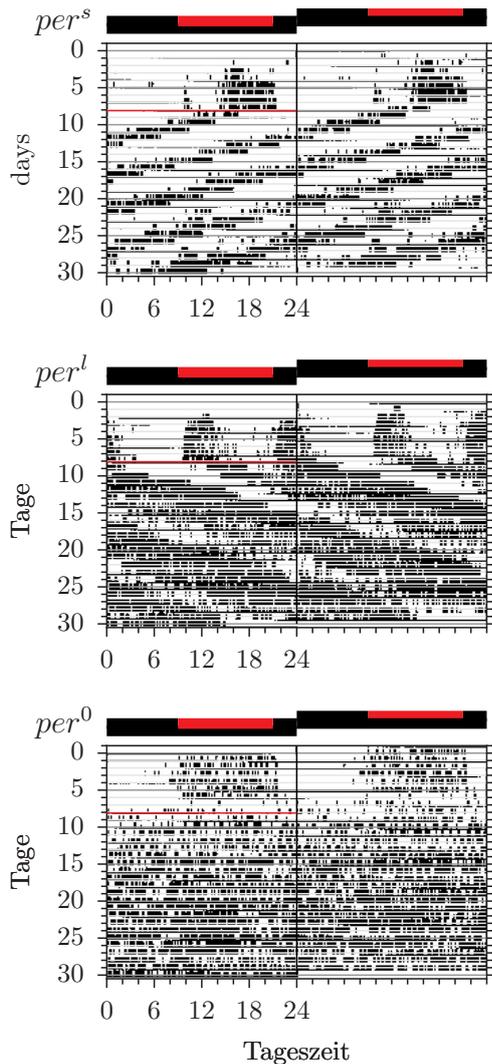


Abbildung 2.6: Schnelle (per^s), langsame (per^l) und arhythmische (per^0) Drosophila-Mutanten. Aktivitätsmuster je einer repräsentativen Fliege zunächst für eine Woche im Licht-Dunkel-Wechsel (LD, erste Zeile über dem jeweiligen Aktogramm mit schwarzen Balken für Dunkelheit und roten Balken für Licht) und dann von Tag 8 bis 30 im schwachen Rotlicht (DD, zweite Zeile über dem jeweiligen Aktogramm mit schwarzem Balken). Die Aktogramme zeigen die tägliche Aktivität der Fliegen von 0-24 Uhr. Der besseren Übersichtlichkeit halber wurde der Aktogramm-Block nochmals rechts um einen Tag nach oben verschoben aufgetragen, sodass auf Tag 1 Tag 2, auf Tag 2 Tag 3 und so weiter folgen. Auf der y-Achse sind die Tage aufgetragen. Nach [Helfrich-Förster \(2002\)](#)

trägt und damit normal ist (Abbildung 2.7). In diesem Fall hat die Mutation bewirkt, daß die Uhr anders an den Licht-Dunkel-Wechsel angekoppelt ist.

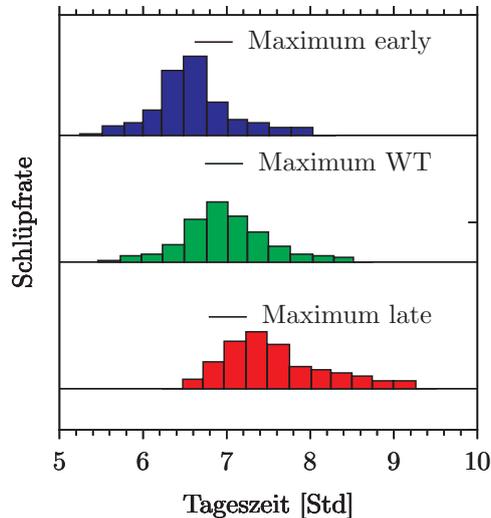


Abbildung 2.7: Früh und spät schlüpfende Drosophila-Mutanten. Aufgetragen ist das Schlüpfmuster von Fliegen-Populationen im Verlauf eines Tages. Die früh-schlüpfende Mutante ('early') hat ihr Schlüpf-Maximum der Fliegen aus den Puppenhüllen früher als der Wildtyp, die spät-schlüpfende Mutante ('late') später. Nach [Pittendrigh \(1981\)](#)

2.2.2 Augen der Schlußfuhr: Von Zeitgebern und Zeitnehmern

Es gibt bekanntlich Arbeitgeber und Arbeitnehmer. Der Arbeitgeber hat ein Unternehmen und gibt Leuten, die Geld verdienen wollen, Arbeit. Die Arbeiter sind die Arbeitnehmer. Für Lebewesen mit inneren Uhren gilt etwas ähnliches. Die inneren Uhren brauchen Zeitgeber in der Umwelt, damit sie immer im richtigen Takt mit dem 24-Stunden-Wechsel der Umwelt laufen. Würden diese Uhren keine Zeitgeber

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

haben, würden sie mit der Zeit aus dem Takt kommen, denn keine Uhr ist so genau, daß sie ohne Korrekturen auskommt. Außerdem muß eine Uhr ja auch einmal starten und dann auch gestellt werden.

Andererseits brauchen die Uhren auch Zeitnehmer, also Vorrichtungen, mit denen sie die Zeitgeber erkennen können. Die Zeitgeber-Signale müssen dann benutzt werden, um die Uhren zu stellen, wenn sie falsch liefen (Abb. 2.8).

Wir hatten auf Seite 17 gesehen, daß der Schlüpfrythmus durch einen Licht-Dunkel-Wechsel verschoben werden kann. Auch ein einzelner Lichtpuls verschiebt den Rhythmus des Schlüpfens, wenn er zum Beispiel schlüpfbereiten Puppen gegeben wird, die sich in dauernder Dunkelheit befinden. Der Licht-Dunkel-Wechsel und ein einzelner Lichtpuls sind also Zeitgeber. Es müssen aber auch Zeitnehmer vorhanden sein, die das Lichtsignal an die Uhr weiterleiten, durch die das Schlüpfen gesteuert wird. Wie finden wir heraus, welche Lichtrezeptoren das sind?

Die übliche Methode ist, ein *Aktionsspektrum* aufzustellen und dieses mit bekannten *Absorptionsspektren* verschiedener Pigmente (Farbstoffe) zu vergleichen. Ein Aktionsspektrum erhält man folgendermaßen: Farblicht wird auf den Organismus eingestrahlt und der Effekt (*'Aktion'*) gemessen. Je stärker eine bestimmte Farbe (wissenschaftlich: *Wellenlänge*) wirkt, umso weniger Lichtenergie ist nötig, um den Effekt zu erhalten.

Wie erhält man ein Aktionsspektrum im Fall des Schlüpfrythmus? Wir wissen, daß ein Lichtpuls den Schlüpfrythmus verschiebt. Wir verwenden nun verschiedenes Farblicht mit unterschiedlichen Intensitäten und bestimmen für jede Wellenlänge die Verschiebung (Abbildung 2.11). Je höher die Lichtintensität, umso stärker die

Verschiebung. Wir können nun die Menge Licht einer bestimmten Farbe bestimmen, die den Rhythmus zum Beispiel um vier Stunden verschiebt. Wenn wir das für viele Wellenlängen machen und die Werte in einem Diagramm eintragen, erhalten wir ein Aktionsspektrum (Abbildung 2.12). Als nächstes vergleichen wir es mit dem Absorptionsspektrum verschiedener bekannter Pigmente. Wenn wir nun finden, daß unser Aktionsspektrum dem Absorptionsspektrum von Flavin gleicht, ist es wahrscheinlich, daß dieses für die Verschiebung des Schlüpfrythmus durch Licht verantwortlich ist.

Die Wirkung des Lichtes hängt davon ab, wie stark der Puls ist und zu welchem Zeitpunkt er die Fliege trifft (Abbildung 2.9, Abbildung 2.10). Zur subjektiven Mitternacht³ ist die Verschiebung des Rhythmus am stärksten, wenn der Lichtpuls stark ist.

Weil die Wirkung eines Licht- oder Temperaturpulses auf den Tagesrhythmus davon abhängt, wann er gegeben wird, muß man sich einen bestimmten Zeitpunkt aussuchen (zum Beispiel eine Stunde vor der subjektiven Mitternacht). Tut man das nicht und benutzt unterschiedliche Zeiten, wirken die Pulse verschieden, ohne daß die Lichtstärke variiert wurde.

³Im Licht-Dunkel-Wechsel mit einer Lichtperiode von 6 bis 18 Uhr und einer Dunkelperiode von 18 bis 6 Uhr wäre Mitternacht um 24 Uhr. Befindet sich der Organismus, dessen circadianen Rhythmus wir untersuchen, unter konstanten Bedingungen, kann der Mitternachts-Zeitpunkt durchaus zu einer anderen Zeit liegen. Wird zum Beispiel ein inverser Licht-Dunkel-Wechsel gegeben mit der Dunkelperiode am Tag, wäre die *subjektive* Mitternacht um 12 Uhr Mittags.

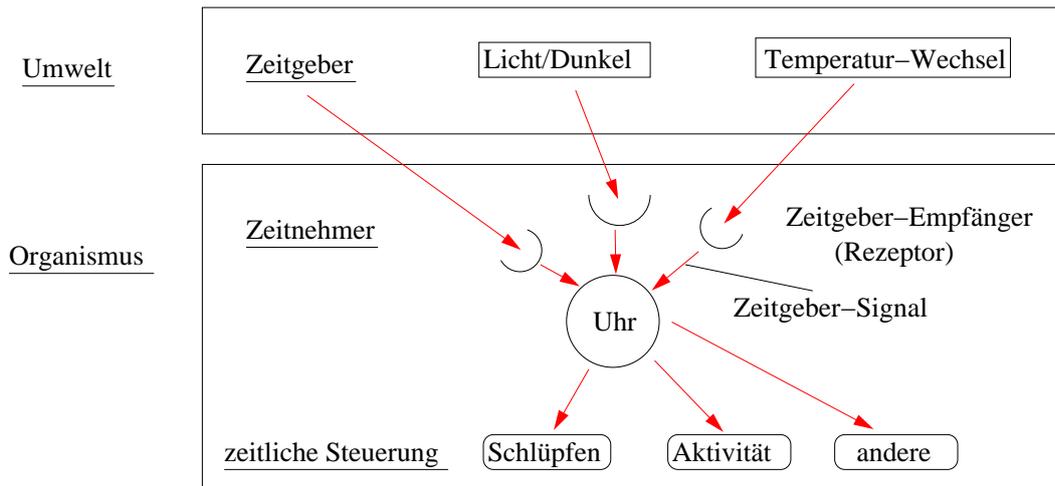


Abbildung 2.8: Zeitgeber in der Umwelt wie der Licht-Dunkel-Wechsel oder periodische Schwankungen der Temperatur werden vom Organismus über Zeitnehmer empfangen. Dazu dienen Rezeptoren, die zum Beispiel das Licht absorbieren. Die Zeitgebersignale werden an die Uhr weitergeleitet und stellen diese, falls sie nicht im richtigen Takt mit der Umwelt ist. Die Uhr steuert Vorgänge wie das Schlüpfen der Fliegen aus dem Puparium oder die Lauf-Aktivität der Fliegen

2.2.3 Temperatur-Kompensation der Schlüpfuhr

Uhren müssen ein Uhrwerk haben und sie müssen einzustellen sein. Sie brauchen aber noch eine andere Eigenschaft: Bei höherer Temperatur dürfen sie nicht schneller, bei niedrigerer Temperatur nicht langsamer laufen. Das findet man auch tatsächlich bei der Schlüpfrythmik (Abbildung 2.3): Das rhythmische Schlüpfen der Fliegen erfolgt unabhängig von der Umgebungstemperatur immer im 24-Stunden Takt (Pittendrigh (1954)). Trotzdem kann die Temperatur einen Einfluss auf das Schlüpfen haben. Gibt man Puppen im Dauerrotlicht einen 12:12 Stunden Temperaturwechsel (von beispielsweise $25^{\circ}/20^{\circ}\text{C}$), kann der Schlüpfrythmus dadurch synchronisiert werden (Abbildung 2.13). Wie beim Licht ein einzelner Lichtpuls kann bei der Temperatur auch ein einzelner Tem-

peraturpuls (zum Beispiel von 3 Stunden) den Rhythmus unter Konstantbedingungen verschieben.

2.3 Made oder Fliege?

Im Gegensatz zu den Wirbeltieren haben Insekten kein inneres Skelett, sondern ein Außenskelett. Es besteht aus Chitin, ist hart und schlagfest und schützt die Tiere vor Wasserverlust. Aber es kann sich nicht stark ausdehnen. Deshalb müssen sich Insekten häuten, wenn sie eine Weile gefressen haben und gewachsen sind. Sie durchlaufen verschiedene Larvenstadien. Bei den ursprünglichen Insekten sehen die Larvenstadien und die erwachsenen Tiere sehr ähnlich aus. Nur die äußeren Geschlechtsorgane und bei manchen Insekten die Flügel werden bei der Häutung vom letzten Larvenstadium zum ausgewachsenen In-

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

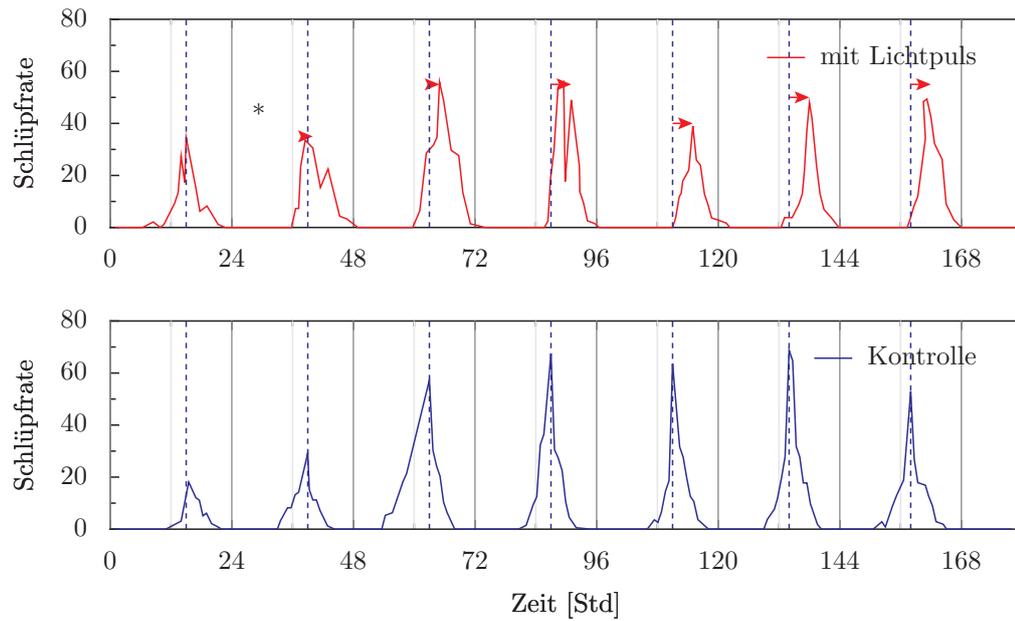


Abbildung 2.9: Ein Lichtpuls verschiebt den circadianen Schlüpfrythmus von *Drosophila pseudoobscura*. Untere Kurve: Kontrolle ohne Lichtpuls. Obere Kurve: Ein zu einer bestimmten Zeit (*) gegebener Lichtpuls verschiebt die Schlüpfmaxima gegenüber den entsprechenden Maxima der Kontrollen (gestrichelte blaue Linien), wie die roten Pfeile zeigen (um 1,2,4,4,4,4 Stunden)

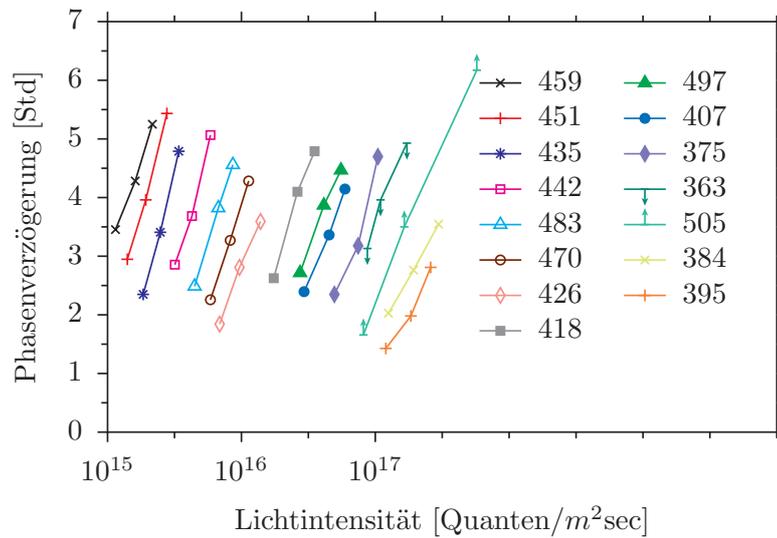


Abbildung 2.11: *Dosis-Effekt Kurven der Phasenverschiebung des Schlüpfens von Drosophila: Verschiedene Lichtintensitäten (x -Achse, in Zahl der Lichtquanten pro Quadratmeter und Sekunde) unterschiedlicher Wellenlängen (siehe die Zahlen an den Kurven, in Nanometer) wurden benutzt, um Gruppen von Puppen zu einer bestimmten Phase ihres circadianen Rhythmus (CT 17) zu bestrahlen. Zu diesem Zeitpunkt werden Phasenverzögerungen induziert, und höhere Intensitäten (mehr Quanten) verschieben stärker, wie die Steigung der Kurven zeigt. Bestimmte Wellenlängen wie 459 und 451 nm sind wirksamer als andere (zum Beispiel 384 und 395 nm). Das zeigt sich in der geringeren Zahl von Lichtquanten, die zur Phasenverschiebung nötig sind. Die x -Achse ist logarithmisch. Solche Daten sind Grundlage für das Aktionsspektrum in [Abbildung 2.12](#). Einzelheiten in [Helfrich-Förster and Engelmann \(2002\)](#)*

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

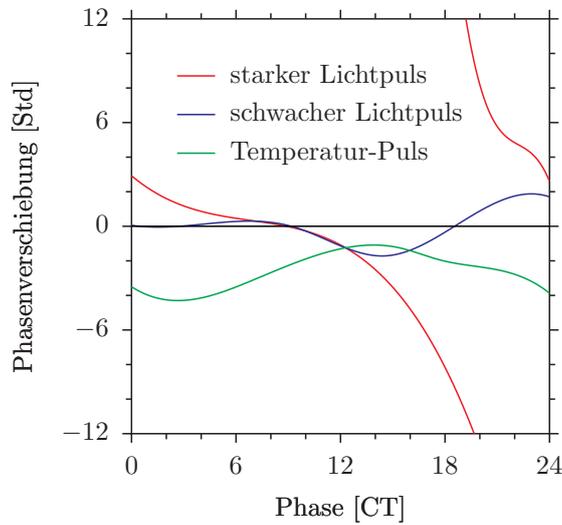


Abbildung 2.10: Wie *Drosophila* in einem Tag unterschiedlich auf Lichtpulse und Temperaturpulse reagiert: Viele Experimente in der Art, wie in Abbildung 2.9 gezeigt, wurden durchgeführt, um die rote und blaue Phasenresponsekurve zu erhalten. Die Lichtpulse wurden dabei zu verschiedenen Zeiten ('Phasen') im circadianen Zyklus (x-Achse, in circadianer Zeit CT angegeben) gegeben. Die Phasenverschiebungen des Lichtpulses wurden als Funktion der Phase auf der y-Achse aufgetragen. Verfrüht der Lichtpuls den Rhythmus, liegen die Werte oberhalb der Null-Linie, verzögert er, liegen sie unterhalb. Starke Lichtpulse ergeben eine starke Phasenresponsekurve (rote Kurve) und schwache Lichtpulse eine schwache Phasenresponsekurve (blaue Kurve). Die grüne Kurve gibt die Phasen-verschiebende Wirkung eines Temperaturpulses wieder

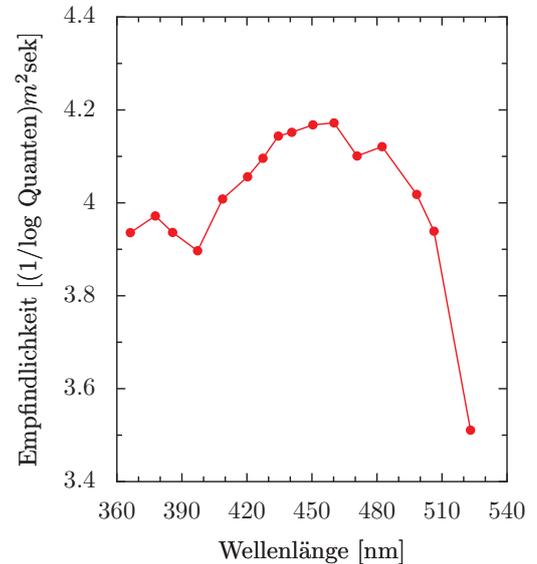


Abbildung 2.12: Aktionsspektrum Phasenverschiebenden Lichtes beim Schlüpfrythmus von *Drosophila*: Die Zahl der Quanten, die nötig sind, um den Rhythmus um vier Stunden zu verschieben, wurde aus Abbildung 2.11 abgelesen. Die reziproken Werte (also 1/Wert) wurden als Maß für die Empfindlichkeit auf der y-Achse gegen die Wellenlängen (x-Achse) aufgetragen. 360 bis 390 nm: UV-Licht, 400 bis 480 nm: Blaulicht. 510: Grünes Licht. Längere Wellenlängen (rotes Licht) sind wirkungslos. Einzelheiten in [Helfrich-Förster and Engelmann \(2002\)](#)

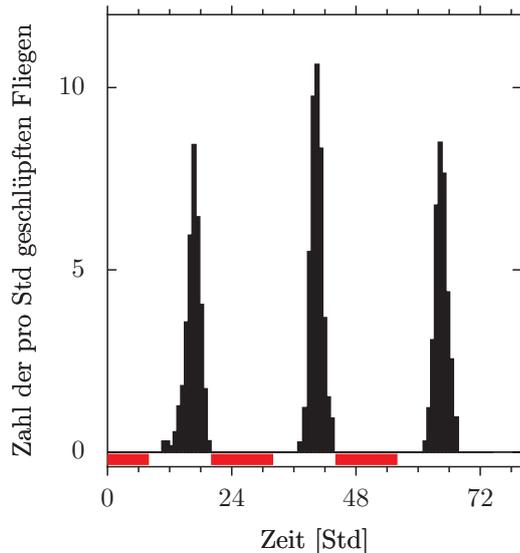


Abbildung 2.13: Ein 12:12 Stunden Temperaturwechsel von $25^{\circ}/20^{\circ}C$ (rot/weiss) synchronisiert den Schlüpfrythmus (schwarze Verteilung) von *Drosophila pseudoobscura*. Die Larven und Puppen wurden unter Dauer-Rotlicht gehalten. x-Achse: Zeit in Stunden. Nach Zimmerman et al. (1968)

sekt noch gebildet. Wanzen und Heuschrecken sind Beispiele für diese *hemimetabolen Insekten*.

Bei den *holometabolen Insekten* sehen die Larvenstadien untereinander ähnlich aus, verwandeln sich aber nach der letzten Häutung völlig. Das geschieht in einem besonderen Puppenstadium. Hier wird aus der Fliegenmade eine Fliege, aus der Raupe ein Schmetterling, aus dem Engerling ein Käfer. Es sind also zwei verschiedene Dinge, die bei der Entwicklung einer Fliege ablaufen: *Larvales Wachstum* und *Metamorphose*. Die Larven wachsen, häuten sich, wachsen, häuten sich, bis sie nach dem vierten Larvenstadium eine Puppe bilden, die nicht mehr frisst. In der Puppe verwandelt sich die Made in die Fliege. Man nennt diesen Vorgang Metamorphose.

Wie kommt es nun zur Larvenhäutung? Und wieso wird bei der letzten Häutung zur Fliege eine Puppe gebildet und in dieser die Larve in die Fliege umgewandelt, die sich so stark in ihrer Gestalt und ihrem Bau von der Made unterscheidet?

Bei der Häutung müssen sehr viele verschiedene Aufgaben koordiniert werden. Alle Zellen unter der Kutikula (*Epidermiszellen*), die oberste Zellschicht des Vorder- und Hinterdarmes (*Epithel*) und die Innenauskleidung des Atemsystems (*Tracheen*) müssen neu gebildet werden und die alten abgehoben und abgestreift (gehäutet) werden. Es gibt vorgebildete Bruchlinien (*Häutungsnähte*), an denen die alte Haut aufplatzt.

Noch komplizierter ist es bei der Metamorphose der Made zur Fliege im Puppenstadium. Aus *Imaginalscheiben* und *Imaginalanlagen* im letzten Larvenstadium entwickeln sich die Beine, Flügel, Antennen und Geschlechtsorgane. Die vorletzte Larvenhaut wird nicht abgestreift, sondern zum Puparium umgewandelt. Abbildung

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

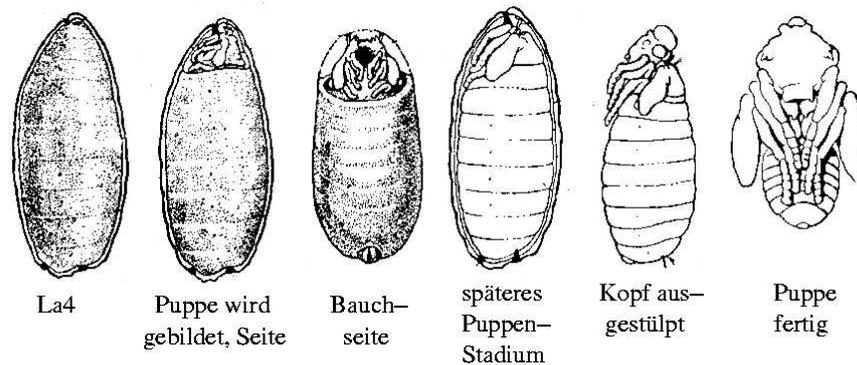


Abbildung 2.14: Umwandlung einer Made der Fruchtfliege *Rhagoletis pomonella* in eine Fliege. Von links nach rechts: 1. Viertes Larvenstadium (*La4*), von der Kutikula des dritten Stadiums umhüllt. 2. Puppe bildet sich (seitliche Ansicht). 3. Puppe von der Bauchseite. 4. Fliegen-Kopf kurz vor dem Ausstülpen und 5. nach dem Ausstülpen. 6. Puppe fertig entwickelt. In 5. und 6. sieht man die Kopfblase, mit der die Puppenhülle durchstossen wird. Sie bildet sich nach dem Schlüpfen zurück. Nach [Weber \(1954\)](#)

[2.14](#) zeigt diese Veränderung in einer Serie von Bildern. Auch im Körper gibt es zahlreiche Umwandlungen. Zum Beispiel werden die Muskeln der Made in Fliegenmuskeln umgewandelt. Die Fliege färbt sich dunkel. Schließlich schlüpft die Fliege aus der Puppenhülle, indem sie mit einer Kopfblase⁴ einen Deckel aufdrückt und durch die Öffnung schlüpft. Sie pumpt Blut in die Flügel, die sich dadurch ausbreiten. Die Kutikula härtet aus und die Fliege kann jetzt fliegen.

Bei der Koordination aller dieser Vorgänge spielt die Nachbarschaft eine Rolle (zum Beispiel Muskeln und Nerven), Hormone selbständiger Drüsen und neuroendokrine Zellen im Gehirn. Auch Nervenimpulse sind beteiligt.

Je nachdem, wie die Hormone zusammenspielen, kommt es zur Larvenhäutung oder zur Metamorphose. Das sollten wir

⁴die Kopfblase ist eine Ausstülpung in der Stirngegend und bildet sich nach dem Schlüpfen wieder zurück

uns jetzt etwas genauer ansehen.

Zunächst einmal müssen die Fliegenmaden sich mehrfach häuten (man nennt das auch *Ecdysis*), weil die alte Kutikula zu eng geworden ist. Dabei passiert einiges im Körper der Tiere. Auch Hormone spielen dabei eine wichtige Rolle. Beteiligt sind 20E, PTTH, EH, ETH und CCAP (Übersicht: [Gade et al. \(1997\)](#)). Die Namen dieser Hormone sind hier nur abgekürzt.⁵ Die Steuerung dieser ganzen Vorgänge wird im Gehirn der Maden durch besondere Zellen bewerkstelligt.

Das Gehirn einer Larve mit Gehirnzellen, die PER und TIM exprimieren -vier kleine LN_v , zwei DN_1 , und zwei DN_2 und ihre Projektionen sind in [Abbildung 2.15](#) dargestellt.

⁵20E: 20-Hydroxy-Ecdyson ([Riddiford \(1983\)](#)), PTTH: prothoracitropes Hormone, EH: Häutungs- oder Ecdysis-Hormon ([Truman \(1992\)](#)), ETH: Ecdysis-auslösendes Hormon ([Zitnan et al. \(1993\)](#)) und CCAP: Crustacean-cardioaktives Peptid ([Ewer and Truman \(1996\)](#), [Green and Tobin \(1999\)](#)).

2.3.1 Eine Fliege fährt aus der Haut

Nach dem letzten Larvenstadium verpuppen sich die Tiere und wandeln sich während der Metamorphose in eine Fliege um. Das ist ein sehr kompliziertes Zusammenspiel verschiedenster Hormone und Neurotransmitter im Kopf und Körper. Es ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt.

Wenn dann die Fliege ausgebildet ist, muß sie aus der Puppenhülle schlüpfen. Auch das ist ein kompliziertes Spiel und ebenfalls noch nicht völlig verstanden. Das Gehirn ist in Abbildung 2.16 schematisch dargestellt. Es sind die Mitspieler dargestellt, die zum erfolgreichen Schlüpfen der Fliege aus der Puppenhülle führen. Zum einen muß das Schlüpfen vorbereitet und durchgeführt werden, zum anderen muß es durch die circadiane Uhr zeitlich koordiniert werden. Zunächst die Vorbereitung zum Schlüpfen:

In der *Pars intercerebralis* und der *Pars lateralis* des Zentralgehirns gibt es neurosekretorische Zellen. Sie funktionieren sowohl als Nerven wie auch als Drüsen. Sie geben PTTH und EH⁶ ab. Durch PTTH wird weniger 20E in den Prothorakaldrüsen produziert. Zusammen mit ETH von den Inka-Zellen der epitachealen Drüsen⁷ im Abdomen (Zitnan et al. (1993)) induzieren PTTH und EH die Häutung. EH und ETH stimulieren die neurosekretorischen CCAP Zellen. Diese befinden sich im Unterschlundganglion und im Nervensystem der Segmente des Brustabschnittes (Thorax) und des Hinterleibs (Abdomen). CCAP wird nur zu bestimmten Zeiten abgegeben und moduliert die Muskelkontraktionen so, daß die Tiere schließlich schlüpfen (Gammie and Truman (1997)).

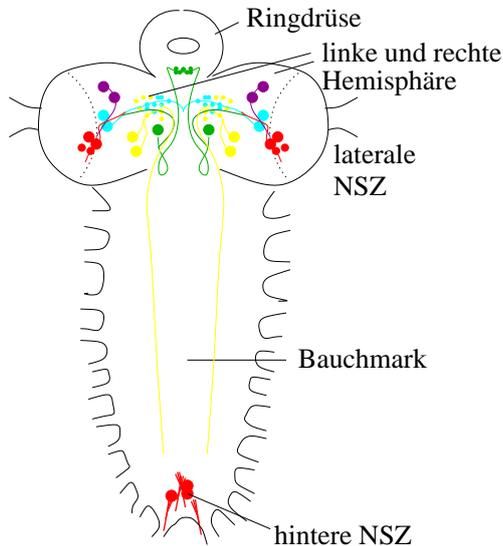


Abbildung 2.15: Nervensystem einer 13 Stunden alten Larve von *Drosophila* von oben mit den beiden Hemisphären (Gehirnhälften) und der Ringdrüse (oben) und darunter das längliche Bauchmark mit neurosekretorischen Zellen am hinteren Ende. Gehirnzellen, die PER und TIM exprimieren -vier kleine LN_v, rot, zwei DN₂, lila, und zwei DN₂, hellblau- und ihre Projektionen. Lichtsignale gelangen von den larvalen Augen über den Bolwig-Nerv (gelb) zu den sLN_v. Nach Helfrich-Förster (1997) und Helfrich-Förster (2003a)

⁶EH liegt in drei verschiedenen Neuropeptiden vor

⁷Drüsen, die auf den Tracheen liegen. Die Tracheen sind das Atemsystem der Insekten

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

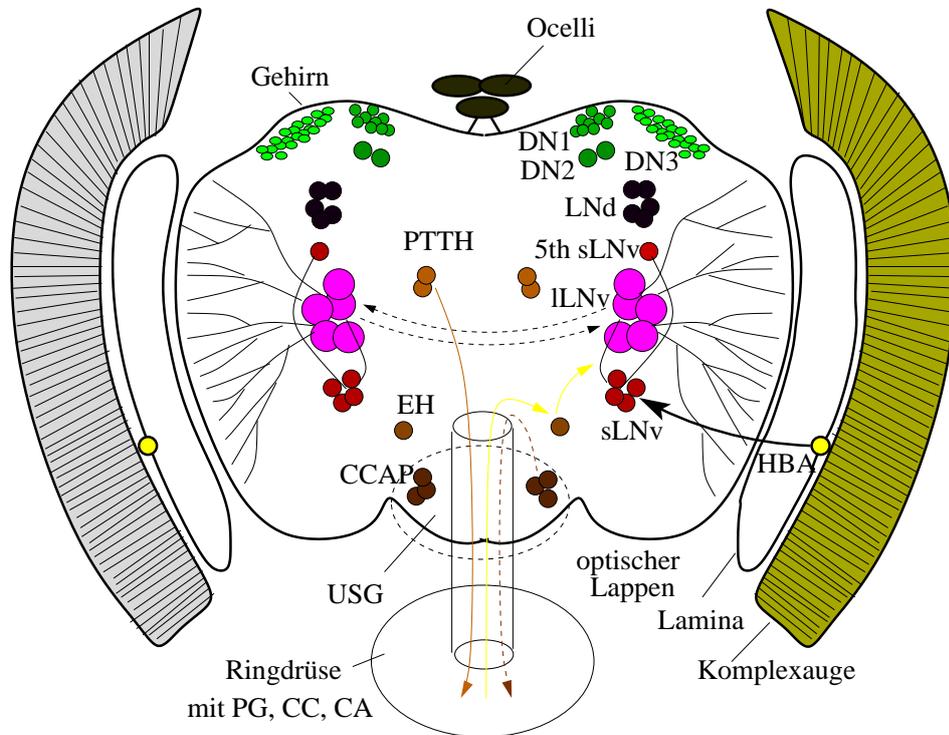


Abbildung 2.16: Kontrolle des Schlüpfens von *Drosophila* durch Zellgruppen im Gehirn. Für die Kontrolle des Schlüpfens entscheidend sind PTTH und EH im Gehirn, CCAP im Unterschlundganglion USG (gepunktete Ellipse), PG, CA und CC in der Ringdrüse). Das circadiane System besteht aus den sLNv (rot) und den ILNv (violett). Es ist mit den LNd-Zellgruppen, den DN1, DN2 und den DN3-Zellgruppen verbunden und auch mit den Strukturen, die für das Schlüpfen zuständig sind (PTTH, EH, CCAP). Licht kann über Photorezeptoren (Komplexauge, Ozellen und Hofbauer-Buchner-Äugelchen HBA, golden und gelb) den Schlüpfrythmus synchronisieren (siehe Abbildung 4.1). Da das Bild verwirren kann, sind die wichtigsten Schritte bei der Kontrolle des Schlüpfens in Abbildung 2.17 dargestellt. Nach Myers et al. (2003) und Helfrich-Förster (2003a)

Die wichtigsten Vorgänge sind in Abbildung 2.17 dargestellt. Hier wird auch gezeigt, an welchen Stellen die circadiane Uhr angreift (roter Kreis mit Schwingung). Sie kontrolliert im Gehirn zweierlei:

1. die Abgabe des Prothorakotropen Hormons von den PTTH-Zellen
2. die Abgabe des Schlüpfhormons EH von den EH-Zellen.

Die PTTH-Zellen und die EH-Zellen sind bei *Drosophila* im Zentral-Gehirn lokalisiert (Abbildung 2.16). Die circadiane Uhr ist in den sLNv (rote Zellen in Abbildung 2.16) lokalisiert. Die abgehenden Nerven der circadianen Uhrenzellen im s-LNV überlappen sich mit Fasern der EH-Zellen (Blanchardon et al. (2001)) und innervieren wahrscheinlich auch die PTTH-Zellen (Zitnan et al. (1993)). Auch die CCAP-Neuronen im Unterschlundganglion könnten mit den Uhrenzellen in Kontakt treten (Abbildung 6A,B in Zhang et al. (2000)). Außerdem überlappen Fasern der DN2 mit den CCAP-Fasern (Park et al. (2003)). Es sind aber auch noch andere Wege beteiligt, da die Fliegen auch noch rhythmisch schlüpfen, nachdem die EH-Neuronen entfernt wurden (McNabb et al. (1997)). Die Prothorakaldrüsen PG kommen dafür als Kandidaten in Frage, da sie einen circadianen Rhythmus zeigen (Emery et al. (1997)). Offenbar wird also das Schlüpfen über mehrere parallele Wege tagesperiodisch (circadian) kontrolliert.

Resultat dieser ganzen Vorgänge ist, daß die Fliegen nur in einem bestimmten Zeitfenster unmittelbar nach Beginn der Lichtperiode am Morgen schlüpfen (Abbildung 2.17). Die Männchen schlüpfen etwas früher als die Weibchen. Wir hatten schon früher gesehen, daß nicht der Beginn des Lichtes das Schlüpfen der fertigen Fliegen aus

der Puppenhülle induziert, sondern eine innere Uhr (Abbildung 2.3).

2 Schlüpfen in Zeitfenstern

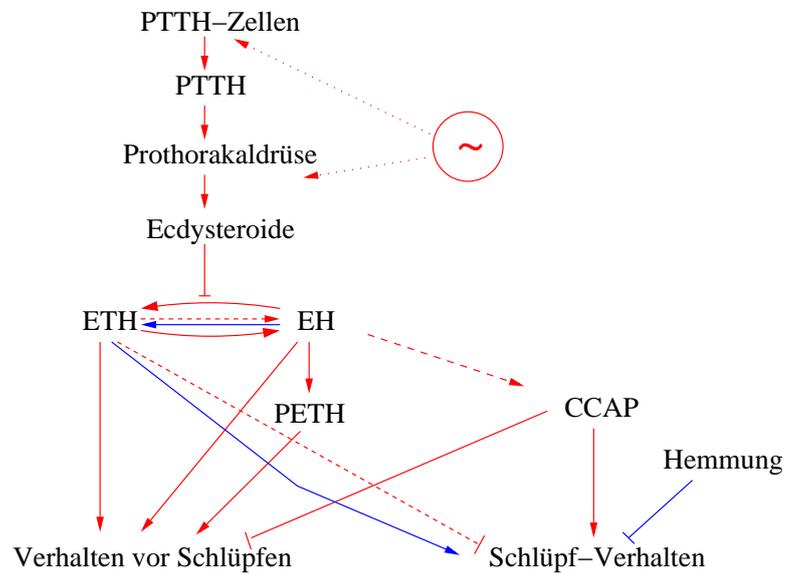


Abbildung 2.17: Ereignisse, die zur Häutung und zum Schlüpfen führen, und ihre zeitliche Kontrolle durch eine circadiane Uhr (roter Kreis mit Oszillation und gepunktete Pfeile, da unsicher). Es sind zwei Modelle gezeigt. Durchgezogene rote Pfade sind beiden Modellen gemeinsam. Besonderheiten des Modells 1 sind rot gestrichelt, Besonderheiten des Modells 2 sind blau gezeichnet. Ein Paar neurosekretorischer PTTH-Zellen in der Pars intercerebralis des Fliegenhirns in der Puppe geben PTTH (ein Neuropeptid) ab. Es bewirkt, daß die Prothorakaldrüse Ecdysteroide an die Hämolymphe abgibt. Vor einer Häutung ist die Konzentration zunächst hoch, um dann stark abzunehmen. Häutung und Schlüpfen kann erst beginnen, wenn die Ecdysteroide eine niedrige Konzentration im Tier haben. Das Schlüpf-induzierendes Hormon ETH von den Inka-Zellen der epitachealen Drüsen im Hinterleib und das Schlüpfhormon EH stimulieren die neurosekretorischen CCAP-Zellen im Unterschlund-Ganglion und im Nervensystem der Brust und des Hinterleibs, sodaß CCAP abgegeben wird. Es beendet das Verhalten vor dem Schlüpfen und beeinflusst die Muskelkontraktionen, die schließlich zum Schlüpfen der Tiere führen. Nach [Myers et al. \(2003\)](#)

3 Wie wird der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert?

Auch die Laufaktivität wird durch eine innere Uhr gesteuert und über verschiedene Lichtrezeptoren synchronisiert. Unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen läuft der Rhythmus weiter. Die Periodenlänge ist aber bei den einzelnen Fliegen nicht mehr genau 24 Stunden, sondern etwas kürzer oder länger. Außerdem hängt sie auch von der Lichtintensität ab. Verschiedene Mutanten wurden isoliert, deren Tagesrhythmen verändert sind. Genetische und molekularbiologische Methoden wurden eingesetzt, um herauszufinden, wie die circadianen Mechanismen funktionieren. Bestimmte neurosekretorische Zellen im Gehirn sind die Zentren, welche die lokomotorische Aktivität steuern. Schlaf-ähnliches Verhalten wurde bei Drosophila beobachtet und untersucht.

Wir werden kennenlernen, wie man den Schlüpfrythmus und die lokomotorische Aktivität registriert und analysiert.

3.1 Von der inneren Uhr zu den Beinen

Im letzten Abschnitt hatten wir gelernt, daß Fruchtfliegen zu bestimmten Zeiten des Tages schlüpfen und eine Uhr dafür zuständig ist. Wenn die Fliege geschlüpft ist und ihre Kutikula hart geworden ist, kann sie herumlaufen und fliegen. Fruchtfliegen sind ausgesprochene Augentiere und deshalb am Tage aktiv. Darin ähneln sie den Menschen (jedenfalls den meisten). In der

Nacht ruhen sie. Man hat sogar zeigen können, daß sie dann schlafen (Shaw (2003), Hendricks et al. (2000)). Auch die *lokomotorische Aktivität* (herumlaufen und fliegen) von *Drosophila* wird von einer circadianen Uhr kontrolliert. Sie kann mit Infrarot-Lichtschranken gemessen werden. Abbildung 3.1 zeigt die Aktivität eines Tieres. Es war zunächst für drei Tage in einem Wechsel von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (LD 12:12). Fliegen sind nur während der Lichtperiode aktiv. Der Licht-Dunkel-Wechsel hat die Uhr synchronisiert, die die lokomotorische Aktivität kontrolliert. Danach wurde die Fliege in schwachem Dauer-Rotlicht gehalten. Jetzt zeigt sich die endogene Natur der Uhr: Da die Periodenlänge nicht genau 24 Stunden beträgt (im Gegensatz zum Schlüpfrythmus), beginnt die Aktivität jeden Tag etwas später (bei dieser Fliege; eine andere könnte eine schnellere Uhr haben und deshalb jeden Tag etwas *früher* aktiv werden). Die Periodenlänge des Rhythmus beträgt in diesem Beispiel 24.6 Stunden.

Die Periodenlänge lässt sich beeinflussen, wenn die Lichtintensität verändert wird¹ (Konopka et al. (1989)). Das war bei der Temperatur anders: Wurde diese variiert, blieb die Periodenlänge (beinahe) konstant. Diese *Temperaturkompensation* ist schon beim Schlüpfrythmus besprochen worden und eine charakteristische Eigenschaft cir-

¹sie muß aber gering sein: Im Dauerlicht über 10 Lux verschwindet der Rhythmus der lokomotorischen Aktivität.

3 Wie wird der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert?

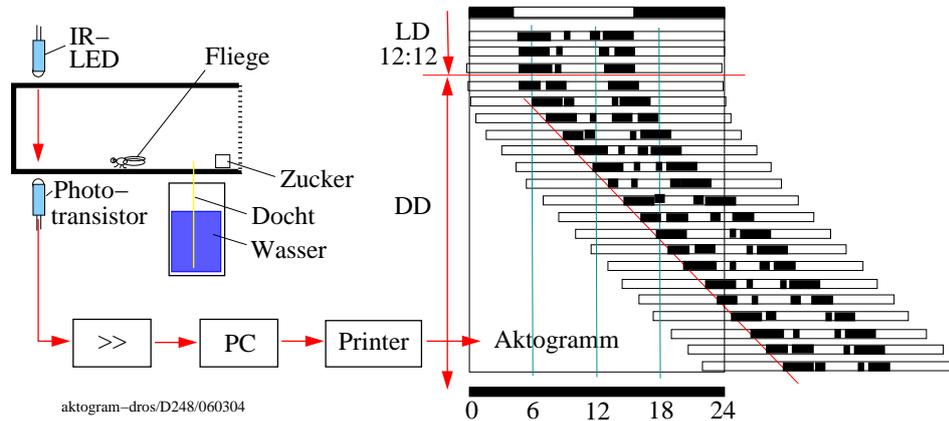


Abbildung 3.1: Links: Eine Drosophila Fliege wird in einer kleinen durchsichtigen Küvette mit Plastikdeckel auf der (rechts befindlichen) Öffnung gehalten. Ein Docht liefert Wasser aus einem darunter liegenden Gefäß zum Trinken, ein Stück Zucker dient als Futter. Unterbricht die Fliege beim Herumlaufen das Infrarotlicht (roter Pfeil in Küvette) einer Leuchtdiode (IR-LED, oben), entsteht im Phototransistor unter der Küvette ein Signal, das verstärkt (>>) und mit Hilfe eines PC gespeichert wird. Über viele Tage hinweg registriert ergibt sich (rechts) ein Aktogramm der Laufaktivität einer einzelnen Fliege. In einem Aktogramm wird die Aktivität als Striche und, wenn sie dicht aufeinander folgen, als Balken dargestellt. Aufeinanderfolgende Tage sind untereinander aufgetragen. Für die ersten 3 Tage befand sich die Fliege im Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12) und danach in konstantem schwachem Rotlicht. Hier ergibt sich 'Freilauf', wie die rote Linie zeigt: Sie verbindet den Aktivitätsbeginn der Tage im schwachen Rotlicht. Aus der Steigung der roten Linie läßt sich die Periodenlänge bestimmen. Sie beträgt bei dieser Fliege 24.6 Stunden. Eigentlich müßte die Aktivität vom achten Tag an statt hinter 24 Uhr hinter 0 Uhr aufgetragen werden. Dann läßt sich aber der Freilauf nicht so gut sehen

adianer Rhythmen (siehe Seite 23 und Abbildung 2.13). Eine Uhr, die bei verschiedenen Umgebungstemperaturen unterschiedlich schnell gehen würde, wäre ziemlich nutzlos.

Braucht die Uhr einen Kick von einem Zeitgeber der Umwelt, um in Gang zu kommen? Das ist untersucht worden, indem *Drosophila* vom Eistadium an im Dauerdunkel und unter konstanter Temperatur angezogen wurde. Es zeigte sich, daß die Fliegen einen circadianen Laufaktivitätsrhythmus besaßen. Er verläuft aber unter den einzelnen Fliegen nicht synchron. Es ist wie in einem Uhrenladen, in dem der Uhrmacher viele Uhren stehen hat, die er vergessen hat, auf die richtige Zeit zu stellen. Sie laufen zwar, aber geben ganz verschiedene Zeiten an. Der Rhythmus kann also auch ohne Licht und andere Zeitgeber induziert werden. Wird Licht im ersten Larvenstadium gegeben, wird der Rhythmus der Tiere synchronisiert. Licht im Embryonalstadium kann das nicht (Sehgal et al. (1992)).

3.2 Augen, um die Laufuhr zu stellen

Circadiane Rhythmen haben bestimmte Eigenschaften wie Freilauf und Temperatorkompensation. Sie lassen sich durch Zeitgeber synchronisieren, wobei der Licht-Dunkel-Wechsel am wichtigsten ist. Das Licht wird von Licht-Rezeptoren wahrgenommen und in Signale umgewandelt, die zum Oszillator gelangen und ihn beeinflussen. Wir hatten bereits bei der Schlüpfuhr einiges über die Photorezeptoren erfahren, über die Licht das Schlüpfen synchronisiert (siehe Unterabschnitt 2.2.2).

Wie Licht den *lokomotorischen Aktivitätsrhythmus* von *Drosophila* synchronisiert, ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Fliegen haben nicht nur die beiden großen seitlichen Komplexaugen zum Sehen, sondern noch eine Reihe anderer Au-

gen und auch Strukturen, bei denen man normalerweise nicht an Augen denkt. Diese Lichtrezeptoren sind alle bei der Synchronisation der Laufuhr beteiligt. Woher weiß man das? Man hat Mutanten verwendet, bei denen einer oder mehrere dieser Rezeptoren fehlen. Trotzdem wird der Rhythmus noch synchronisiert (Helfrich and Engelmann (1983), Helfrich (1986), Dushay et al. (1989), Wheeler et al. (1993)). Erst, wenn alle Photorezeptoren fehlen oder ihre Funktion verloren haben, werden die Fliegen nicht mehr durch einen Licht-Dunkel Zyklus synchronisiert (Helfrich-Förster et al. (2001)). Das wollen wir uns jetzt im Einzelnen ansehen.

Komplexaugen tragen zur Synchronisation des circadianen Aktivitätsrhythmus durch Licht bei. Obwohl die Laufuhr von Mutanten ohne Komplexaugen noch durch Licht-Dunkel-Zyklen synchronisierbar ist, gibt es Unterschiede: Bei einer Mutante ohne Komplexaugen (*sine oculis*) ist die circadiane Lichtempfindlichkeit etwa tausendmal geringer als beim Wildtyp mit intakten Augen. Wenn man den Larven des Wildtyps kein Carotin² im Futter gibt, können sie nicht mehr mit den Komplexaugen sehen, weil kein Sehpigment gebildet werden kann. Die Tiere können nämlich Carotin-Verbindungen nicht selbst herstellen. Die Empfindlichkeit des circadianen Rhythmus auf Licht ist bei Carotin-Mangel auf ein zehntausendstel reduziert. Um den gleichen Betrag ist auch die *Seh-Empfindlichkeit* der Komplexaugen bei solchen Carotin-verarmten Fliegen verringert.

Auch das Aktionsspektrum (zur Erinnerung: Es gibt an, welche Lichtfarben besonders gut gesehen werden können) unterscheidet sich von dem des Wildtyps

²Carotin ist ein Farbstoff. Er macht zum Beispiel Möhren gelb-rot

3 Wie wird der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert?

(Blaschke et al. (1996), Ohata et al. (1998)): Die Tiere ohne funktionierende Komplexaugen können kein rotes Licht sehen (Helfrich-Förster (1996)). Auch ihr Aktivitätsrhythmus lässt sich mit rot nicht synchronisieren. Die Komplexaugen spielen also eine Rolle bei der Synchronisation der Tagesuhr.

Die **Ozellen** (= Stirn- und Augenzellen) scheinen zusammen mit den Komplexaugen bei der Synchronisation des Aktivitätsrhythmus wichtig zu sein, wenn der Licht-Dunkel-Zyklus stark vom normalen abweicht, also zum Beispiel bei sehr kurzen oder sehr langen Dunkelperioden.

Es sind aber noch weitere Photorezeptoren bei der Synchronisation des lokomotorischen Aktivitätsrhythmus beteiligt³. Dazu gehören die **Hofbauer-Buchner Äuglein** (Hofbauer and Buchner (1989)). Sie bestehen aus vier Lichtrezeptor-Zellen und ihre Nervenfortsätze projizieren in die Gehirnregion, in der sich die circadianen Uhren befinden (Helfrich-Förster (1996), Kaneko (1998), Yasuyama and Meinertzhagen (1999)). Damit die Uhren durch Lichtsignale synchronisiert werden können, muss es ja Verbindungen zu den Lichtrezeptoren geben.

Aber sogar die *glass*-Mutanten, die überhaupt keine inneren und äußeren Augenstrukturen mehr besitzen, können

noch durch Licht synchronisiert werden (Helfrich-Förster (1996), Hall (1998)). Auf der Suche nach diesen Rezeptoren wurde schließlich gezeigt, dass die circadianen **Uhr-Zellen** (LN_v) selbst Lichtempfindlich sind. Sie benutzen das Blaulichtempfindliche Cryptochrom als absorbierendes Molekül (Emery et al. (2000), Ceriani et al. (1999)).

Drosophila benutzt also verschiedene Lichtrezeptoren, um seine Tagesrhythmen zu synchronisieren. Larven und Adulttiere verwenden Cryptochrom als Pigment in den Uhr-Neuronen. Extraretinale (Hofbauer-Buchner-Äuglein) und retinale Augen (Komplexaugen und Ozellen) helfen, die Aktivität an die Änderungen der Lichtintensität anzupassen. Man hat sich Gedanken gemacht, warum so viele Photorezeptoren beteiligt sind. Vielleicht ist das circadiane System dadurch in der Lage, die unterschiedlichen Qualitäten des natürlichen Lichtes wahrzunehmen. Natürliche Licht-Dunkel-Zyklen bestehen nicht nur aus weißem Licht, welches schlagartig an und aus geht. Stattdessen ändern sich die Lichtintensitäten am Morgen und Abend allmählich während des Zwielichtes in seiner Intensität, spektralen Zusammensetzung und in der Lage der Sonne in Bezug auf den Horizont. Organismen könnten diese Eigenschaften benutzen, um je nach ihrer Ökologie und Strategie Licht zu sammeln (siehe Roenneberg and Foster (1997)). Bei allen bisher getesteten Tieren einschließlich des Menschen synchronisiert die Morgen- und Abenddämmerung wirksamer als wenn Licht schlagartig an oder aus geht (Fleissner and Fleissner (2001)). Bünning (1936) hatte vorgeschlagen, dass Organismen die niedrigen Lichtintensitäten des Zwielichtes (während der bürgerlichen Dämmerung) für die Tageslängenmessung verwenden. Damit können sie die Jahreszei-

³So fanden Blaschke et al. (1996) zwei Maxima im Aktionsspektrum der Synchronisation des Aktivitätsrhythmus von Wildtyp und augenlosen Fliegen. Außerdem sind die Geraden, die den Prozentsatz synchronisierter Fliegen als Funktion der Lichtintensität in Dosis-Responskurve darstellen (siehe Abbildung 2.11), für mehrere der getesteten Wellenlängen nicht parallel zueinander. Interessanterweise waren diese Kurven auch bei augenlosen Fliegen nicht parallel, was vermuten lässt, dass sogar diese Fliegen verschiedene Photorezeptoren zur Synchronisation benutzen.

ten bestimmen, denn die Tageslänge hängt gesetzmäßig von der Jahreszeit ab. Schließlich wird bei Signalen aus der Umwelt auch das Rauschen reduziert, wenn mehrere Eingänge benutzt werden. Das gilt auch für Licht-Rezeptoren.

Ferner scheinen die verschiedenen Photorezeptoren eine unterschiedliche Bedeutung für die Synchronisation des circadianen Rhythmus und für direkte Lichteffekte zu haben (Emery et al. (2000), Helfrich-Förster et al. (2001), Rieger (2002)). Durch die Komplexaugen wird das Aktivitätsmuster der Adulttiere direkt beeinflusst und der circadiane Rhythmus besonders in extremen Lang- und Kurztagen synchronisiert. Auch die Ozellen scheinen diese Effekte zu zeigen. Möglicherweise wirken sie dabei auf einen Rhythmus, der für den zweiten Morgengipfel zuständig ist (siehe Seite 42), während die Komplexaugen den für den Morgengipfel 1 verantwortlichen Rhythmus synchronisieren (Rieger (2002)). Cryptochrom wirkt als Lichtrezeptor-Molekül in Zellen auf circadiane Rhythmen, ist aber zur Synchronisation des Aktivitätsrhythmus nicht zwingend nötig. Die Bedeutung der Hofbauer-Buchner-Äuglein für die Synchronisation der Aktivitätsrhythmen und für direkte Lichteffekte ist noch nicht bekannt. Es gibt nämlich bisher noch keine Mutanten, denen diese Photorezeptoren fehlen oder bei denen sie defekt sind. Vielleicht könnten hier Versuche mit Zelltod-Genen, die diese Rezeptoren spezifisch ausschalten, weiterhelfen.

3.3 Steuerung des *Drosophila* Schlafes

Schlaf-ähnliches Verhalten wurde wie bei vielen Tieren (Campbell and Tobler (1984)) auch bei *Drosophila* beschrieben

(Hendricks et al. (2000), Shaw et al. (2000), Shaw (2003), Cirelli (2006)). Über die beteiligten Signale und Mechanismen berichtet (Foltenyi et al. (2007) und dort weitere Literatur). Eine begrenzte Zahl von Zellen in der Pars intercerebralis ist beteiligt. Sie projizieren von dort zum Tritocerebrum. Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (extracellulär growth factor receptor EGFR) und andere Faktoren aktivieren die extrazelluläre Signal-regulierende Kinase ERK, die bei Säugern und Fliegen die synaptische Plastizität moduliert. Wird EGFR überexprimiert, wird die Schlafdauer erhöht. Lokomotorische Aktivität, Periodenlänge und Phase des Aktivitätsrhythmus sind aber nicht beeinflusst.

Außerdem scheint das dopaminerge System beteiligt zu sein. Pharmakologische und genetische Manipulation zeigen, daß verringerte Dopaminkonzentration die Schlafdauer verlängert und erhöhte Konzentration die Schlafdauer verkürzt. Einige prominente Dopamin-Projektionen enden in den Pilzkörpern (siehe Abbildung 3.2). Sie sind für Reaktionen zuständig, die Ruheverhalten induzieren, für assoziative Konditionierung und für Schlafmodulation. Beide Systeme sind im dorsalen Mittelhirn lokalisiert, wo sich auch PDF-enhaltende Zellen befinden, die für die lokomotorische Aktivität zuständig sind (siehe Abbildung 3.2).

3 Wie wird der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert?

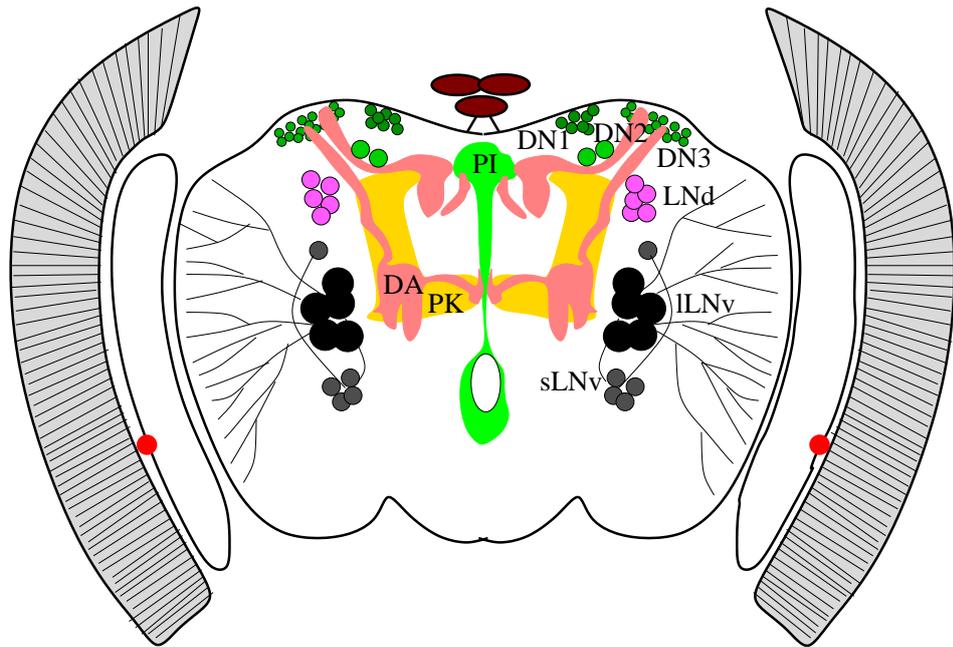


Abbildung 3.2: Lage der an der Steuerung des Schlafes beteiligten Gehirnareale von *Drosophila melanogaster* und neurosekretorische Zellen. PK Pilzkörper (gold), DA Dopaminerges System (rosa), PI Pars intercerebralis-Neurone (hellgrün). Hofbauer-Buchner Äuglein (rot), dorsale (DN1, 2, 3, grün) und ventrale laterale Neuronen (sLNv, rot, und ILNv, dunkel). Siehe auch Abbildung 4.1. Nach Helfrich-Förster et al. (2000) und Foltenyi et al. (2007)

4 Wo steckt die innere Uhr der Fliege?

Rhythmische Laufaktivität und Schlüpfen wird durch verschiedene Zellen gesteuert, die im Gehirn der Fliegen liegen. Ihre Verschaltung untereinander und mit den Zielorganen wird erklärt. Sie sind außerdem mit Photorezeptoren verbunden, die Licht aufnehmen und die Uhren mit der Umwelt synchronisieren. Rhythmisches Verhalten wird durch solche Zentraluhren gesteuert, während lokale Uhren in den verschiedenen Geweben und Organen arbeiten. Das circadiane System der Fliegen ist also aus vielen Uhren zusammengesetzt.

Wo befinden sich die Zentren, in denen das Schlüpfen und die lokomotorische Aktivität der Fliegen circadian kontrolliert werden? Das wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht (Übersicht: Helfrich-Förster (2001), Helfrich-Förster et al. (1998), Kaneko (1998)). Die Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt dargestellt. Die verschiedenen Photorezeptoren für Licht, mit denen die Tagesrhythmen synchronisiert werden, wurden bereits besprochen (siehe Abschnitt 3.2). Weitere Fragen wie die, ob Schlüpfrythmus und lokomotorische Aktivität von der gleichen circadianen Uhr kontrolliert werden und ob es neben den Zentraluhren im Gehirn auch lokale Uhren in den Geweben und in den Organen gibt, werden in weiteren Abschnitten beantwortet.

4.1 Ein Blick ins Fliegenhirn

Wir müssen jetzt einen Blick ins Gehirn der Fliegen werfen, denn dort sind nicht nur die

verschiedenen Photorezeptoren für Licht zu finden, mit denen die Rhythmen synchronisiert werden (siehe Abschnitt 3.2), sondern auch die Zentren, durch die das circadiane Verhalten gesteuert wird (Abbildung 4.1, Veleri et al. (2003), Helfrich-Förster (2003b)).

Die Zentren für tagesrhythmische Schlüpfen und circadiane Aktivität sind bestimmte neurosekretorische Zellen. Sie liegen an der Seite der beiden Gehirnhälften und werden deshalb Lateral-Neuronen (LN) genannt. Es gibt jeweils eine mehr dorsal liegende Gruppe (LN_d, 5 bis 8 Zellen) und eine mehr ventral gelegene (LN_v). Die ventrale Gruppe besteht aus Neuronen mit großen Zellkörpern (lLN_v, 4 bis 6 Zellen) und aus Neuronen mit kleinen Zellkörpern (sLN_v, 5 Zellen). Die kleinen LN_v sind die wichtigsten Zellen für das circadiane Verhalten. Sie senden Nervenfasern in den dorsalen Teil des zentralen Gehirns. Im dorsalen oberen Gehirn liegen außerdem drei Gruppen dorsaler Neuronen (DN1, etwa 15 Zellen, zwei DN2 Zellen, und etwa 40 ziemlich kleine DN3 Zellen).

Im Gehirn der Larven findet man nur vier kleine LN_v, zwei Zellen der DN2 und zwei Zellen der DN1 (siehe Abbildung 2.15).

Die Verbindungen zwischen den neurosekretorischen Zellen und den Photorezeptoren wurden durch Färbungen charakteristischer Substanzen nachgewiesen. Die lateralen Neuronen ziehen hauptsächlich ins dorsale Protocerebrum. Dort überlappen sich ihre Enden. Von den DN-Zellgruppen laufen nur die Fasern der DN1 zu anderen Gehirngebieten wie die akzessorische Medulla aMe und vielleicht zum optischen Lappen. Ande-

4.2 Eine Uhr für circadianes Schlüpfen und für lokomotorische Aktivität?

re DN1-Zellen haben Ausläufer zum Schlund (Ösophagus). Die wichtigsten Verbindungen der DN1 sind die dorsalen Kommissuren. Sie laufen zur gegenüberliegenden Seite des dorsalen Gehirns. Auch die DN2 Neuronen laufen in der gleichen Kommissur. Die Fasern der DN3 Zellen sind mehr ventral und enden auf der gleichen Seite des dorsalen Gehirns. Hier überlappen sie mit einigen Fasern vom LNd und vom DN2. Die LNd-Fasern laufen an der Oberfläche des Lateralhorns. Sie bilden einen dorsalen Ast, der parallel zu den DN3 Fasern verläuft, und einen ventralen Ast, der die Mittellinie unter der DN1/DN2-Kommissur kreuzt.

Die Fasern der Uhr-Zellen enden im oberen Protocerebrum. Dieser Teil des Gehirns ist mit den meisten Stellen des Gehirns verbunden und enthält außerdem weitere neurosekretorische Zellen. Circadiane Signale von den Uhr-Zellen können so elektrisch oder über Hormone zu ihren Ziel-Organen gelangen. Die Neuronen aller Uhr-Zellen scheinen miteinander verbunden zu sein. Dadurch sind sie in der Lage, die circadiane Zeit an das dorsale Protocerebrum und vielleicht über die großen LN auch in die optischen Lappen zu schicken. Aber die verschiedenen Zellen können unterschiedliche Rollen im circadianen System spielen.

Die kleinen LNv und LNd sind die Zell-Gruppen, die wohl für die circadianen Rhythmen beim Schlüpfen und bei der lokomotorischen Aktivität verantwortlich sind (Helfrich-Förster and Engelmann (2002)). Sogar eine einzelne funktionelle LN-Zelle ist dazu noch in der Lage. Das wurde an *disco*-Mutanten gezeigt. Normalerweise fehlen bei diesen die LN-Zellen, aber gelegentlich sind noch eine oder wenige dieser Zellen vorhanden (Helfrich-Förster (1998)). In diesem Fall zeigen die betreffenden Tiere eine rhythmische Aktivität, während sonst *disco*-Mutanten arrhythmisch sind.¹ Aber auch die DN-

Zellen sind am circadianen System beteiligt. Für das circadiane Schlüpfen sind die kleinen LNv-Zellen verantwortlich. In der geschlüpften Fliege sind die LNd, die großen LNv und die kleinen LNv an der Kontrolle der circadianen lokomotorischen Aktivität beteiligt. Diese Gruppen verwenden² als Signale für weiter abwärts gelegene Neurone. Die großen LNv projizieren nicht ins dorsale Protocerebrum und haben vielleicht eine spezielle Funktion beim Koppeln der kleinen LNv und LNd der beiden Gehirnhälften.

4.2 Werden Schlüpfen und lokomotorische Aktivität von der gleichen circadianen Uhr kontrolliert?

Von den zahlreichen Ereignissen, die bei *Drosophila* circadian kontrolliert werden, hatten wir zwei Beispiele kennengelernt, die Schlüpf- und Laufrhythmen. Handelt es sich dabei um eine Uhr oder um verschiedene, die diese beiden Verhaltensrhythmen steuert? Wenn es verschiedene sind, wie stehen sie miteinander in Beziehung und wie interagieren sie miteinander? Und wo sind sie lokalisiert? Schließlich würden wir gern wissen, wie diese Uhren funktionieren (Kapitel 5).

Die Schlüpfrythmen haben auch unter konstanten Bedingungen einen genauen 24-Stunden-Takt, und es wurde schon erklärt, warum das so ist (Kapitel 2). Die Laufuhren dagegen sind in konstanter Umwelt bei den einzelnen Fliegen meistens et-

einige rhythmische Aktivitätsmuster fand. Sie untersuchte dann bei diesen rhythmischen Tieren den Kopf und fand, daß bei ihnen noch eine oder mehrere der LNv-Zellen vorhanden waren.
²Pigment dispersing factor, ein Neuropeptid. Es wurde ursprünglich bei Krebsen entdeckt

¹Tatsächlich wurden diese Tiere gefunden, als Charlotte Förster die Laufaktivität einiger hundert *disco*-Fliegen registrierte und ganz selten

was schneller oder etwas langsamer als 24 Stunden. Das spricht zunächst *gegen* eine einzige Uhr, die beide Vorgänge steuert. Muß aber nicht: Die Uhr könnte ja nach dem Schlüpfen der Fliege ihre Geschwindigkeit ändern. Schlüpfen und Laufen würden dann immer noch von einer Uhr gesteuert. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Laufuhr schon in der Puppe läuft, und zwar mit einer anderen Geschwindigkeit als die Schlüpfuhr (Mack and Engelmann (1982)).

Andererseits haben Mutanten von *Drosophila melanogaster*, deren Schlüpfuhr schneller oder langsamer ist als die des Wildtyps, auch schnellere oder langsamere Laufuhren (Konopka and Benzer (1971)). Wenn die Mutation den Oszillator betrifft, würde das *für eine Uhr* sprechen, die beide Vorgänge circadian steuert. Es gibt aber auch eine Mutante (*ebony*), bei der der Laufrhythmus verändert ist, der Schlüpf-rhythmus aber nicht (Newby and Jackson (1991)). Ähnliches wurde bei *Drosophila pseudoobscura* beobachtet (Engelmann and Mack (1978)). Als ein weiteres Beispiel wurde bei der Mutante *lark* die Phase des Schlüpf-rhythmus beeinflusst, aber der Laufrhythmus war in Phase und Periode normal. Das würde *gegen* eine Uhr sprechen und für ein Multioszillatorsystem.

Für mehrere Uhren spricht auch folgendes: Mutanten von *Drosophila melanogaster*, deren lokomotorische Aktivität nicht circadian kontrolliert wird, reagieren noch photoperiodisch:³ Sie können durch einen Kurztag in einen Ruhezustand (Diapause) versetzt werden. Bei der photoperiodischen Zeitmessung ist aber eine circadiane Uhr beteiligt (Saunders et al. (1989)). Das würde bedeuten, dass eine circadiane Uhr die photoperiodische Zeitmessung durchführt,

³die kritische Tageslänge ist allerdings um 2 Stunden kürzer

die nicht mit der Uhr für die Schlüpf- und Aktivitätsrhythmen identisch ist.

Selbst die Laufaktivität kann durch mehr als einen Oszillator circadian gesteuert werden. Mutanten, bei denen die optischen Lappen stark reduziert sind, zeigen im Aktogramm unter Konstantbedingungen zwei circadiane Komponenten. Sie unterscheiden sich in ihrer Periodenlänge etwas voneinander. Deshalb drifteten die beiden Rhythmen langsam auseinander, bis sie sich nach einiger Zeit wieder treffen (Abbildung 4.2, Helfrich (1986), Helfrich-Förster (2001)). Eine dieser Komponenten ist der Morgensoszillator. Selbst dieser scheint aus zwei Komponenten zu bestehen. Das zeigt sich in Aktogrammen von Tieren, deren Laufaktivität unter extremeren Licht-Dunkel-Zyklen mit entweder sehr viel kürzeren oder sehr viel längeren Lichtperioden registriert wurden (Rieger (2002)).

Drosophila besitzt also, wie übrigens auch andere Insekten, ein Multioszillatorsystem. Es kontrolliert verschiedene Vorgänge auf verschiedenen Ebenen circadian. Dieses System besteht aus autonomen Uhren in Zellen, Geweben und Organen, die direkt durch Licht-Dunkel-Zyklen synchronisiert werden, aber auch aus zentralen Uhren im Gehirn, die durch verschiedene Photorezeptoren, aber auch direkt durch Licht synchronisiert werden (siehe Abschnitt 3.2). Wie diese verschiedenen Komponenten des circadianen Systems zusammenwirken, ist noch nicht gut bekannt.

4.3 Zentraluhr und lokale Uhren

Schlüpf- und Laufrhythmen von *Drosophila* werden circadian kontrolliert, wie wir sahen. Beides sind Verhaltensrhythmen und wir haben gesehen, daß sie durch Zentral-

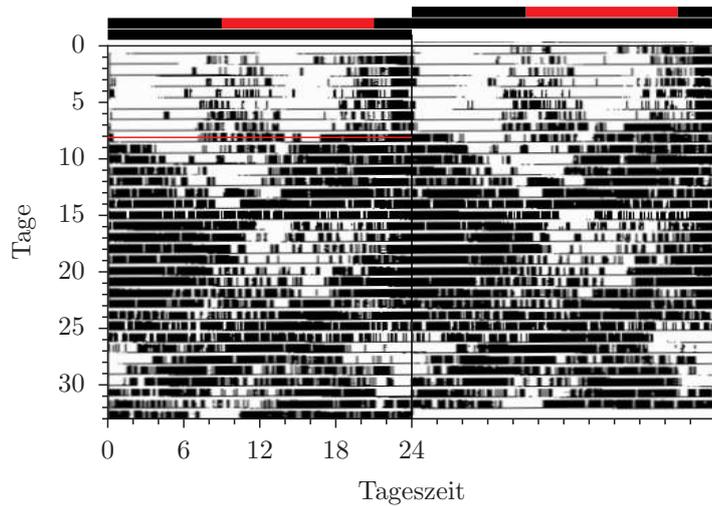


Abbildung 4.2: Aktogramm einer *Drosophila* Fliege mit zwei circadianen Komponenten im Muster der lokomotorischen Aktivität. In den ersten sieben Tagen wurde die Fliege in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel gehalten (siehe schwarzes Balkenmuster ganz oben; der jeweils zweite Tag wurde noch einmal auf der rechten Seite aufgetragen, damit man das Aktivitätsmuster besser erkennt). Die lokomotorische Aktivität besteht aus einem Morgen- und einem Abendteil und die Aktivität ist mit dem externen 24 Stunden-Rhythmus synchronisiert. Vom achten Tag an war die Fliege im Dauerdunkel. Die Aktivität zeigt Freilauf mit zwei Komponenten: Die Periode der kürzeren Komponente ist etwa 22 Stunden und verläuft von rechts oben nach links unten, die Periode der längeren ist 25 Stunden und verläuft von links oben nach rechts unten. Die beiden Komponenten laufen auseinander und treffen sich wieder. Nach [Helfrich-Förster et al. \(2000\)](#)

4 Wo steckt die innere Uhr der Fliege?

uhren im Gehirn gesteuert werden.

Damit ist aber der Uhrenladen von *Drosophila* noch nicht ganz beschrieben. Denn periphere Gewebe und verschiedene Organe werden durch selbständige circadiane Uhren kontrolliert. Sie wurden in isoliert kultivierten Komplexaugen (Christopher and Hoffer (1998)), chemosensorischen Zellen der Antenne (damit riechen die Fliegen, Plautz et al. (1997), Krishnan et al. (1999)), Malphigischen Röhren (das sind die Nieren der Fliegen, Hege et al. (1997), Giebultowicz et al. (2001)) Prothorakaldrüsen (vom Gehirn beeinflusste Drüsen im Brustabschnitt, Emery et al. (1997)) (Abbildung 4.3) und anderen Geweben gefunden. Diese Zellen und Organe sind aber für den Schlüpf- und Aktivitätsrhythmus nicht wichtig.

Wie hat man nachgewiesen, daß auch in Geweben und Organen Tagesuhren ticken? Dazu wurde ein Reporter-Gen eines Enzyms, der Luciferase, in die Körperzellen gebracht. Luciferase bewirkt das Leuchten von Glühwürmchen-Weibchen, die damit im Dunklen Männchen anlocken. Das Gen wurde an einen Promotor gehängt, der durch die circadiane Uhr gesteuert ist. Promotoren können Gene beeinflussen, zum Beispiel an- und ausschalten. Auf diese Weise erhielten die Fliegen in ihren Geweben und Organen die Fähigkeit, zu leuchten. Da die circadiane Uhr den Promotor beeinflusste, sodass das Luciferase-Gen zu bestimmten Zeiten des Tages Luciferase exprimiert, zu anderen nicht, zeigten sich circadiane Leuchtrhythmen in den einzelnen Geweben und Organen. Diese Rhythmen konnten auch in Gewebekulturen nachgewiesen werden. Dazu wurde durch das *per*-Gen getriebenes grünfluoreszierendes-Protein (GFP) verwendet, das nur an Stellen gebildet wird, an denen das Uhren-Gen *per* aktiv ist. Mit emp-

findlichen Kameras kann im UV das grüne Leuchten des GFP über mehrere Tage hinweg nachgewiesen werden. Lichtpulse verschieben die Phase dieser Rhythmen (Plautz et al. (1997)).

Drosophila und wohl auch viele andere Insekten besitzen also neben den Zentraluhren, die Verhaltensweisen wie Schlüpfen und Laufen circadian steuern, auch Uhren in peripheren Organen und Geweben, die autonom sind und direkt vom Tag-Nacht-Wechsel synchronisiert werden.

4.4 Mutanten

Verschiedene Mutanten, die Änderungen im Gehirn zeigen, unterscheiden sich vom Wildtyp durch ihr Aktivitätsmuster. Sie wurden verwendet, um den Mechanismus aufzuklären, der den circadianen Uhren zugrunde liegt. Die wichtigsten Mutanten sind im oberen Teil der Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Augenmutanten wurden benutzt, um herauszufinden, welche Photorezeptoren für die Synchronisation der lokomotorischen Aktivität zuständig sind (Helfrich-Förster et al. (2001), unterer Teil der Tabelle 4.1; siehe auch Abschnitt 3.2).

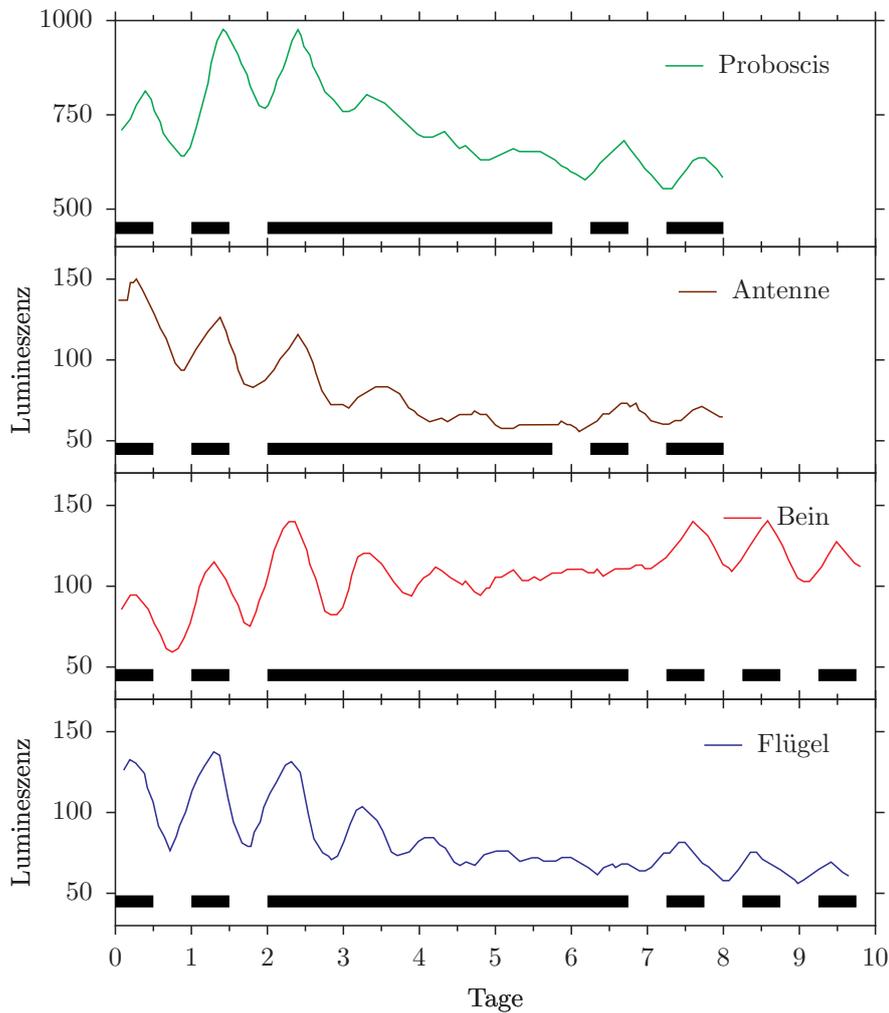


Abbildung 4.3: *Leuchtrhythmen von Drosophila-Geweben: Durch per-Gen getriebenes grün-fluoreszierendes-Protein (GFP) wird nur an Stellen gebildet, an denen das Uhren-Gen per aktiv ist. Mit empfindlichen Kameras kann im UV das grüne Leuchten des GFP über mehrere Tage hinweg nachgewiesen werden. Im Licht-Dunkel-Wechsel ist der Rhythmus ausgeprägt (Tag 0 und 1), im Dauerdunkel dämpft er aus (Tag 2 bis 5 in den beiden oberen Kurven, Tag 2 bis 6 in den beiden unteren Kurven). Ein erneuter Licht-Dunkel-Wechsel (Tag 6 und 7 beziehungsweise Tag 7 bis 9) verstärkt und verschiebt den Rhythmus. Oben (grün) Rüssel (Proboscis), darunter (braun) Antenne, darunter (rot) Bein, unten (blau) Flügel. Nach [Plautz et al. \(1997\)](#)*

4 Wo steckt die innere Uhr der Fliege?

Uhr-Mutanten				
Mutante	Name	Protein im Wildtyp	Eigenschaften	Bemerkung
per^0	period 0	PER	negativer Regulator	
per^s	period s	PER		
per^l	period l	PER		
clk	clock	CLK	positiver Regulator	clk ⁰
tim	timeless	TIM	negativer Regulator	Licht-empfindlich
cyc	cycle	CYC	positiver Regulator	cyc ⁰
dbt	doubletime	DBT	phosphoryliert PER	dbt
rigui	rigui			
vri	vriille	VRI	blockiert per- und tim-Expression	
$pdp1\epsilon$		$PDP1\epsilon$		
Augen-Mutanten				
so	sine oculis			
sol	small optic lobe			
eya	eyes-absent			
oc	ocelli-less			
dcry	<i>Drosophila</i> Cryptochrom	DCRY	Photorezeptor; Eingänge	
cry^b	crybaby	CRYB	kein funktionierendes Cryptochrom	
norpA	no-receptor-potential	phospholipase C	Lichtübertragung in Kompl.auge and Ocelli	
glass				
disco	disconnected		optische Ganglien blind, AR in DD	

Tabelle 4.1: Wichtige Mutanten von *Drosophila melanogaster* mit geänderten Eigenschaften der circadianen Uhr (oberer Teil der Tabelle) und einige Augenmutanten, die die Synchronisation des circadianen Systems von *Drosophila melanogaster* beeinflussen (unterer Teil der Tabelle). Aus [Saunders \(2002\)](#)

Die meisten Ergebnisse von Abschnitt 3.2 beruhen auf Versuchen, bei denen Augen-Mutanten benutzt wurden.

4 *Wo steckt die innere Uhr der Fliege?*

5 Das Uhr-Getriebe

Die Mechanismen der circadianen Uhren, die Schlüpfen und Laufen der Fliegen kontrollieren, werden vorgestellt. Es handelt sich um molekulare Rückkopplungsschleifen, in denen bestimmte Genprodukte entscheidende Rollen spielen. Die Spieler und Spielregeln sind einigermaßen gut bekannt. Auch die Wirkung des Lichtes und der Temperatur wird auf der molekularen Ebene recht gut verstanden. Es kann zum Beispiel erklärt werden, warum die Uhr bei verschiedenen konstanten Außentemperaturen immer gleich schnell läuft, aber trotzdem auf eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur reagiert. Wenn durch Mutationen einige der Mitspieler dieser Schwingungsvorgänge ausfallen oder zu stark sind, ändert sich die Dauer der Schwingung oder die Uhren hören auf zu laufen.

Es wird nun Zeit, die Uhren etwas genauer anzusehen, die für die verschiedenen Tagesrhythmen zuständig sind. Wir hatten gesehen, was sie alles steuern. Wir wissen aber noch nicht, wie sie funktionieren. Das wollen wir in den nächsten Abschnitten erfahren.

5.1 Ein Rückkopplungsmodell für Schwingungen: Das Spiel

Welche Mechanismen liegen den circadianen Uhren im Gehirn von *Drosophila* zugrunde, die Schlüpfen und lokomotorische Aktivität kontrollieren? Das wurde in den vergangenen Jahren intensiv und erfolg-

reich untersucht. Es gibt aber noch viele unbeantwortete Fragen. Hier werden nur die wichtigsten Grundlagen beschrieben. Einzelheiten sind in neueren Übersichtsarbeiten beschrieben (Hall (1982), Edey (2000), Giebultowicz (2000), Stanewsky (2002), Williams and Sehgal (2001), Young and Kay (2001), Foltenyi et al. (2007)).

Beide Rhythmen - Aktivität und Schlüpfen - lassen sich durch molekulare Rückkopplungsschleifen beschreiben. Sie sind sozusagen das Prinzip des Spieles, dem wir auf die Spur kommen wollen. In ihm gibt es Spieler, nämlich eine Reihe von Uhr-Genen. Sie heißen period (*per*), timeless (*tim*), clock (*clk*), cycle (*cyc*), doubletime (*dbt*), vrille (*vri*) und *pdp_{1ε}*. Gene produzieren Eiweiße, die oft als Enzyme bestimmte Stoffwechselschritte kontrollieren. Die entsprechenden Proteine der Uhr-Gene sind PER, TIM, CLK, CYC, und DBT, VRI und PDP_{1ε} (siehe 5.1 Tabelle 4.1). Mutationen in diesen Genen beeinflussen beide Rhythmen stark, die Fliegen werden aperiodisch oder ändern die Periodenlänge ihres freilaufenden Rhythmus.

Wie sieht nun das Spiel aus, in dem die genannten Spieler miteinander interagieren? In Abbildung 5.1 sind die beiden Rückkopplungsschleifen -RKK und +RKK beschrieben, auf denen die circadiane Uhr beruhen soll (nach Ergebnissen von Cyran et al. (2003) und Glossop et al. (2003)). Sie sind nicht einfach zu verstehen, und wir müssen uns einiges dabei erst erklären lassen. Ich will folgendermaßen vorgehen: Es wird das Spiel erklärt, ohne die verwendeten Fachausdrücke zunächst eingehend zu

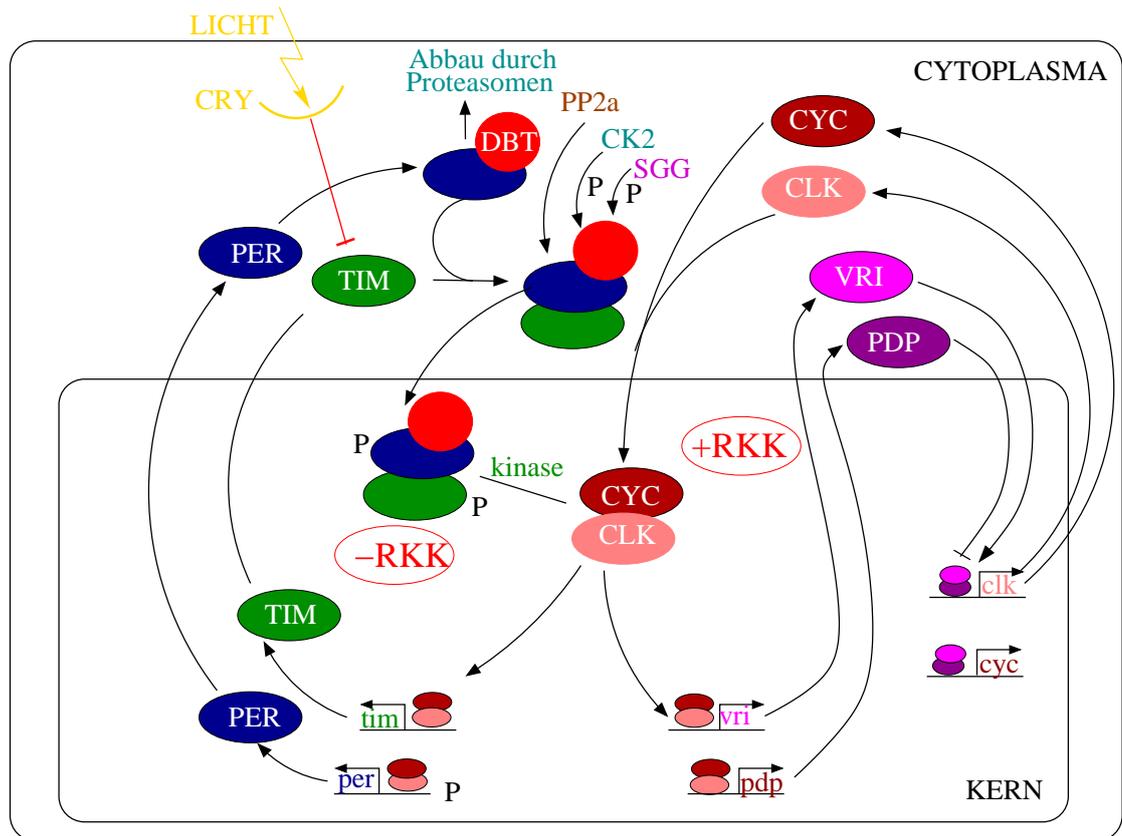


Abbildung 5.1: Modell mit zwei Rückkopplungskreisen. Im negativen Rückkopplungskreis -RKK (rot umrandet) hemmen PER und TIM zusammen mit DBT nach Phosphorylierung (durch CK2 und SGG) über eine Kinase CYC und CLK. Dadurch wird weniger TIM und PER von den *tim*- und *per*-Genen exprimiert. In einem positiven Rückkopplungskreis +RKK (rot umrandet) erhöhen CYC und CLK die Expression der Gene *vri* und *pdp_{1ε}*. VRI hemmt und *PDP_{1ε}* fördert die Expression von *clk* und *cyc*. Im negativen Rückkopplungskreis -RKK hemmen PER und TIM die Transkriptionsfaktoren CYC und CLK (statt Pfeil kurzer Querstrich), und die Transkriptionsfaktoren CYC und CLK fördern die Expression von *per* und *tim* (durch Pfeile markiert). TIM und PER werden durch DBT, CK2 und SGG phosphoryliert und durch Proteasomen abgebaut. Im positiven Rückkopplungskreis +RKK fördern CYC und CLK die Expression von *vri* und *pdp_{1ε}*. Die Produkte dieser Gene, VRI und *PDP_{1ε}*, fördern (VRI beziehungsweise hemmen (*PDP_{1ε}*) die Expression des *clk*- und des *cyc*-Gens.

Licht (gelber Zickzackpfeil) wird von Cryptochrom (gelb) absorbiert und wirkt über ein Signal auf TIM ein, was dadurch zerstört wird. Genauer ist noch nicht bekannt.

Beide Rückkopplungskreise wirken zusammen und mRNA von Uhr-gesteuerten Genen wie zum Beispiel PDF wird tagesrhythmisch gebildet. Die Produkte können auf Uhr-Bestandteile einwirken oder von diesen beeinflusst werden (PDF kann PER beeinflussen, VRI hemmt die PDF-Bildung). Die Vorgänge verlaufen im Cytoplasma und im Kern, wie im Bild gezeigt. Nach [Cyran et al. \(2003\)](#), [Glossop et al. \(2003\)](#) und [Mackey \(2007\)](#)

erklären. Das wird erst in einem folgenden Abschnitt geschehen.

CLK und CYC sind basische Helix-loop-Helix-PAS Transkriptionsfaktoren. Sie bilden Heterodimere und binden an ein E-box-Element¹ in den Promotoren der *per* und *tim* Gene. Dadurch wird die Transkription beider Gene aktiviert (Darlington et al. (1998), Rutila et al. (1998), Hao et al. (1997)). Die Menge der mRNA von *per* und *tim* nimmt kontinuierlich zu, bis am frühen Abend ein Maximum erreicht ist. Die Produkte PER und TIM erreichen ihr Maximum erst am späten Abend (Zerr et al. (1990), Ederly et al. (1994)). Die Verzögerung scheint durch post-transkriptionale Regulation der *per* mRNA (Chen et al. (1998)) und des PER zustande zu kommen (Dembinska et al. (1997), Stanewsky et al. (1997)). Einer der regulatorischen Mechanismen destabilisiert PER durch DBT-abhängige Phosphorylierung (Kloss et al. (1998), Price et al. (1998)). PER wird aber durch Dimerisierung mit TIM stabilisiert. Nach einem früheren Modell (ref xxx) sollten diese PER-TIM Dimere, wenn sie eine kritische Schwelle erreicht haben, in den Kern gelangen und dort ihre eigene Transkription hemmen, indem sie den transkriptionalen Aktivator CLK-CYC inaktivieren (Darlington et al. (1998)).

Dieses Modell ist inzwischen durch neue Untersuchungen und Befunde noch komplizierter geworden (siehe Seite 52). Durch die Zeitverzögerung zwischen mRNA und Protein führt diese negative Rückkopplung zu einer stabilen Oszillation von *per* und *tim* mRNA und den Proteinen.

Uff, das war hart. Das scheint ja ein ziemlich vertracktes und ausgefallenes Spiel zu sein. Also, jetzt mal ganz langsam, um was geht es hier? Zu-

nächst schau Dir mal eine kleine Animation an, die in einfacher Weise zeigt, was eben so kompliziert vorgestellt wurde (<http://www.hhmi.org/biointeractive/clocks/animations.html>). Das molekulare Modell der *Drosophila* Uhr, das in Abbildung 5.1 dargestellt wurde, ist hier als Animation gezeigt. Man kann sehen, wie die Uhr-Gene *per* und *tim* die Uhr-Proteine PER und TIM produzieren. Diese wandern vom Kern ins Zytoplasma und bilden zusammen hier ein Dimer. Dieses Dimer kann durch die Kernmembran wandern und die Transkriptionsfaktoren CLK und CYC hemmen. Dadurch wird die Transkription von PER und TIM gestoppt. Die Konzentration von PER und TIM sinkt, weil sie abgebaut werden. Licht wird über Photorezeptoren empfangen und ändert das *Drosophila*-Cryptochrom CRY. Als Folge wird das PER/TIM Dimer abgebaut (Helfrich-Förster (2002)).

5.2 Die Spieler und die Spielregeln

Nun sollten wir uns mit den Spielern etwas näher bekannt machen, die vorher kurz aufgeführt wurden (in Abschnitt 5.1) und versuchen, die Spielregeln genauer zu verstehen. Die Spieler sind wesentliche Teile der circadianen Uhr (Teile des Uhrwerks) und müssen von den durch die Uhr kontrollierten Teilen (Zeiger der Uhr) unterschieden werden.

Zwei der Spieler sind PER und TIM, die von den Genen *period* (*per*) und *timeless* (*tim*) kodiert werden. PER bildet mit TIM ein Dimer. Es wird durch diese Dimerisierung stabilisiert. PER und TIM haben folgende Aufgaben: Wenn eine kritische Schwelle des PER-TIM Dimers erreicht ist, kann es in den Kern gelangen und dort die

¹mit der Nukleotid-Sequenz CACGTG

Transkription von PER und TIM hemmen (also ihre eigene Herstellung), indem sie den transkriptionalen Aktivator CLK-CYC inaktivieren. Reguliert werden die *per*- und *tim*-Gene durch CLK und CYC, die durch die Gene *clock* (*clk*) und *cycle* (*cyc*) exprimiert werden. Sie sind basische Helix-loop-Helix-PAS Transkriptionsfaktoren. Sie bilden Heterodimere und binden an ein E-box-Element in den Promotoren der *per*- und *tim*-Gene. Dadurch wird die Transkription beider Gene aktiviert. Für den Abbau von PER ist DBT zuständig, das vom Gen *doubletime* (*dbt*) kodiert wird. Es fördert die Phosphorylierung von PER und dadurch den Abbau durch Ubiquitin an Proteasomen. Ein weiteres Uhr-Protein ist das cAMP Respons-Element Bindeprotein (CREB). Es ist ebenfalls an der Rückkopplungsschleife beteiligt und fördert die Oszillationen von PER und TIM. Weitere solcher Uhr-Faktoren werden möglicherweise noch entdeckt.

Die zeitlichen Verläufe sind von [Saez et al. \(2007\)](#) beschrieben und in [Abbildung 5.2](#) gezeigt. Sie wurden aufgeklärt, indem eine alte Zelllinie eines *Drosophila*-Embryos aus dem Jahr 1972 besonders präpariert wurde (PER wurde mit gelber, TIM mit grüner Fluoreszenz versehen). Beide konnten durch einen Hitzeschock induziert werden. Dabei ergab sich (siehe [Abbildung 5.2](#)), daß PER und TIM zunächst 4 Stunden lang gleichmäßig im Cytoplasma verteilt waren, dann nach 5-6 Stunden sich rasch innerhalb einer Stunde in Gruppen (Focus, Mehrzahl Foci) um den Kern herum ansammelten, und zwar unabhängig von der PER- und TIM-Menge. Dann gelangen PER und TIM in den Kern, wiederum unabhängig von der PER- und TIM-Menge und unabhängig voneinander (PER in der Regel etwas schneller). Das wurde durch die FRET-

Methode (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) festgestellt, bei der eine Resonanz erfolgt, wenn PER und TIM eng zusammen sind. Dann bilden sich rasch PER/TIM-Komplexe (wobei die FRET-Signale abnehmen).

In der Mutante *per^{L2}* mit einer circadianen Periode von 28 statt 24 Stunden wird der Übergang von PER und TIM in den Kern um 4 Stunden verzögert, ohne die Komplexbildung zu beeinflussen. Die Akkumulation im Kern ist um 8.5 Stunden verschoben. Assoziation und Dissoziation des Komplexes ist nicht geändert, aber die Sanduhr (Intervall-Timer), die im Cytoplasma abläuft, bevor PER und TIM in den Kern eintreten, ist beeinträchtigt.

DBT interagiert physikalisch mit PER, wenn dieses mit TIM einen Komplex gebildet hat. Ohne den Komplex wird PER durch DBT phosphoryliert, dadurch destabilisiert und in Proteasomen abgebaut. TIM stabilisiert also PER, indem es dessen Phosphorylierung durch DBT hemmt.

5.3 Wenn Licht hineinspielt

Ein Modell ist nur brauchbar, wenn es die Gegebenheiten auch erklären kann, die in der Wirklichkeit vorliegen. Im Fall der circadianen Uhr ist das zunächst einmal der zyklische Verlauf des Schlüpfens und der lokomotorischen Aktivität der Fliegen. Wie das auf molekularer Ebene geschieht, hatten wir in [Abschnitt 5.2](#) gesehen. Circadiane Uhren werden aber auch durch Außenfaktoren wie Licht und Temperatur beeinflusst. Wenn die gerade beschriebene Rückkopplungsschleife Grundlage der Rhythmen ist, muß sie auch die Synchronisation der Uhr durch den Tag-Nacht-Wechsel

²Bei dieser Mutante ist eine einzige Aminosäure in der PAS-Domäne geändert ([Baylies et al. \(1987\)](#)).

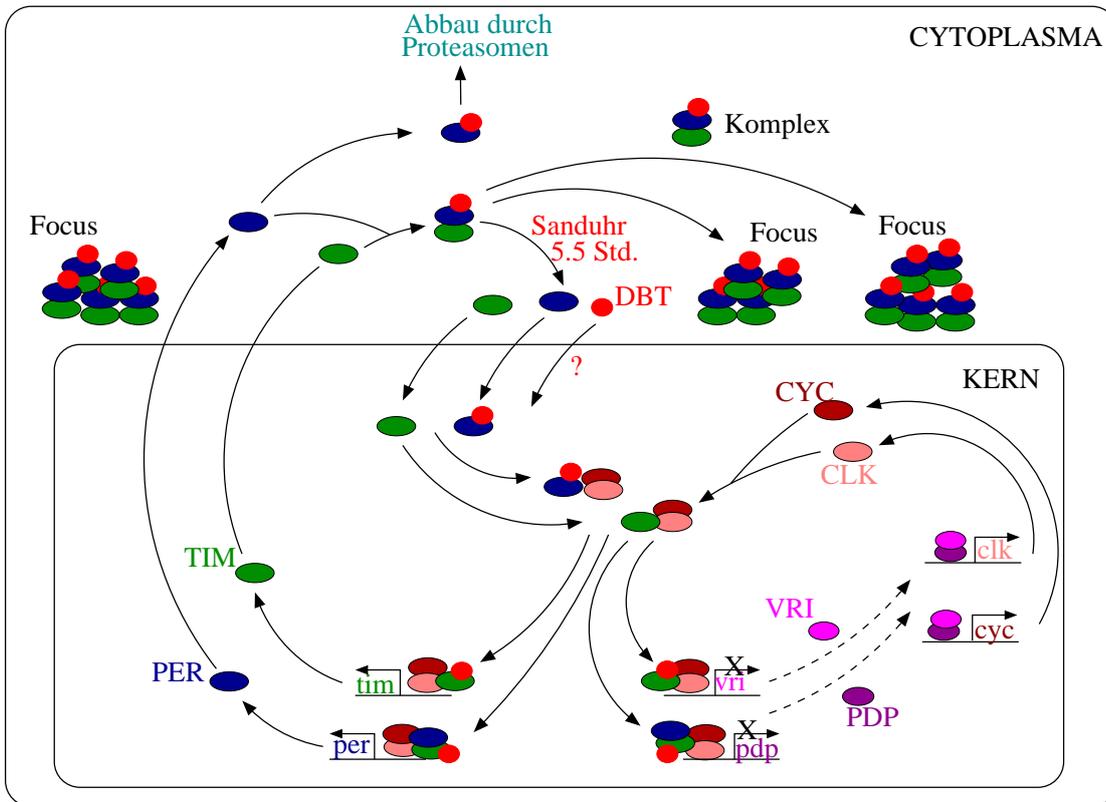


Abbildung 5.2: Modell der Akkumulation von PER, DBT und TIM im Kern von S2-Zellen nach Saez et al. (2007). PER (blau) und TIM (grün) werden von den per und tim-Genen im Kern exprimiert und gelangen ins Cytoplasma, wo sie entweder nach Phosphorylierung mit DBT (rot) durch Proteasomen abgebaut werden, oder aber einen Komplex TIM mit PER/DBT (grün/blau/rot) bilden. Diese Komplexe sammeln sich in Foci in der Nähe des Kernes an (Focus). Nach etwa 5.5 Stunden zerfällt der Komplex und die Bestandteile gelangen in den Kern. Dort verbinden sie sich mit CYC und CLK zu einem Komplex, der die Expression von CYC- und CLK-kontrollierten Genen wie tim, per, vri und pdp unterbindet (gestrichelte Pfeile). Vergleiche dieses Schema mit dem in Abbildung 5.1 und beachte die Unterschiede beim Transport in den Kern: Hier wird nicht der Komplex PER/DBT/TIM in den Kern transportiert, sondern die einzelnen Proteine. Das Auseinanderbrechen des Komplexes PER/DBT/TIM im Cytoplasma wird durch eine Art Sanduhr kontrolliert und dauert 5.5 Stunden. Bei der Mutante per^L dauert es 8.5 Stunden. Im Kern wird ein Komplex zwischen PER/DBT beziehungsweise TIM mit CYC/CLK gebildet, der die Expression von tim, per, vri und pdp hemmt. Nach Mackey (2007) und Saez et al. (2007)

erklären können. Außerdem muß sie erklären, wie Lichtpulse die Uhr verschieben. Schließlich muß sie auch zeigen, wie Dauerlicht die Uhr anhält. Das soll in diesem Abschnitt geschehen.

Was sind also die molekularen Grundlagen der Synchronisation durch Licht? Das wird erreicht, indem TIM, einer der Spieler, im Licht abgebaut wird; andere Spieler, also Uhr-Proteine, werden im Licht nicht abgebaut (Hunter-Ensor et al. (1996), Lee et al. (1996)). Im Dauerlicht ist deshalb wenig TIM vorhanden. Da der Spieler PER mit TIM ein Dimer bilden muss, um nicht abgebaut zu werden, ist auch wenig PER vorhanden (Price et al. (1995)). Die Produzenten von PER und TIM, nämlich die *per* und *tim*-mRNA, zeigen keine tagesperiodischen Schwankungen, sondern haben eine durchschnittliche Konzentration. Aus diesem Grunde oszillieren auch ihre Proteine im Dauerlicht nicht. Das würde molekularbiologisch erklären, warum im Dauerlicht der Tagesrhythmus verschwindet und statt dessen Arrhythmie gefunden wird. Die *per*⁰ und *tim*⁰ Mutanten sind arrhythmisch, weil bei ihnen dieser Zustand immer herrscht, auch im Licht-Dunkel-Wechsel (Qiu and Hardin (1996)). Damit wäre die Frage beantwortet, warum Dauerlicht die Uhr anhält.

Warum verschieben Lichtpulse den Rhythmus? Auch dafür ist der Abbau von TIM im Licht verantwortlich. Mißt man nämlich, wieviel TIM noch nach kurzen Lichtpulsen in den LN-Zellen (den Uhren-Zellen) ist, zeigt sich eine strenge Beziehung zu der Phasenverschiebung des Tagesrhythmus: Je stärker der Rhythmus durch Licht verschoben wurde, desto mehr TIM wurde auch abgebaut (Young (1998)). Blaulicht war dabei besonders wirksam. Im Blaulicht wird TIM auch besonders stark abgebaut. Vergleicht man die Wirkung anderer Wellenlängen des Lichtes, stimmen die Reaktionen auf Farblight beim TIM-Abbau und bei der

Phasenverschiebung überein. Beide Ereignisse sind offenbar eng miteinander verbunden. Damit wäre die Frage beantwortet, warum ein Lichtpuls den Rhythmus verschiebt.

TIM wird auch im Licht abgebaut, wenn PER fehlt. Ohne PER funktioniert aber die circadiane Uhr nicht. TIM wird also auch ohne funktionierende Uhr abgebaut (Suri et al. (1998)). Auch die Komplexaugen müssen nicht vorhanden sein, damit TIM im Licht abgebaut wird (Yang et al. (1998)). Das zeigt, dass der Abbau von TIM im Licht über einen extraretinalen Weg läuft. Das war ja bereits durch Verhaltensstudien bekannt.

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass der Abbau von TIM für die circadiane Lichtperzeption entscheidend ist. TIM ist aber nicht *direkt* Lichtempfindlich. Es wird auch nicht immer nach Lichtbeginn abgebaut. Zum Beispiel schwankt TIM im Larvenstadium in den Dorsal-Neuronen (DN) gegenläufig zu den LN, ist also während des Tages hoch und während der Nacht niedrig (Kaneko et al. (1997)). Was das biologisch bedeutet, ist unklar. Aber es zeigt, dass TIM unterschiedlich reguliert werden kann und nicht direkt Lichtempfindlich ist. Irgendwie muss das Lichtsignal biochemisch auf TIM übertragen werden, nachdem es von Lichtabsorbierenden Pigmenten absorbiert wurde.

Ein solches Pigment ist das *Drosophila*-Cryptochrom (DCRY)³. Es ist an der Lichtübertragung auf TIM beteiligt (Emery et al. (1998), Stanewsky et al. (1998)). Das Absorptionsspektrum von Cryptochrom entspricht dem Aktionsspektrum der Verhaltensrhythmen von *Drosophila* (Selby and Sancar (1999)). DCRY spielt also eine wichtige Rolle. Offenbar ist TIM ein direktes Ziel von DCRY. Tatsächlich wurde vor kurzem gezeigt, dass DCRY seinen Zustand nach Belichtung ändert. Es kann jetzt in den Kern gelangen und dort mit dem PER/TIM Komplex interagieren (Ceriani et al. (1999)). Dadurch wird der PER/TIM Komplex *inaktiviert*. Er kann

³Cryptochrome sind Flavoproteine (Übersicht: Cashmore et al. (1999)).

5.5 Warum Temperaturpulse eine Rolle spielen

nicht mehr an der negativen Rückkopplungsschleife teilnehmen. Der Abbau von TIM ist also nicht der erste Schritt bei Belichtung. Vielmehr kommt er zu stande, weil PER/TIM durch DCRY inaktiviert wird.

DCry wird in den LNV exprimiert, den circadianen Schrittmacherzellen (Egan et al. (1999)). Das gilt auch für die *Drosophila*-Larven. Die kleinen LNV sind schon vom ersten Larvenstadium an vorhanden und ihr PER und TIM schwanken circadian (Kaneko et al. (1997)). Die kleinen LNV der Larven werden durch Cryptochrom und die larvalen Augen synchronisiert (Stanewsky et al. (1998), Helfrich-Förster et al. (2002)). Fehlen beide Photorezeptoren, lassen sie sich nicht mehr synchronisieren. Es ist noch nicht bekannt, ob das auch für den Schlüpfrythmus gilt.

5.4 Warum Temperatur keine Rolle spielt

Wir erinnern uns: Die Umgebungstemperatur hat fast keinen Einfluß auf den circadianen Schlüpfrythmus und auf die Laufaktivität der Fliegen. Und das ist ja auch von einer anständigen Uhr zu erwarten. Sie darf bei höheren Temperaturen nicht schneller laufen oder bei niedrigeren Temperaturen bummeln. Aber wie wird das auf molekularer Ebene erreicht? Was sind die Grundlagen der Temperaturkompensation der circadianen Rhythmen von *Drosophila*?

Ein Modell von Goodwin (Leloup and Goldbeter (1997)) wurde von Ruoff and Rensing (1996) erweitert. Sie nehmen eine monomere und eine oligomere Form des PER-Proteins an. Das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen hängt von der Temperatur ab. In der *per^L* Mutante ver-

schiebt steigende Temperatur das Gleichgewicht zur monomeren Form und beide Formen werden langsamer abgebaut als bei *per⁺*. Bei *per^S* Mutanten ist das Gleichgewicht unbeeinflusst, aber *PER^S* wird schneller abgebaut (Ruoff et al. (1997)). Im Modell wird der Temperatureinfluss über Uhr-Protein-Abbau kontrolliert.

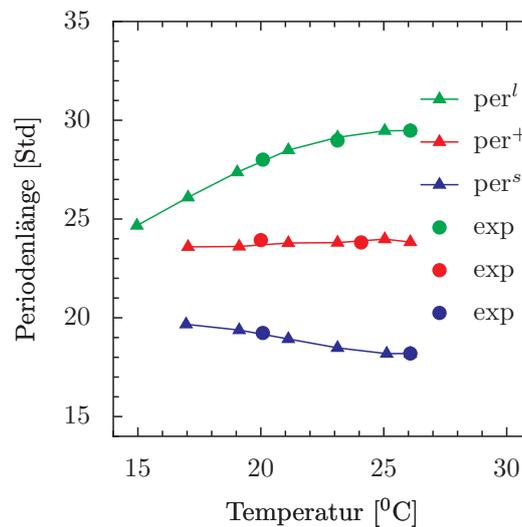


Abbildung 5.3: Die Temperaturkompensation des Laufaktivitätsrhythmus von *Drosophila* kann mit dem Goodwin-Oszillator erklärt werden (Ruoff et al. (1997)). Die Temperaturabhängigkeit der *Drosophila* Mutanten *per^L* (grün) und *per^S* (blau) werden erfolgreich vorausgesagt (Kreise sind Voraussagen, Dreiecke experimentelle Befunde) und die Temperaturkompensation des Wildtyps beziehungsweise von *per⁺* (rot) ist vorhanden. Nach Ruoff et al. (1997)

5.5 Warum Temperaturpulse eine Rolle spielen

Obwohl die Außentemperatur die Uhr in ihrer Geschwindigkeit nicht beeinflusst, rea-

giert sie durchaus auf plötzliche Änderungen der Temperatur. Wird zum Beispiel die Temperatur abgesenkt, verschiebt sich der Rhythmus. Die Periode bleibt aber in der nunmehr niedrigeren Temperatur konstant, wie im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben. Das gleiche ist zu beobachten, wenn die Temperatur erhöht wird. Eine kurzfristige Temperaturerniedrigung oder -erhöhung verschiebt ebenfalls den Rhythmus.

5.6 Uhr-getriebene Vorgänge

Wir hatten bereits in Abschnitt 3.1 gesehen, dass das Schlüpfen der Fliegen und ihre lokomotorische Aktivität von einer circadianen Uhr gesteuert wird. Weitere Vorgänge im Verhalten, in Geweben und Zellen werden ebenfalls circadian gesteuert. Wie greift die Uhr in diese Vorgänge ein, wie sieht das auf der molekularen Ebene aus? Es muss dazu Ausgänge der Uhr geben, die rhythmisch verlaufen.

Ein solcher Ausgang ist das Neuropeptid Pigment dispersing factor PDF. Es wurde ursprünglich als Pigment dispersing hormone PDH bei Krebsen gefunden und steuert bei diesen Tieren die Färbung. Bei Insekten hat es eine andere Funktion. Es überträgt den Rhythmus der circadianen Uhr in den Schrittmacherzellen LN_v auf das Verhalten (zum Beispiel Schlüpfen und lokomotorische Aktivität, [Remn et al. \(1999\)](#)).

6 Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?

*Wie kann man den Schlüpfrythmus und die Laufaktivität von *Drosophila* registrieren? Es werden verschiedene Methoden und Geräte vorgestellt, mit denen man den Schlüpfrythmus und die Laufaktivität von *Drosophila* registrieren kann. Es wird auch erwähnt, wie man die Daten sammelt und auswertet.*

Sicherlich möchtest Du nun endlich wissen, wie man eigentlich das Schlüpfen der Fliegen aus dem Puparium und das Herumlaufen der geschlüpften Tiere messen kann. Zwar kann man die Tiere bei diesen Vorgängen beobachten und sich Notizen machen, aber spätestens nach der zweiten durchwachten Nacht macht man sich Gedanken, ob es nicht auch mit automatischen Verfahren zu registrieren ist. Diese sollen in den nächsten Abschnitten vorgestellt werden.

6.1 Schlüpfrythmus messen

Der Schlüpfrythmus von *Drosophila* (und anderer Insekten) aus dem Puparium kann nur an einer Population festgestellt werden. Früher wurden dazu Schüttelapparaturen (*Bang boxes* im Englischen) verwendet. Die Puppen wurden mit Tapetenkleister an Metallplatten festgeklebt. Stündlich wurden die Platten mechanisch gehoben und fallen gelassen, sodass die geschlüpften Fliegen durch einen flachen Trichter herunter fielen. Sie stürzten in ein Gefäß mit Wasser und ertranken, weil ein trop-

fen Spülmittel die Oberflächenspannung reduzierte und sich die Fliegen deshalb nicht aus dem Gefäß retten konnten. Jede Stunde wurde mit einer Drehvorrichtung ein neues Gefäß unter die Trichter gebracht (Abbildung 6.1). Nach 24 Stunden wurde eine neue Drehscheibe mit 24 neuen Gefäßen unter die Schüttelapparatur gestellt. In den Gefäßen der Drehscheibe vom Vortag wurde ausgezählt, wieviele Tiere pro Stunde geschlüpft waren. Die Zahl der Fliegen wurde dann grafisch dargestellt (Abbildung 6.2).

Später wurde diese aufwändige und stör anfällige Methode verbessert. Die Puppen wurden auf Glasplatten geklebt und auf einen Teflon-Trichter gelegt. Unter dem Trichter-Ende befand sich eine Infrarot-Lichtschranke. Eine geschlüpfte Fliege konnte sich auf dem Teflon nicht halten (auf Glastrichterwänden geht das sehr wohl!) und fiel durch die Lichtschranke in ein Wassergefäß (Abbildung 6.3).

Bei einer anderen Methode werden die Puppen einzeln in Löcher einer Platte gebracht, auf deren Unterseite ein feines Netz verhindert, dass sie herausfallen. Über der Lochplatte liegt eine berußte Glasplatte. Beim Schlüpfen versuchen die Tiere, sich zu befreien und kratzen den Ruß ab. Sie sterben schnell ab und vertrocknen. Rotlicht kann von unten durch die vom Ruß freige kratzten Stellen auf eine Photozelle fallen. Je mehr Tiere geschlüpft sind, desto mehr Ruß wird abgekratzt und desto mehr Licht fällt auf die Photozelle. Ihre Span-

6 Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?

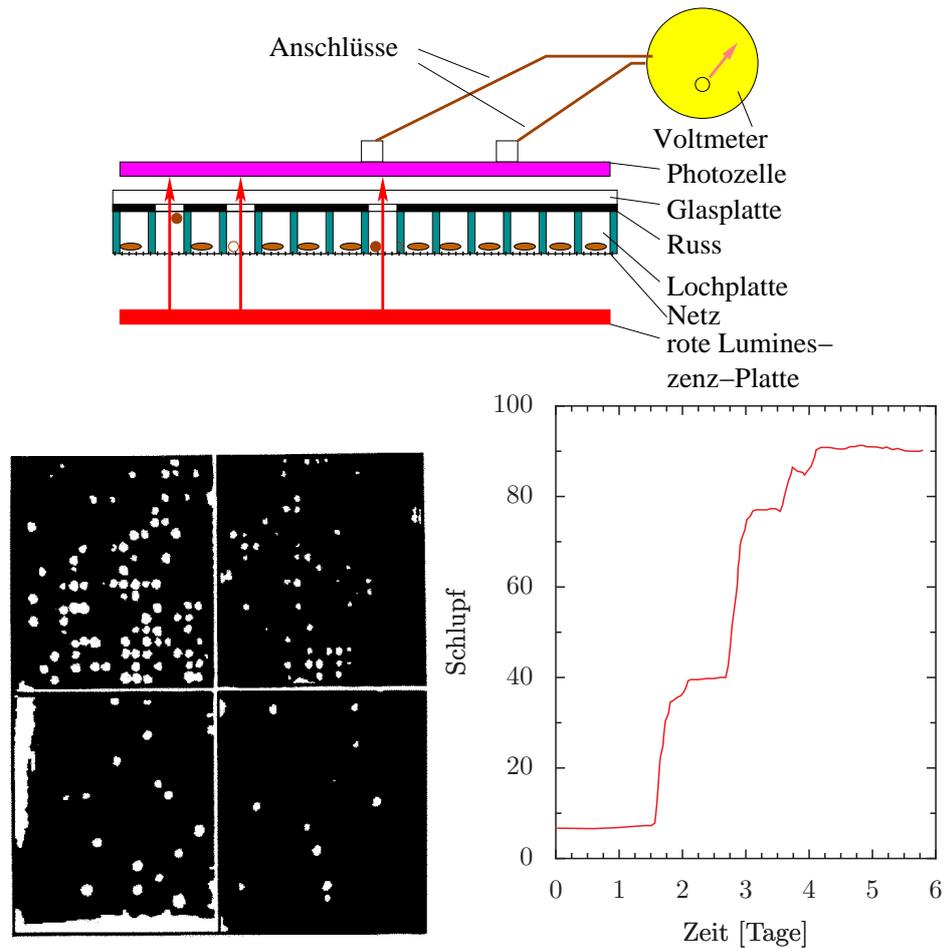


Abbildung 6.4: *Registrieren des Schlüpfrythmus von Drosophila-Fliegen mit der Ruß-Methode. Oben: Puppen (braun) werden einzeln in Löcher einer Lochplatte gebracht. Ein feines Netz auf der Unterseite verhindert, dass sie herausfallen. Über der Lochplatte liegt eine Glasplatte, deren Unterseite mit Ruß bedeckt ist. Beim Schlüpfen kratzen die Tiere den Ruß ab (helle Stellen im Ruß des oberen Bildes), sterben und vertrocknen. Rotlicht von unten (rote Pfeile) fällt durch die Ruß-freien Stellen auf eine Photozelle (lila), deren Spannung mit einem Voltmeter (gelb) oder über einen Computer registriert wird und ein Maß für die Zahl der geschlüpften Tiere ist. Links unten: Vier beruhte Glasplatten mit hellen Kreisen an Stellen, unter denen geschlüpfte Fliegen den Ruß abgekratzt haben. Rechts unten: Diagramm des Schlüpfens im Laufe von sechs Tagen. Je mehr Tiere schlüpfen, umso mehr Ruß wird abgekratzt und umso mehr Licht fällt auf die darüber liegende Photozelle. Damit steigt die Spannung, die somit die Zahl der geschlüpften Fliegen widerspiegelt*

6.1 Schlüpfrythmus messen

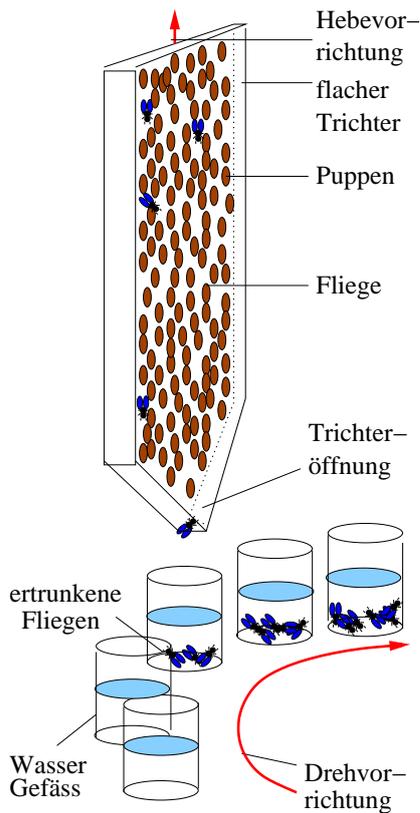


Abbildung 6.1: *Registrieren des Schlüpfrythmus von Drosophila-Fliegen mit Schüttelapparatur.* Flacher Trichter enthält eine Platte, auf der Puppen mit Tapetenkleister aufgeklebt sind. Vorderseite und Oberseite sind verschlossen. Stündlich wird der Trichter durch eine Hebevorrichtung mehrfach angehoben und fallen gelassen (roter Pfeil ganz oben). Dabei fallen die in dieser Stunde geschlüpften Fliegen in ein Wassergefäß und ertrinken. In der nächsten Stunde schiebt ein Drehmechanismus das nächste Wassergefäß unter die Trichteröffnung und am Ende der Stunde werden wieder die Fliegen herausgeschüttelt. Die ertrunkenen Fliegen werden ausgezählt (siehe Abbildung 6.2)

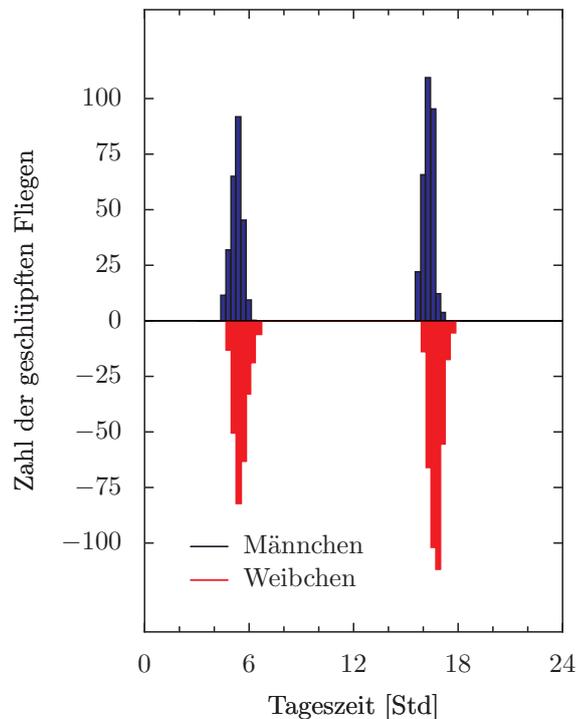


Abbildung 6.2: *Mit der Schüttelmaschine (Abbildung 6.1) wurden jede Stunde die geschlüpften Fliegen in Wassergefäßen gesammelt und die Zahl der männlichen Fliegen (nach oben aufgetragen) und der weiblichen Fliegen (nach unten aufgetragen) bestimmt. Das Schlüpfen erfolgt in den frühen Morgenstunden. Die Männchen schlüpfen etwas früher als die Weibchen (also nicht ladies first)*

6 Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?

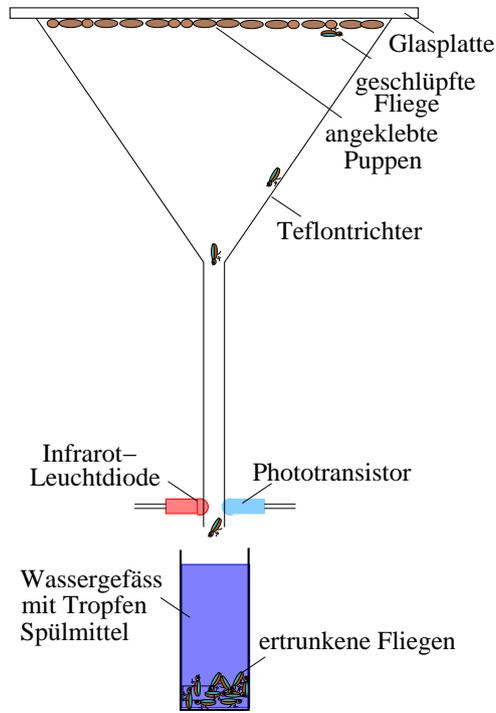


Abbildung 6.3: *Registrieren des Schlüpf-rythmus von Drosophila-Fliegen aus dem Puparium mit teflonisierten Trichtern und Infrarot-Lichtschranken am Ende des Trichters. Die Puppen werden mit Tape-tenkleister auf die Unterseite einer Glasplatte geklebt. Sie liegt auf einem Teflontrichter. Geschlüpfte Fliegen rutschen auf diesem ab und fallen durch eine Infrarot-Lichtschranke am Ende des Trichterrohres in ein Gefäß mit Wasser. Zahl und Zeitpunkt der geschlüpfen Fliegen kann so bestimmt werden*

nung ist demnach ein Maß für die Zahl der geschlüpfen Tiere (Abbildung 6.4, Engelmann (1999)).

Statt einer Photozelle kann man auch eine Videokamera über den Platten anbringen und mit einem Bildanalyseprogramm die Zahl der freigekehrten Löcher und damit die Zahl der geschlüpfen Tiere bestimmen.

6.2 Laufrythmus messen:

Um die lokomotorische Aktivität von *Drosophila* zu registrieren, werden einzelne Fliegen in kleinen Gefäßen wie zum Beispiel Spektralphotometer-Küvetten gehalten. Ein kleines Stückchen Hagelzucker und der Docht einer Wasserflasche genügen, um die Tiere einige Wochen am Leben zu halten. Die Laufaktivität wird mit einer Infrarot-Lichtschranke gemessen (Engelmann (1999)). Läuft die Fliege durch die Lichtschranke, wird ein elektrisches Signal erzeugt und gespeichert. Aus den Daten lassen sich Aktogramme erzeugen. Oft reduziert man dabei die Information. Man bestimmt also nicht, wie oft ein Tier in einem bestimmten Zeitraum die Lichtschranke unterbrochen hat. Stattdessen stellt man fest, ob ein Tier in einem bestimmten Zeitintervall (beispielsweise in 4 Minuten) mindestens einmal (oder mindestens n mal) aktiv war. Dann wird aus dem Histogramm ein Strich-Aktogramm (Abbildung 4.2).

Besonders vielseitig lassen sich Bildanalyseverfahren einsetzen. Mit einer Videokamera wird das Verhalten des Insekts registriert und die Bilder mit Bildanalyseprogrammen ausgewertet. Hier lassen sich sehr viel mehr Informationen auswerten als bei dem vorher geschilderten Verfahren mit Lichtschranken. So kann festgestellt werden, an welchen Stellen des Käfigs sich das

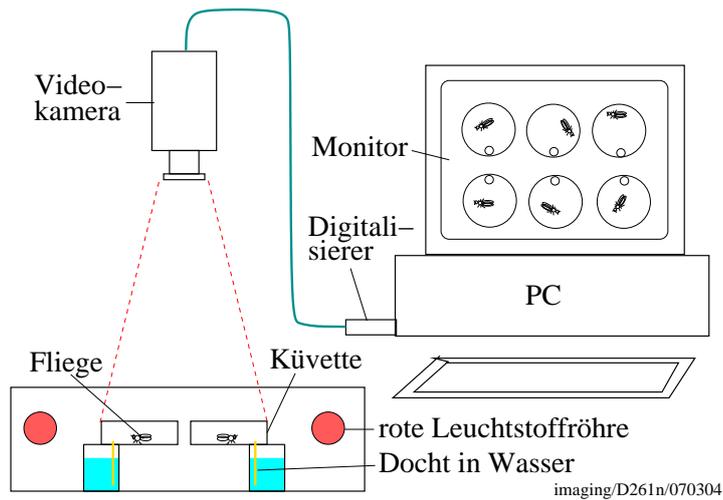


Abbildung 6.5: Das Verhalten von einzelnen Drosophila-Fliegen kann mit einer Video-Kamera registriert und mit einem Rechner ausgewertet werden. Die (Spektralphotometer-) Küvetten enthalten je eine Fliege, ein kleines Stück Zucker (als Futter) und einen Docht zu einem Wasserbehälter (zum Trinken). Außerdem haben die Küvetten eine seitliche Öffnung mit Netz zur Belüftung. Licht roter Leuchtstoffröhren (die zusätzlich noch mit einer roten Folie umwickelt sind) beleuchtet die Tiere von der Seite, sodass sie mit der Video-Kamera erkannt werden. Die Bilder werden in regelmäßigen Abständen digitalisiert und mit einem Programm umgewandelt. Auf diese Weise kann die Position der Tiere verfolgt und das Verhalten (Trinken, Fressen, Putzen) erkannt werden. Nach Schuster 1988 und Engelmann, unveröffentlicht

6 *Wie wird Schlüpfen und Laufen der Fliegen registriert?*

Tier befindet, ob es frißt oder ob es trinkt
(Abbildung 6.5).

7 Bedeutung der Rhythmen

Werden Fliegen in nicht-24-Stunden Tagen gehalten (21- oder 27-Stunden Tage) oder wird ihre innere Uhr häufig verschoben, sterben sie früher. Am längsten leben Fliegen, die auch im Alter einen guten Tagesrhythmus besitzen. Arrhythmische *Drosophila*-Mutanten haben weniger Nachkommen.

Wir hatten schon im Kapitel 2 gesehen, was ein Tagesrhythmus für eine Fliege bedeutet, die aus der schützenden Puppenhülle im Erdboden in eine gefährliche Umwelt gelangt. Der richtige Schlupfzeitpunkt kann über Leben und Tod entscheiden. Es ist also von hohem Wert, eine präzise innere Uhr zu haben. Es gibt aber auch andere Vorteile einer Tagesuhr.

Das zeigte sich bei Versuchen von [Pittendrigh and Minis \(1972\)](#) mit *Drosophila melanogaster*-Fliegen. Ein Teil der Tiere wurde in Kunsttagen gehalten, deren Periode nicht 24 Stunden betrug, sondern 27 Stunden. Ein anderer Teil der Fliegen lebte in einem 21-Stunden-Tag. Als Kontrolle wurden Tiere verwendet, die sich in einem normalen 24-Stunden-Tag befanden. Von jeder der drei Gruppen wurde jeden Tag die Zahl der toten Tiere bestimmt. [Abbildung 7.1](#) zeigt, daß die Tiere im normalen 24-Stunden-Tag am längsten lebten. Es könnte sein, daß die innere Uhr in den zu schnellen oder zu langsamen künstlichen Tagen Probleme hatte, sich anzupassen und daß deshalb die Tiere früher starben als ihre glücklicheren Artgenossen im Normaltag.

Bei anderen Fliegen wurde ein ähnlicher Versuch gemacht: [Aschoff et al. \(1971\)](#) hiel-

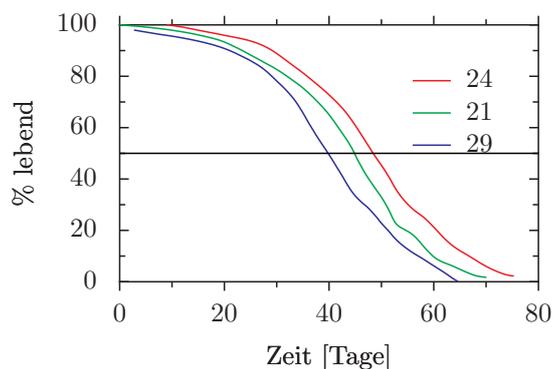


Abbildung 7.1: Lebensdauer von *Drosophila* unter 24-Stunden-Zyklen und nicht-24-Stunden-Zyklen. Am längsten leben die Fliegen in 24-Stunden-Zyklen (rote Kurve, 12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit). In 21-Stunden-Zyklen (grüne Kurve, 10.5 Stunden Licht, 10.5 Stunden Dunkelheit) nimmt die Zahl der noch lebenden Fliegen mit der Zeit (x -Achse) schneller ab, und noch kürzer leben Fliegen, die in 27-Stunden-Zyklen (blaue Kurve, 13.5 Stunden Licht, 13.5 Stunden Dunkelheit) gehalten wurden. Nach [Pittendrigh and Minis \(1972\)](#)

7 Bedeutung der Rhythmen

ten *Phormia terrae novae*-Fliegen in einem 12:12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel. Eine Gruppe wurde jede Woche um sechs Stunden verzögert, als ob sie von Europa nach USA geflogen worden wären. Bei einer anderen Gruppe wurde der Rhythmus um sechs Stunden vor-verschoben (als ob sie von USA nach Europa geflogen worden wären). Bei einer dritten Gruppe wurde in einer Woche der Rhythmus verzögert, in der nächsten verfrüht, danach wieder verzögert. Eine vierte Gruppe blieb als Kontrolle immer im gleichen Rhythmus. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe war die Lebensdauer der Tiere in den drei Versuchsgruppen verkürzt (Abbildung 7.2). Es könnte sein, daß auch hier die Fliegen Probleme hatten, die ihre innere Uhr immer wieder verschieben mußten, um sich an die Zeitverschiebungen anzupassen, die das ‘Reisen über Zeitzonen’ mit sich brachten.

In einem anderen Experiment wurden *Musca domestica*-Fliegen nach dem Schlüpfen in schwachem Dauer-Rotlicht gehalten und ihre lokomotorische Aktivität gemessen. Sie zeigten für einige Zeit einen circadianen Rhythmus, aber die meisten Tiere wurden nach einiger Zeit arrhythmisch. Es zeigte sich, dass die Tiere am längsten lebten, die am Ende noch rhythmisch waren (Abbildung 7.3). Das könnte bedeuten, dass Fliegen mit einem stabilen circadianen Rhythmus länger leben.

Es wäre interessant, durch Versuche herauszubekommen, ob die Lebensdauer verkürzt wird, wenn der circadiane Rhythmus völlig unterbunden wird.

Von [Klarsfeld and Rouyer \(1998\)](#) wurde die Lebensspanne einer kurzperiodischen (per^T , Periodenlänge 16 Stunden) und einer langperiodischen Mutante (per^L , Periodenlänge 29 Stunden) von *Drosophila melanogaster* in einem Tag mit 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel und in ei-

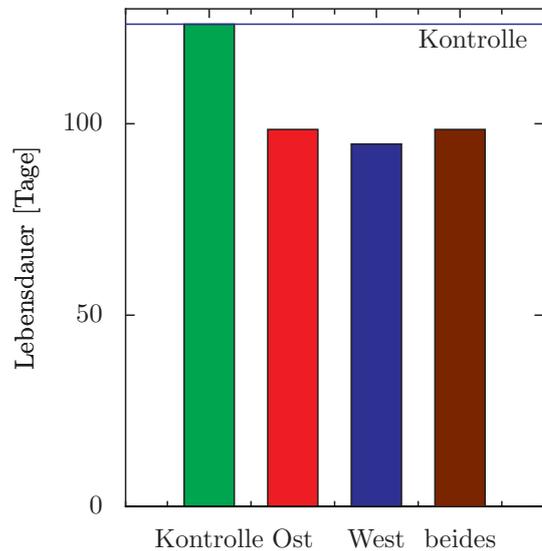


Abbildung 7.2: Lebensdauer von *Phormia terrae novae* Fliegen, deren Licht-Dunkel-Zyklus jede Woche einmal um 6 Stunden nach früheren (‘Ost’, weil Verfrühhung einem Flug nach Osten entspricht) oder späteren Zeiten (‘West’, weil Verspätung einem Flug nach Westen entspricht) verschoben wurde. Eine Gruppe (‘beides’) wurde sowohl nach Osten als auch nach Westen Zeit-verschoben. Kontrolltiere, deren Licht-Dunkel-Wechsel nicht verschoben wurde, leben im Schnitt 125 Tage (blaue Kurve). Nach [Aschoff et al. \(1971\)](#)

LD-Wechsel	per^+	per^T	per^L
8:8	50.9 ± 1.3 (9)	46.9 ± 0.5 (7)	48.5 ± 0.5 (8)
12:12	52.4 ± 0.8 (8)	44.4 ± 0.9 (8)	47.6 ± 0.9 (5)

Tabelle 7.1: Lebensdauer beim Wildtyp per^+ und einer kurz- (per^T) und langperiodischen (per^L) Mutante von *Drosophila melanogaster* in Tagen, mit Standardfehler und Zahl der Versuchswiederholungen in Klammern. Aus [Klarsfeld and Rouyer \(1998\)](#)

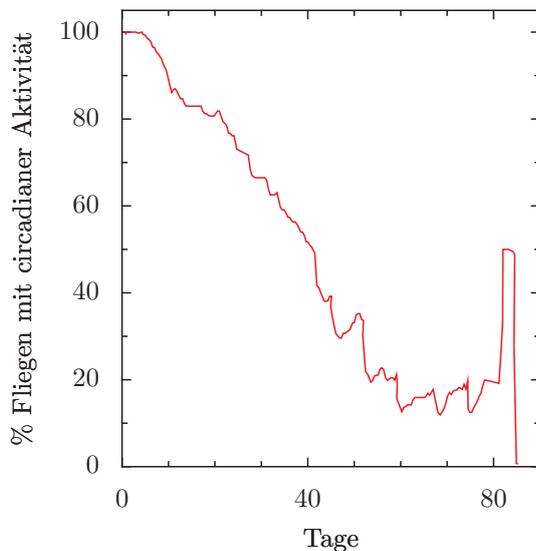


Abbildung 7.3: Prozentsatz von Fliegen mit circadianem Rhythmus unter konstanter Temperatur im schwachen Rotlicht. Im Laufe der Zeit (x -Achse, Tage) verlieren immer mehr Tiere ihren Tagesrhythmus (sie werden also arhythmisch). Aber ab dem sechzigsten Tag bleibt der Prozentsatz etwa gleich und nimmt ganz am Ende, als fast alle Tiere gestorben waren, auf 50% zu (Engelmann, unveröffentlicht)

nem 8:8 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel untersucht. Wie Tabelle 7.1 zeigt, ist die Lebensspanne der per^+ -Tiere (die dem Wildtyp entsprechen) größer als die der per -Mutanten, und zwar unabhängig vom Licht-Dunkel-Wechsel.¹ Siehe auch [Allemand et al. \(1973\)](#).

Arhythmische Mutanten (per^0) von *Drosophila melanogaster* geben bei der Kopulation weniger Spermien ab. Die Weibchen legen weniger Eier und mehr davon sind unfruchtbar ([Beaver et al. \(2002\)](#)). Die Zahl der Nachkommen ist daher geringer, sie haben also eine geringere reproduktive Fitness. Bei den per^+ -Tieren (bei denen das mutierte Gen wieder in Takt ist) sind hingegen die Daten wie beim Wildtyp (Tabelle 7.2). Uhr-Gene sind also wichtig für reproduktive Fitness.

¹[Konopka et al. \(1994\)](#) hatten keine Unterschiede in der Lebensdauer gefunden, aber die von ihnen verwendeten Mutanten hatten weniger extreme Periodenlängen

7 Bedeutung der Rhythmen

Typ	Eier/Paar	% unbefruchtet	Nachkommen/Paar
Wildtyp	71.2	6.2	65.7
<i>per</i> ⁰	49.7	10.3	45.7
<i>per</i> ⁺	65.7	4.6	60.9

Tabelle 7.2: *Reproduktive Fitness beim Wildtyp und einer arhythmischen Mutante von Drosophila melanogaster. Die Eier pro Paar, die Zahl der unbefruchteten Eier und die Nachkommen pro Paar sind für die arhythmische Mutante *per*⁰ geringer als für die des Wildtyps. ‘Reparierte’ Mutanten *per*⁺ haben hingegen wieder etwa die gleichen Werte wie der Wildtyp. Uhr-Gene sind also wichtig für reproduktive Fitness. Aus [Beaver et al. \(2002\)](#)*

8 Jahreskalender der Fliegen

Fliegen überdauern die harschen Winter in den höheren Breitengraden, indem sie in einen besonderen Ruhezustand gehen. In diesem Stadium der Diapause wird der Stoffwechsel gedrosselt, die Kälteresistenz erhöht und die Fortpflanzung eingestellt. Ob der Winter naht, merken die Fliegen an den kürzer werdenden Tagen. Sie müssen dazu die Tageslänge messen können und nach einer bestimmten Zahl von Kurztagen die Diapause beginnen. Das Ende des Winters wird entweder an den längeren Tagen im Frühjahr erkannt, oder meistens daran, daß es nach niedrigen Temperaturen im Winter im Frühjahr wieder wärmer wird.

Fliegen gehen wie viele andere Insekten der höheren Breitengraden in einen besonderen Ruhezustand, wenn der Winter naht. Man nennt ihn Diapause. Was dabei passiert, woran die Fliegen merken, daß der Winter naht, und wie das Ende des Winters erkannt wird, soll in den folgenden Abschnitten erklärt werden. Wir werden sehen, daß Fliegen wie viele andere Organismen einen inneren Jahreskalender besitzen, der durch die Tageslänge mit dem Jahreslauf synchronisiert wird. Das ist besonders gut an *Drosophila littoralis* untersucht worden.

8.1 Wie kommt eine Fliege über den Winter?

Wenn Du Dir eine Fruchtfliege anschaust, kannst Du Dir sicherlich schwer vorstellen, wie so ein zartes Gebilde einen Win-

ter in den höheren Breitengraden überdauern kann. Aber sie kann es, wie ihre schiere Gegenwart zeigt. Wie bringt sie das fertig? In dem Buch 'Biokalender' (Engelmann (2003)) habe ich gezeigt, wie Insekten den Winter in einem besonderen Stadium verbringen, in dem sie gegen die Unbilden der Witterung geschützt sind. Die Entwicklung und Fortpflanzung der Tiere hört für die Zeit des Winters auf. Dieser Diapause-Zustand kann in verschiedenen Entwicklungsstadien der Insekten eintreten.

Auch bei *Drosophila*-Arten wurden mehrere Fälle von Diapause beschrieben. Sie kann je nach der Art im Adultstadium, im Puppenstadium oder im Larvenstadium stattfinden. Als Fliege überwintern zum Beispiel *Drosophila nitens* (Burla (1951)), *Drosophila robusta* (Carson and Stalker (1948)), *Drosophila subobscura* (Basden (1954)), *Drosophila phalerata*, *Drosophila littoralis*, *Drosophila transversa* und *Drosophila subobscura*. *Drosophila alpina* verbringt den Winter im Puppenstadium. Im Larvenstadium überwintert *Drosophila deflexa* und verpuppt sich erst im Frühjahr (Basden (1954)).

In Japan wurde das Überwintern zahlreicher *Drosophila*-Arten von Toda (1979) und Beppu et al. (1996) untersucht. Bei *Drosophila aurelia* unterscheiden sich die geographischen Rassen der japanischen Inseln durch ihre Temperaturabhängigkeit (Pittendrigh and Takamura (1987)). Wahrscheinlich ist Diapause bei *Drosophila*-Arten in gemäßigten und vor allem in hö-

heren Breiten weiter verbreitet als bisher bekannt.

haben keine Diapause (Lankinen and Lumme (1984)).

8.2 Woran merkt eine Fliege, daß der Winter naht?

Wenn eine *Drosophila* sich erst dann auf den Winter umstellen wollte, wenn der erste Frost kommt, würde sie erfrieren. Sie muß andere Zeichen der Umwelt benutzen, die den baldigen Winter ankündigen. Am sichersten ist es, dafür die Tageslänge (*Photoperiode*) zu benutzen. Sie ist auch dann verlässlich, wenn einmal ein ausgesprochen milder Herbst herrscht. Tatsächlich wird von vielen Organismen eine photoperiodische Reaktion verwendet, um auf den Winter umzuschalten. Auch bei Insekten ist das so, und *Drosophila* ist keine Ausnahme. Wenn die Tageslängen im Herbst kürzer werden, gehen die Tiere in Diapause.

Als Beispiel für Diapause bei Fruchtfliegen soll *Drosophila littoralis* dienen. Die Art kommt in Europa in verschiedenen geographischen Rassen von Nordfinnland bis Italien vor. Die Weibchen sind photoperiodisch empfindlich. Es handelt sich also um eine Diapause im Adultstadium. Im Kurztag werden keine Eier gebildet. Die Gonaden bleiben klein. Zu einer bestimmten Zeit im Herbst wird für die Tiere die kritische Tageslänge erreicht, durch die Diapause induziert wird. Je nach der geographischen Breite, in der die verschiedenen Rassen leben, unterscheidet sich diese kritische Tageslänge (Abbildung 8.1). Sie beträgt bei Tieren von Oulu in Nordfinnland (65.0°N) 20 Stunden, bei Tieren vom Inari-See, also noch weiter im Norden (68.8°N), 18.8 Stunden, 18 Stunden bei Tieren von Paltamo in Finnland (65.0°N), 12.3 Stunden bei Tieren von Batumi in Aserbeidschan (41.6°N). Tiere vom Tessin in der Schweiz (46.2°N)

8.3 Wie mißt eine Fliege die Tageslänge?

Um auf die Tageslänge zu reagieren, damit die Diapause eingeleitet werden kann, muß die Lichtperiode gemessen werden. Es war Bünning's Idee (Bünning (1936)), daß dazu von den Organismen eine innere Tagesuhr benutzt wird. Er schlug auch ein Modell vor, wie diese Zeitmessung ablaufen könnte. Es ist in Abbildung 8.2 dargestellt und erklärt.

Licht hat nach diesem Modell zwei Funktionen: Es synchronisiert die circadiane Uhr, und es induziert die photoperiodische Reaktion, wenn die photoperiodische Konstellation der Jahreszeit für den betreffenden Organismus stimmt. Die interne Schwingung mit ihren verschiedenen circadianen Phasen (photophil und skotophil) fällt mit dem externen Rhythmus des Licht-Dunkel-Zyklus je nach der Tageslänge in verschiedener Weise zusammen. Davon hängt ab, ob es Diapause im Kurztag oder Entwicklung der Tiere im Langtag gibt.

Bünning's Hypothese wurde später modifiziert. Statt der skotophilen Phase, die nach Bünning etwa die Hälfte des Tages einnimmt, ist nur ein kurzer Abschnitt der Schwingung Licht-empfindlich. Diese Zeit wird Licht-induzierbare Phase Φ_i genannt. Damit es zur Diapause kommt, muß der externe Licht-Dunkel-Zyklus mit Φ_i in der richtigen Art zusammenfallen (siehe Abbildung 8.3). Dieses Modell wurde *externes Koinzidenzmodell* genannt (Pittendrigh (1964)).

Sowohl nach der Bünning-Hypothese als auch nach dem modifizierten Modell benutzt

8.3 Wie mißt eine Fliege die Tageslänge?

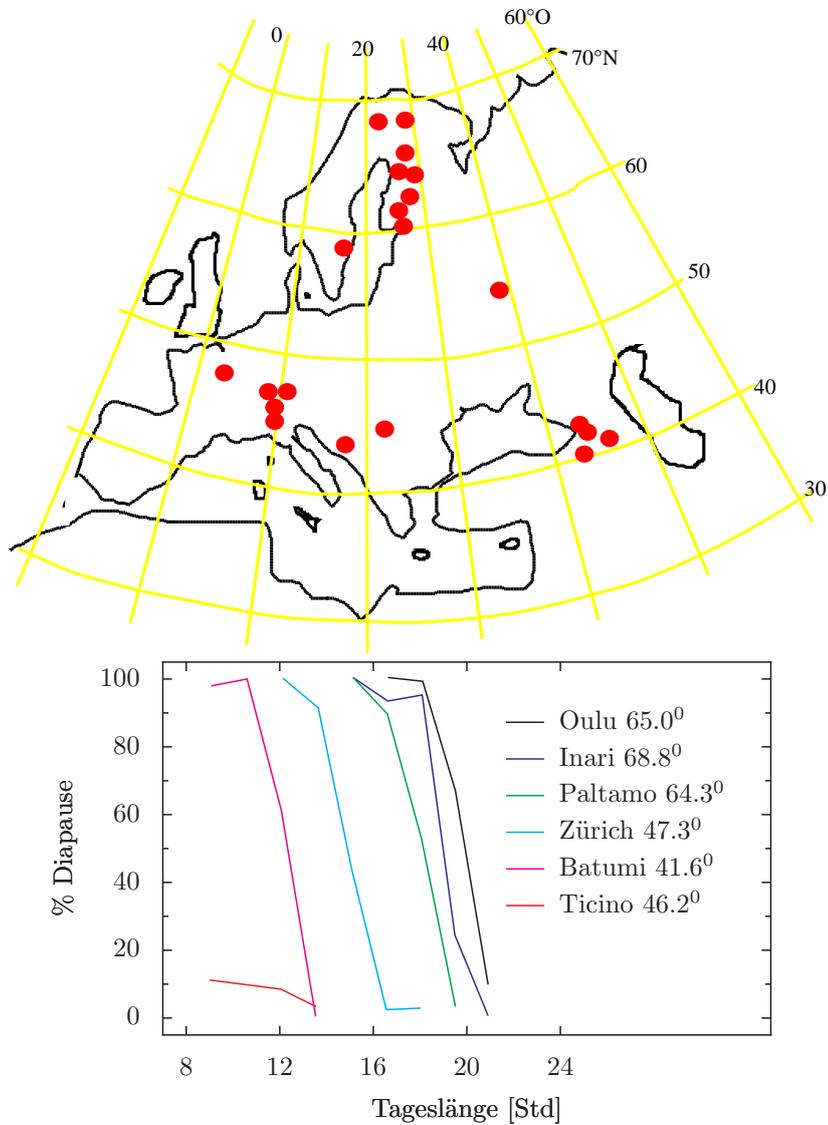


Abbildung 8.1: Die kritische Tageslänge der Diapause-Induktion nimmt bei verschiedenen geographischen Rassen von *Drosophila littoralis* (Herkunft siehe Markierungen in der Karte von Europa, oben) mit höherem Breitengrad zu (40 bis 70°N, unten). Nach [Lankinen and Lumme \(1984\)](#)

8 Jahreskalender der Fliegen

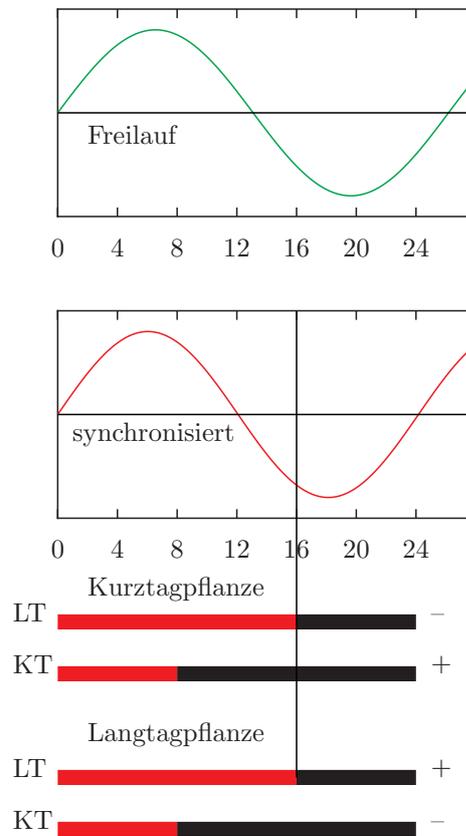


Abbildung 8.2: Bünning-Modell für die photoperiodische Induktion der Diapause. Licht hat zwei Funktionen:

Es synchronisiert die circadiane Uhr auf den Licht-Dunkel-Zyklus. Die obere Kurve zeigt eine freilaufende Schwingung unter konstanten Bedingungen ohne Zeitgeber (also ohne Licht-Dunkel-Zyklus und ohne Temperatur-Zyklus). Die beiden unteren Kurven zeigen Rhythmen, die durch den Licht-Dunkel-Zyklus auf den 24 Stunden Tag synchronisiert wurden. Die mittlere Kurve zeigt die Situation für Langtag, die untere Kurve für Kurztag. Zweitens beeinflusst Licht das photoperiodische System unterschiedlich, je nachdem, ob Kurztag oder Langtag herrscht. Im Langtag fällt die lange Lichtperiode (weiße Fläche über der x-Achse) nicht nur mit der so genannten 'photophilen Phase' (Licht-liebend, roter Teil der Kurve) zusammen, sondern teilweise auch mit der skotophilen Phase ('Dunkel-liebend', grauer Teil der Kurve). In diesem Fall würde die Diapause verhindert. Im Kurztag wird die skotophile Phase nicht beleuchtet und Diapause wird induziert. Nach [Bünning \(1983\)](#)

8.4 Wie werden die Kurztage gesehen und gezählt?

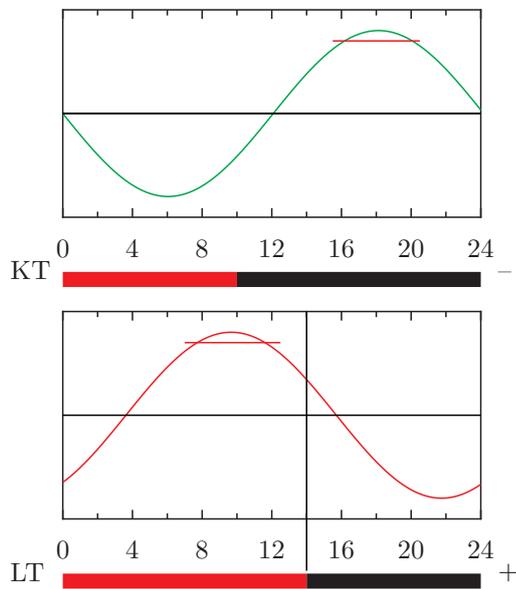


Abbildung 8.3: *Externes Koinzidenzmodell für photoperiodische Reaktionen. Licht synchronisiert die circadiane Uhr auf den äußeren Licht-Dunkel-Zyklus. Die Phase der Oszillation ist hier nicht auf Licht an festgelegt. Obere Kurve (grün): Im 10:14 Stunden Kurztag (KT). Untere Kurve (blau): Im 14:10 Stunden Langtag (LT). Eine Licht-empfindliche Phase θ_i (rot markiert) des Oszillators über einem Schwellenwert muss mit Licht zusammenfallen, wenn es zu einer photoperiodischen Reaktion kommen soll (roter Strich in beiden Kurven). Nach Pittendrigh (1964)*

zen die Organismen also bei photoperiodischen Reaktionen ihre circadiane Uhr, um die Tageslänge zu messen. Allerdings zeigte sich, daß die Geschichte komplizierter ist, als zunächst angenommen wurde. Das ergab sich bei Untersuchungen der Diapause von weiblichen *Drosophila melanogaster*-Fliegen.

Bei ihnen wird im Kurztag Diapause induziert, indem die Weibchen keine Eier mehr produzieren. Mutanten ohne tagesrhythmischen Schlüpfen und ohne tagesrhythmische Aktivität gehen aber in Diapause, obwohl die circadiane Uhr fehlt, die ja die Tageslänge messen soll (siehe Abbildung 8.4, Saunders et al. (1989)). Allerdings ist bei den arrhythmischen Mutanten die kritische Lichtperiode um einige Stunden kürzer. Das *per* Gen beeinflusst also die photoperiodische Zeitmessung, aber es ist nicht unbedingt nötig, um Diapause zu induzieren.

Das zeigt: Offenbar gibt es mindestens zwei verschiedene circadiane Uhren, von denen die eine die Aktivität der Tiere steuert, während die andere die Tageslänge mißt. Das *per* Gen ist nicht kausal beim Messen der Tageslänge durch die photoperiodische Uhr beteiligt. Es beeinflusst aber die photoperiodische Zeitmessung, da bei Fliegen mit defektem (*per*⁰¹) oder fehlendem (*per*⁻) *per*-Locus die kritische Dunkelperiode geändert ist.

Bei der Tageslängenmessung sind neuronale und hormonelle Ereignisse beteiligt, wie an *Drosophila grisea* gezeigt wurde (Kambysellis and Heed (1971)).

8.4 Wie werden die Kurztage gesehen und gezählt?

Um die Tageslänge zu messen, müssen Rezeptoren das Licht wahrnehmen und an

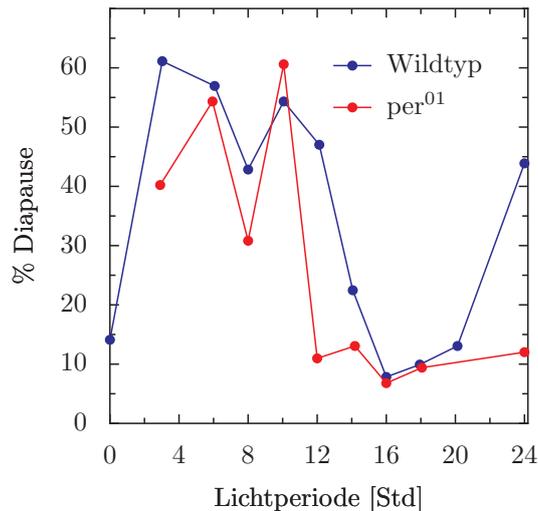


Abbildung 8.4: Die kritische Tageslänge der arrhythmischen Mutante *per^o* von *Drosophila littoralis* ist kürzer als die des Wildtyps. Nach Lankinen and Lumme (1984)

Zentren weiterleiten, in denen dann die photoperiodische Entscheidung für oder gegen Diapause getroffen wird. Wir hatten bereits gesehen (Abschnitt 3.2), daß für die Synchronisation der circadianen Uhr weder die Komplexaugen noch die Ozellen nötig sind. Das gilt auch für die photoperiodische Zeitmessung. Die dafür zuständigen extraretinalen Rezeptoren und die circadiane Diapause-Uhr befinden sich im Zentralgehirn, und zwar möglicherweise in der Pars intercerebralis des Mittelhirns.

In der Regel werden zur Induktion der Diapause und anderer photoperiodischer Vorgänge mehr als ein induktiver Tag benötigt. Ein Modell von Lewis and Saunders (1987) erklärt, warum die Zahl der Zyklen wichtig ist, und wie das geschieht. Es ist das Ergebnis eines gedämpften circadianen Oszillators, wie in Abbildung 8.5 erklärt. Wenn die Auslenkung der Schwingung groß genug ist, wird jeden Tag ein Faktor auf-

summiert, bis nach einer bestimmten Zahl von Tagen eine Schwelle erreicht worden ist. Sie ermöglicht die Induktion der Diapause. Neurosekretorische Zellen im Zentralgehirn scheinen dabei beteiligt zu sein.

8.5 Wann ist der Winter vorbei?

Rechtzeitig in Diapause zu gehen ist eine Sache. Genauso wichtig ist es aber, am Ende des Winters wieder aus der Diapause zu kommen und weiterzuleben. Die *Drosophila* muß Zeichen der Umwelt als Signale benutzen, um die Diapause zu beenden. Man könnte sich vorstellen, daß dazu auch wieder die Tageslänge benutzt wird. Die Tageslänge nimmt ja im Frühjahr wieder zu, und sie ist ein sehr zuverlässiger Zeitgeber der Jahreszeit. Das ist auch gelegentlich so, aber meistens werden zwei Dinge verwendet, um die Diapause zu beenden. Einmal brauchen die Tiere eine gewisse Anzahl von Tagen mit niedrigen Temperaturen ('Winter'), zum anderen müssen die Temperaturen in der Umwelt wieder für die Entwicklung günstig sein. Diese Strategie ist auch sinnvoll für Fliegen, die den Winter in Verstecken verbringen, in die kein Licht dringt.

8.6 Diapause und Vererbung

Die Genetik der Diapause verschiedener Stämme von *Drosophila littoralis* wurde von einer Gruppe in Oulu (Finnland) untersucht (Abbildung 8.6, Lankinen and Lumme (1984)). Der genetische Faktor für Diapause segregiert wie eine einzelne Mendelsche Einheit. Er befindet sich auf dem x-Chromosom in der Nähe des white-Locus und ist variabel genug, um die unterschiedlichen kritischen Tageslängen (12 bis 18 Stunden) der verschiedenen geographischen

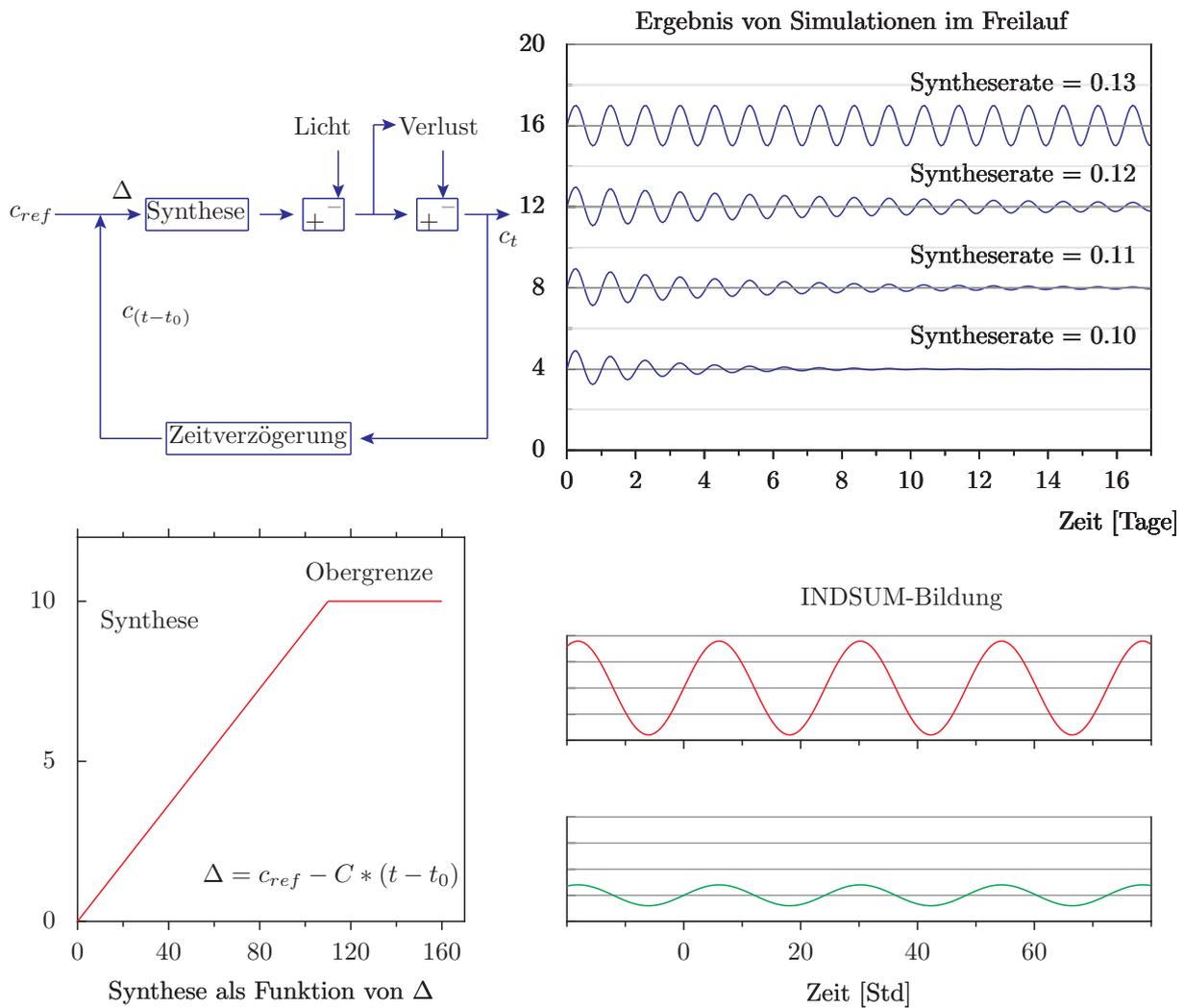


Abbildung 8.5: Modell des photoperiodischen Zählers von Lewis und Saunders. Oben links: Kontrollsystem eines Rückkopplungsozillators. Synthese der oszillierenden Substanz c_t wird durch die Differenz zwischen Referenzwert c_{ref} und dem Zeit-verzögerten Wert von c_t ($c(t - t_0)$) bestimmt. Licht erhöht die Konzentration von c_t , während ständig ein Teil der Substanz verloren geht. Oben rechts: Je nach Syntheserate SR ergeben Simulationen die blauen Kurven. Niedrigere Raten ergeben stärkere Dämpfung. Horizontale Linien sind Schwellenwerte, und c_t Werte über diesen Schwellenwerten werden über die Zeit summiert (INDSUM Bildung, unten rechts). Dynamik der Syntheserate im unteren linken Diagramm als Funktion der ($c(t - t_0)$) Werte. Syntheserate ist durch eine obere Grenze beschränkt, um zu vermeiden, dass die Amplitude der Schwingungen zu groß wird (unten links). Nach Lewis and Saunders (1987), Saunders and Lewis (1987a), Saunders and Lewis (1987b)

8 Jahreskalender der Fliegen

Rassen zu erklären. Diapause dominiert über nicht-Diapause (Lumme and Lako-vaara (1983)).

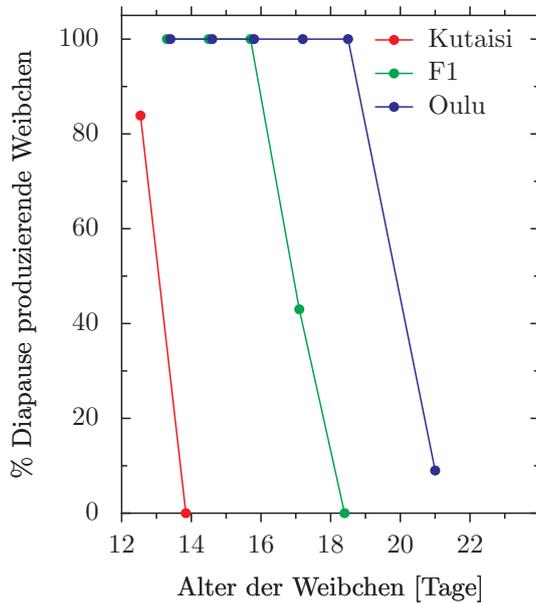


Abbildung 8.6: Zwei Rassen von *Drosophila littoralis*, eine von *Kutaisi*, die andere von *Oulu*, wurden miteinander gekreuzt und die kritische Tageslänge für die photoperiodische Induktion der Diapause der Nachkommen (F1, grüne Kurve) mit der der Eltern (*Oulu* blau, *Kutaisi* rot) verglichen. Sie liegt zwischen denen der Eltern. Nach Lankinen and Lumme (1984)

9 Weitere Bücher

Ich habe einige weitere Bücher geschrieben oder bin noch dabei, sie zu schreiben. Sie befassen sich ebenfalls mit Themen, die mit rhythmischen Vorgängen bei Lebewesen zu tun haben - mein Spezialgebiet als Wissenschaftler (*Engelmann (2007)*, *Engelmann (2004a)*, *Engelmann (2009a)*, *Engelmann (2009c)*, *Engelmann (2009b)*, *Engelmann (2008b)*, *Engelmann (2008a)*, *Engelmann (2004d)*, *Engelmann (2004b)*, *Engelmann (2004c)*).

9 Weitere Bücher

Literaturverzeichnis

- Allemand, R., Cohet, Y., and David, J. (1973). Increase in the longevity of adult *Drosophila melanogaster* kept in permanent darkness. *Experimental Gerontology*, 8:279–283. [65](#)
- Aschoff, J., Saint Paul, U. v., and Wever, R. (1971). Die Lebensdauer von Fliegen unter dem Einfluss von Zeitverschiebungen. *Naturwissenschaften*, 58:574. [63](#), [64](#)
- Basden, E. B. (1954). Diapause in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Proc. Royal Entomological Society of London*, 29:114–118. [67](#)
- Bateson, W. (1902). *Principles of heredity*. University Press, Cambridge. [11](#)
- Baylies, M., Bargiello, T., Jackson, F., and Young, M. (1987). Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature*, 326(6111):390–392. [52](#)
- Beaver, L. M., Gvakharia, B. O., Vollintine, T. S., Hege, D. M., Stanewsky, R., and Giebultowicz, J. M. (2002). Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness of *Drosophila melano-gaster*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 99:2134–2139. [65](#), [66](#)
- Benzer, S. (1967). Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58:1112–1119. [13](#)
- Beppu, K., Yoshida, T., and Kimura, M. T. (1996). Seasonal life cycles and adaptations of four species of *Drosophila* at high altitudes in Central Japan. *Japanese Journal of Entomology*, 64:627–635. [67](#)
- Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chelot, E., Hardin, P., Preat, T., and Rouyer, F. (2001). Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of activity and eclosion rhythms by targeted genetic ablation and PERIOD overexpression. *Eur. J. Neurosci.*, 13:871–888. [31](#)
- Blaschke, I., Lang, P., Hofbauer, A., Engelmann, W., and Helfrich-Förster, C. (1996). Preliminary action spectra suggest that the clock cells of *Drosophila* are synchronized to the external LD-cycle by the compound eyes plus extraretinal photoreceptors. In Elsner, N. and Schnitzler, H.-U., editors, *Brain and Evolution*, Proceedings of the 24th Göttingen Neurobiology Conference, page 30. Thieme Stuttgart New York. [36](#)
- Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 54:590–607. [36](#), [68](#)
- Bünning, E. (1983). *The physiological clock*, volume 1 of *Heidelberg Science Library*. Springer New York, 2 edition. [70](#)
- Burla, H. (1951). Systematik, Verbreitung und Ökologie der *Drosophila*-Arten der Schweiz. *Rev. Suisse Zool.*, 58:23–157. [67](#)

- Campbell, S. and Tobler, I. (1984). Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev*, 8(3):269–300. **37**
- Carson, H. L. and Stalker, H. D. (1948). Reproductive diapause in *Drosophila robusta*. *PNAS*, 34:124–129. **67**
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J., and Liu, D. (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284:760–765. **54**
- Ceriani, M. F., Darlington, T. K., Staknis, D., Mas, P., Petti, A. A., Weitz, C. J., and Kay, S. A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, 285:553–568. **36, 54**
- Chen, Y., Hunter-Ensor, M., Schotland, P., and Seghal, A. (1998). Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms. *J. Biol. Rhythms*, 13:364–379. **51**
- Christopher, D. and Hoffer, P. (1998). DET1 represses a chloroplast blue light-responsive promoter in a developmental and tissue-specific manner in *Arabidopsis thaliana*. *Plant-J.*, 14:1–11. **44**
- Cirelli, C. (2006). Sleep disruption, oxidative stress, and aging: New insights from fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38):13901. **37**
- Correns, C. (1900). G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Ber. Deutschen Bot. Ges.*, 18:158–168. **11**
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M.-C., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V., and Blau, J. (2003). vrille, Pdp1 and dclock form a second feedbackloop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 112:329–341. **49, 50**
- Darlington, T. K., Wagner-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D. L., Weitz, C. J., Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science*, 280:1599–1603. **51**
- Dembinska, M. E., Stanewsky, R., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1997). Circadian cycling of a PERIOD-beta-galactosidase fusion protein in *Drosophila*: evidence for cyclical degradation. *J. Biol. Rhythms*, 12:157–172. **51**
- Dushay, M. S., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1989). The disconnected visual system mutations in *Drosophila* drastically disrupt circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms*, 4:1–27. **35**
- Ederly, I. (2000). Circadian rhythms in a nutshell. *Physiological Genomics*, 3:59–74. **49**
- Ederly, I., Zwiebel, L. J., Dembinska, M. E., and Rosbash, M. (1994). Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:2260–2264. **51**
- Egan, E. S., Franklin, T. M., Hilderbrand-Chae, M. J., McNeil, G. P., Roberts, M. A., Schroeder, A. J., Zhang, X., and Jackson, F. R. (1999). An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci.*, 19:3665–3673. **55**
- Emery, I. F., Noveral, J. M., Jamison, C., and Siwicki, K. K. (1997). Rhythms of

- Drosophila* period gene expression in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 94:4092–4096. 31, 44
- Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95:669–679. 54
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J. C., and Rosbash, M. (2000). *Drosophila* CRY is a deep brain photoreceptor. *Neuron*, 26:493–504. 36, 37
- Engelmann, W. (1999). Rhythmen bei Organismen. <http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>. <http://www.bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>. 60
- Engelmann, W. (2003). *Biokalendar*. <http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>. 67
- Engelmann, W. (2004a). Rhythmen in organismen - beobachten, experimentieren, messen und auswerten. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3790>. 75
- Engelmann, W. (2004b). Rhythmen in strukturen von organismen. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3793>. 75
- Engelmann, W. (2004c). Wie man eine biologische uhr stoppen kann: Singularitätspunkt. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3xxx>. 75
- Engelmann, W. (2004d). Wie pflanzen wachsen und sich bewegen. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3777>. 75
- Engelmann, W. (2007). Rhythmen des Lebens - eine einföhrung anhand ausgewählter themen und beispiele. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3799>. 75
- Engelmann, W. (2008a). Blumenuhren, zeitgedächtnis und zeitvergessen. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3800>. 75
- Engelmann, W. (2008b). Unsere inneren uhren - biologische zeitmessung bei menschen und anderen säugetern. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3773>. 75
- Engelmann, W. (2009a). Biokalendar - das jahr im leben der pflanzen und tiere. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3768>. 75
- Engelmann, W. (2009b). Fliegende Uhren - die uhren der tauf-liege. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3795>. 75
- Engelmann, W. (2009c). Uhren, die nach dem mond gehen. einfluss des mondes auf die erde und ihre lebewesen. <http://tobias-lib.ub.uni-tuebingen.de/volltexte/2009/3766>. 75
- Engelmann, W. and Mack, J. (1978). Different oscillators control the circadian rhythm of eclosion and activity in *Drosophila*. *J. comp. Physiol.*, 127:229–237. 42

- Ewer, J. and Truman, J. W. (1996). Increases in cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP) occur at ecdysis in an evolutionarily conserved crustacean cardioactive peptide-immunoreactive insect neuronal network. *J. Comp. Neurol.*, 370:330–341. 28
- Fleissner, G. and Fleissner, G. (2001). Perception of natural Zeitgeber signals. In Kumar, V., editor, *Biological rhythms*. Narosa Publ. House, New Delhi. 36
- Foltényi, K., Andretic, R., Newport, J. W., and Greenspan, R. (2007). Neurohormonal and neuromodulatory control of sleep in *Drosophila*? In Stillman, B., Stewart, D., and Grodzicker, T., editors, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Clocks and Rhythms*, volume 72. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 37, 38, 49
- Gade, G., Hoffmann, K., and Spring, J. (1997). Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*, 77:963–1032. 28
- Gammie, S. C. and Truman, J. W. (1997). Neuropeptide hierarchies and the activation of sequential motor behaviors in the hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Neurosciences*, 17:4389–4397. 29
- Geibel, N. (1987). Alles beginnt mit einer einzigen Zelle. *Südwestpresse* 28.10.1987. 12
- Giebultowicz, J. M. (2000). Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Ann. Rev. Entomol.*, 45:67–791. 49
- Giebultowicz, J. M., Ivanchenko, M., and Vollintine, T. (2001). Organization of the insect circadian system: spatial and developmental of clock genes in peripheral tissues of *Drosophila melanogaster*. In Denlinger, D.L., G., editor, *Insect Timing: Circadian Rhythmicity and Seasonality*. Elsevier, Amsterdam. 44
- Glossop, N. R. J., Houl, J. H., Zheng, H., Ng, F. S., and Dudek, S. M. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*, 37:249–261. 49, 50
- Green, R. and Tobin, E. (1999). Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:4176–4179. 28
- Greenspan, R. (1995). Understanding the genetic construction of behavior. *Sci Am*, 272(4):72–8. 13
- Hall, J. (1982). Genetics and molecular biology of insect rhythms. In *Insect clocks*. Pergamon Press, Oxford, 2 edition. 49
- Hall, J. C. (1998). Molecular neurogenetics of biological rhythms. *J. Neurogenetics*, 12:115–181. 36
- Hao, H., Allen, D. L., and Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 17:3687–3693. 51
- Hege, D. M., Stanewsky, R., Hall, J. C., and Giebultowicz, J. M. (1997). Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: evidence for a brain-independent circadian clock. *J. Biol. Rhythms*, 12:300–308. 44

- Helfrich, C. (1986). Role of optic lobes in the regulation of locomotor activity rhythm in *Drosophila melanogaster*: Behavioral analysis of neural mutants. *J. Neurogenet.*, 3:321–343. [35](#), [42](#)
- Helfrich, C. and Engelmann, W. (1983). Circadian rhythms of the locomotor activity rhythm in *Drosophila melanogaster* and its mutants 'sine oculis' and 'small optic lobes'. *Physiol. Entomol.*, 8:257–272. [35](#)
- Helfrich-Förster, C. (1996). *Drosophila* rhythms: From brain to behavior. *Semin. Cell. Develop. Biol.*, 7:791–802. [36](#)
- Helfrich-Förster, C. (1997). Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.*, 380:335–354. [29](#)
- Helfrich-Förster, C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: A brain-behavioral study of disconnected mutants. *J. Comp. Physiol.*, A182:435–453. [41](#)
- Helfrich-Förster, C. (2001). The neuroarchitecture of the circadian clock in the *Drosophila* brain. *submitted*. [39](#), [42](#)
- Helfrich-Förster, C. (2002). The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology*, 105:297–312. [21](#), [51](#)
- Helfrich-Förster, C. (2003a). The neuroarchitecture of the circadian clock in the *Drosophila* brain. *Micr. Res. Tech.*, 62:94–102. [29](#), [30](#)
- Helfrich-Förster, C. (2003b). The neuroarchitecture of the circadian clock in the *Drosophila* brain. *Micr. Res. Tech.*, 62:94–102. [39](#)
- Helfrich-Förster, C., Edwards, T., Yasuyama, K., Schneuwly, S., Meinertzhagen, I., and Hofbauer, A. (2002). The extraretinal eyelet of *Drosophila*: development, ultrastructure and putative circadian function. *J. Neuroscience*, 22:9255–9266. [55](#)
- Helfrich-Förster, C. and Engelmann, W. (2002). Photoreceptors for the circadian clock of the fruitfly. In Kumar, V., editor, *Biological Rhythms*, pages 94–106. Narosa Publ. House, Pvt.Ltd., New Delhi, New Delhi. [25](#), [26](#), [41](#)
- Helfrich-Förster, C., Stengl, M., and Homburg, U. (1998). Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol. Internat.*, 15:567–594. [39](#)
- Helfrich-Förster, C., Täuber, M., Park, J. H., Mühlig-Versen, M., Schneuwly, S., and Hofbauer, A. (2000). Ectopic expression of the neuropeptide pigment dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurosciences*, 20:3339–3353. [38](#), [40](#), [43](#)
- Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C., and Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, page under review. [35](#), [37](#), [44](#)
- Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K., Kirk, D., Yin, J. C.-P., Sehgal, A., and Pack, A. I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, 25:129–138. [33](#), [37](#)
- Hofbauer, A. and Buchner, E. (1989). Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwiss.*, 76:335–336. [36](#)

- Hunter-Ensor, M., Ousley, A., and Sehgal, A. (1996). Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell*, 84:677–685. [54](#)
- Kambysellis, M. P. and Heed, W. B. (1971). Studies of oogenesis in natural populations of Drosophilidae. I. Relation of ovarian development and ecological habitats of the Hawaiian species. *Am. Naturalist*, 105:31–49. [71](#)
- Kaneko, M. (1998). Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8:652–658. [36](#), [39](#)
- Kaneko, M., Helfrich-Förster, C., and Hall, J. C. (1997). Spatial and temporal expression of the period and the timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: Newly identified pacemaker candidates and novel features of clock-gene product cyclings. *J. Neurosci.*, 17:6745–6760. [54](#), [55](#)
- Klarsfeld, A. and Rouyer, F. (1998). Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, 13:417–478. [64](#), [65](#)
- Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., and Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I. *Cell*, 94:97–107. [51](#)
- Konopka, R. J. and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sciences, USA*, 68:2112–2116. [14](#), [42](#)
- Konopka, R. J., Hamblen-Coyle, M. J., Jamison, C. F., and Hall, J. C. (1994). An ultrashort clock mutation at the period locus of *Drosophila melanogaster* that reveals some new features of the fly's circadian system. *J. Biol. Rhythms*, 9:189–216. [65](#)
- Konopka, R. J., Pittendrigh, C., and Orr, D. (1989). Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J. Neurogenet.*, 6:1–10. [33](#)
- Krishnan, B., Dryer, S. E., and Hardin, P. E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 400:375–378. [44](#)
- Lankinen, P. and Lumme, J. (1984). Genetic analysis of geographical variation in photoperiodic diapause and pupal eclosion rhythm in *Drosophila littoralis*. In *Photoperiodic regulation of insect and molluscan hormones*, volume 104 of *Ciba Foundation Symposium*, pages 97–114. Pitman, London. [68](#), [69](#), [72](#), [74](#)
- Lee, C., Parikh, V., Itsukachi, T., Bae, K., and Edery, I. (1996). Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Neuron*, 21:857–867. [54](#)
- Leloup, J.-C. and Goldbeter, A. (1997). Temperature compensation of circadian rhythms: Control of the period in a model for circadian oscillations of the PER protein in *Drosophila*. *Chronobiol. Intern.*, 14:511–520. [55](#)
- Lewis, A. D. and Saunders, D. S. (1987). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. I. Description of the model based on a feedback control system. *J. theoret. Biology*, 128:47–59. [72](#), [73](#)

- Lumme, J. and Lakovaara, S. (1983). Seasonality and diapause in *Drosophilids*. In Ashburner, M., Carson, H. L., and Thompson, J. N., editors, *Genetics and biology of Drosophila*. Academic Press, London, volume 3D, pages 171–220. Academic Press, London. [74](#)
- Mack, J. and Engelmann, W. (1982). Circadian control of the locomotor activity in eye mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Interdisc. Cycle Res.*, pages 313–323. [42](#)
- Mackey, S. R. (2007). Biological rhythms workshop ia: Molecular basis of rhythms generation. In *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology: Clocks and Rhythms*, volume 72. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [50](#), [53](#)
- Maier, R. (1973). Phase-shifting of the circadian rhythm of eclosion in *Drosophila pseudoobscura* with temperature pulses. *J. interdisc. Cycle Res.* 4, 125-135. [17](#)
- McNabb, S., Baker, J., Agapite, J., Steller, H., Riddiford, L., and Truman, J. (1997). Disruption of behavioral sequence by targeted death of peptidergic neurons in *Drosophila*. *Neuron*, 19:813–823. [31](#)
- Mendel, G. J. (1866). Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn*. als Abdruck in *J. of Heredity* 42, 1 (1951). [11](#)
- Miescher, F. (1871). Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen*, 4:441–460. [11](#)
- Morgan, T. H. (1928). *The theory of the gene*. H. Milford, Oxford University Press, London, revised edition. [11](#)
- Myers, E. M., Yu, J., and Sehgal, A. (2003). Circadian control of eclosion: Interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.*, 13:526–533. [30](#), [32](#)
- Newby, L. M. and Jackson, F. R. (1991). *Drosophila* ebony mutants have altered circadian activity rhythms but normal eclosion rhythms. *J. Neurogenetics*, 7:85–101. [42](#)
- Ohata, K., Nishiyama, H., and Tsukahara, Y. (1998). Action spectrum of the circadian clock photoreceptor in *Drosophila melanogaster*. In Touitou, Y., editor, *Biological clocks: Mechanisms and applications*, pages 167–171. Elsevier, Amsterdam. [36](#)
- Park, J. H., Schroeder, A. J., Helfrich-Förster, C., Jackson, F. R., and Ewer, J. (2003). Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. *Development*, in press. [31](#)
- Pittendrigh, C. (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann. Rev. Physiology*, 55:17–54. [15](#)
- Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergency time in *Drosophila*. *PNAS*, 40:1018–1029. [23](#)
- Pittendrigh, C. S. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *American Naturalist*, 98:261–294. [68](#), [71](#)
- Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian organization and the photoperiodic phenomena. In Follet and Follet, editors, *Biol.*

- clocks in seasonal reproductive cycles*, pages 1–35. Wright and sons, Ltd. Bristol. [21](#)
- Pittendrigh, C. S. and Minis, D. H. (1972). Circadian systems: Longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proc.Nat.Acad.Science (USA)*, 69:1537–1539. [63](#)
- Pittendrigh, C. S. and Takamura, T. (1987). Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night length in insect photoperiodism. *PNAS US*, 84:7169–7173. [67](#)
- Plautz, J. D., Kaneko, M., Hall, J. C., and Kay, S. A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 278:1632–1635. [44](#), [45](#)
- Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abo-deely, M., Kloss, B., and Young, M. W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, 94:83–95. [51](#)
- Price, J. L., Dembinska, M. E., Young, M. W., and Rosbash, M. (1995). Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation timeless. *EMBO J.*, 14:4044–4049. [54](#)
- Qiu, J. and Hardin, P. (1996). per mRNA cycling is locked to lights-off under photoperiodic conditions that support circadian feedback loop function. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4182–4188. [54](#)
- Renn, S. C. P., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., and Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99:791–802. [56](#)
- Riddiford, L. (1983). Hormones and *Drosophila* development. In Bate, M. and Arias, A., editors, *The Development of Drosophila melanogaster*, pages 899–939. Cold Spring Harbor Laboratory. [28](#)
- Rieger, D. (2002). Einfluss verschiedener Photorezeptoren auf das Aktivitätsmuster von *Drosophila melanogaster* im Kurz- und Langtag. Diplomarbeit, Universität Tübingen. [37](#), [42](#)
- Roenneberg, T. and Foster, R. G. (1997). Twilight times: light and the circadian system. *Photochemistry & Photobiology*, 66:549–61. [36](#)
- Ruoff, P. and Rensing, L. (1996). The temperature-compensated Goodwin model simulates many circadian clock properties. *Journal of Theoretical Biology*, 179:275–285. [55](#)
- Ruoff, P., Rensing, L., Kommedal, R., and Mohsenzadeh, S. (1997). Modeling temperature compensation in chemical and biological oscillators. *Chronobiology International*, 14:499–510. [55](#)
- Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, 93:805–814. [51](#)
- Saez, L., Meyer, P., and Young, M. W. (2007). A per/tim/dbt interval timer for drosophila’s circadian clock. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Clocks and Rhythms*, volume 72. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [52](#), [53](#)
- Saunders, D. and Lewis, R. (1987a). A damped circadian oscillator model of an

- insect photoperiodic clock II. Simulations of the shapes of the photoperiodic response curves. *J. theoretical Biology*, 128:61–71. [73](#)
- Saunders, D. S. (2002). *Insect clocks*. Elsevier, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 3 edition. [46](#)
- Saunders, D. S., Henrich, V. C., and Gilbert, L. I. (1989). Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *PNAS*, 86:3748–3752. [42](#), [71](#)
- Saunders, D. S. and Lewis, R. D. (1987b). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock III. Circadian and ‘hourglass’ responses. *J. theoretical Biology*, 128:61–71. [73](#)
- Sehgal, A., Price, J., and Young, M. W. (1992). Ontogeny of a biological clock in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Science (US)*, 89:1423–1427. [35](#)
- Selby, C. P. and Sancar, A. (1999). A third member of the photolyase/blue-light photoreceptor family in *Drosophila*: A putative circadian photoreceptor. *Photochem. Photobiol.*, 69:105–107. [54](#)
- Shaw, P. (2003). Awakening to the behavioral analysis of sleep in *Drosophila*. *J. Biol. Rhythms*, 18:4–11. [33](#), [37](#)
- Shaw, P., Cirelli, C., Greenspan, R., and Tononi, G. (2000). Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5459):1834. [37](#)
- Stanewsky, R. (2002). Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell and Tissue Res.*, 309:11–26. [49](#)
- Stanewsky, R., Frisch, B., Brandes, C., Hamblen-Coyle, M. J., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1997). Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene period and a lacZ reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. *J. Neurosci.*, 17:676–696. [51](#)
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Baretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95:681–692. [54](#), [55](#)
- Suri, V., Qian, Z., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 21:225–234. [54](#)
- Toda, M. J. (1979). A preliminary note on winter *Drosophilid* flies in southern Japan, with special reference to reproductive conditions. *Low Temp. Science*, B37:39–45. [67](#)
- Truman, J. (1992). The eclosion hormone system of insects. *Progr Brain Research*, 92:361–374. [28](#)
- Tschermak, E. (1900). Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Ber. Deutschen Bot. Ges.*, 18:232–239. [11](#)
- Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Förster, C., Hall, J., and Stanewsky, R. (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Current Biology*, 13:1758–1767. [39](#)
- Vries, H. d. (1900). Das Spaltungsgesetz der Bastarde. *Ber. Deutschen Bot. Ges.*, 18:83–90. [11](#)

- Watson, J. (1969). *Die Doppelhelix*. Hamburg. 11
- Weber, H. (1954). *Grundriss der Insektenkunde*. Fischer, Stuttgart, 3 edition. 28
- Wheeler, D. A., Hamblen-Coyle, M. J., Dushay, M. S., and Hall, J. C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind or both. *J. Biol. Rhythms*, 8:67–94. 35
- Williams, J. A. and Sehgal, A. (2001). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Ann. Rev. Physiol.*, 63:729–755. 49
- Winfree, A. T. (1986). *The timing of biological clocks*. Scientific American Books, Inc., New York. 15
- Yang, Z., Emerson, M., Su, H. S., and Sehgal, A. (1998). Response of the timeless protein to light correlates with behavioral entrainment and suggests a nonvisual pathway for circadian photoreception. *Neuron*, 21:215–223. 54
- Yasuyama, K. and Meinertzhagen, I. (1999). Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in *Drosophila melanogaster*. *J. comp. Neurol.*, 412:193–202. 36
- Young, M. W. (1998). The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:135–152. 54
- Young, M. W. and Kay, S. A. (2001). Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev. Genet.*, 2:702–715. 49
- Zerr, D. M., Hall, J. C., Rosbash, M., and Siwicki, K. K. (1990). Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 10:2749–62. 51
- Zhang, X., McNeil, G. P., Hilderbrand-Chae, M. J., Franklin, T. M., Schroeder, A. J., and Jackson, F. R. (2000). Circadian regulation of the Lark RNA-binding protein within identifiable neurosecretory cells. *J Neurobiol*, 45:14–29. 31
- Zimmerman, W. F., Pittendrigh, C. S., and Pavlidis, T. (1968). Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *J. Insect Physiol.*, 14:669–684. 27
- Zitnan, D., Sehnal, F., and Bryant, P. (1993). Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 156:117–135. 28, 29, 31

Index

- 20-Hydroxy-Ecdyson, 28
- Abdomen, 29
- Absorptionsspektrum, 22
- Aktionsspektrum, 22, 35
- Aktogramm, 42, 60
- akzessorische Medulla, 39
- Antenne, 42
- Arrhythmie, 54, 64
- Augenmutanten, 45
- Ausgänge der Uhr, 56
- Bünning, 68
- Bünning-Hypothese, 68
- bürgerliche Dämmerung, 36
- Benzer, 13
- Bildanalyseverfahren, 60
- cAMP Respons-Element Bindeprotein (CREB), 52
- Carotin, 35
- chemosensorischen Zellen, 42
- Chitin, 23
- Chronobiologie, 13
- circadiane Uhr, 20
- circadiane Uhren
verschiedene, 71
- CLK, 49
- Crustaceen-cardioaktives Peptid, 28
- Cryptochrom, 36, 54
- CYC, 49
- Dauerlicht, 52
- DBT, 49, 52
- Diapause, 42, 67
- Dimerisierung, 51
- disco-Mutante, 41
- dorsal, 39
- Drosophila alpina*, 67
- Drosophila aurelia*, 67
- Drosophila deflexa*, 67
- Drosophila grisea*, 71
- Drosophila littoralis*, 67
- Drosophila melanogaster*, 42
- Drosophila nitens*, 67
- Drosophila phalerata*, 67
- Drosophila pseudoobscura*, 15
- Drosophila robusta*, 67
- Drosophila subobscura*, 67
- Drosophila transversa*, 67
- E-box, 51
- ebony, 42
- Ecdysis, 28
- Ecdysis-auslösendes Hormon, 28
- Eclosion-Hormon, 28
- Enzym, 45
- Epithel, 27
- Experiment, 17
- externes Koinzidenzmodell, 68
- Flavin, 22
- Freilauf, 35
- Gen, 11
- Genetik, 11
der Diapause, 72
- geographische Breite, 68
- geographische Rasse, 72
- Gewebe, 39
- Gewebekultur, 45
- glass-Mutante, 36
- Gonaden, 68
- grün-fluoreszierendes-Protein, 45

Index

- Helix-loop-Helix-PAS Transkriptionsfaktor, 49
- hemimetaboles Insekt, 27
- Heterodimere, 51
- Histogramm, 60
- Hofbauer-Buchner Äuglein, 36
- holometaboles Insekt, 27
- Hormon, 28
- Hypothese, 17
- Imaginalanlage, 27
- Imaginalscheibe, 27
- Infrarot-Lichtschranke, 33, 57, 60
- innere Uhr, 20
- Jahreskalender, 67
- Jahreszeit, 36
- Kommissur, 39
- Komplexauge, 35
- Konopka, 14
- Kopfblase, 28
- Kunsttag, 63
- Kurztag, 36
- Kutikula, 15, 27
- Langtag, 36
- lark, 42
- Larve, 15
- Larvenhäutung, 27
- Larvenstadium, 13, 23
- Lateral-Neuronen, 39
- Lateralhorn, 41
- Lebensspanne, 64
- Leuchtrhythmus, 45
- Licht-Dunkel-Wechsel, 33
- Licht-induzierbare Phase, 68
- Lichtpulse, 52
- Lichtrezeptor, 22, 35
- Lochplatte, 57
- lokale Uhr, 39
- lokomotorische Aktivität, 33, 35
- Luciferase, 45
- Malphigischen Röhren, 45
- Mendel, 11
- Metamorphose, 27, 29
- Miescher, 11
- Modell von Goodwin, 55
- Monomer, 55
- Morgan, 11
- Morgenszillator, 42
- mRNA, 51
- Multioszillatorsystem, 42
- Musca domestica*, 64
- Mutante, 13, 20, 45
- negative Rückkopplung, 51
- neuroendokrine Zelle, 28
- Neuropeptid Pigment dispersing factor PDF, 56
- neurosekretorische Zelle, 39, 72
- Oligomer, 55
- Organ, 39
- Ösophagus, 39
- Ozellen, 36
- Pars intercerebralis, 29, 72
- Pars lateralis, 29
- PER, 49, 51, 54
- PER-TIM Dimer, 51
- Periodenlänge, 33
- peripheres Gewebe, 42
- Phasenverschiebung, 54
- Phormia terrae novae*, 64
- Phosphorylierung, 51, 52
- Photoperiode, 68
- Photoperiodismus, 68
- photophil, 68
- Photorezeptor, 35
- Photozelle, 57
- Pigment, 22
- Pittendrigh, 15
- Population, 57
- post-transkriptionale Regulation, 51
- Promotor, 45, 51
- Proteasomen, 52
- prothoracitropes Hormone, 28
- Prothorakaldrüse, 45

- Protocerebrum, 39
Puparium, 27
Puppe, 15
- Rückkopplungsschleife, 49
Reporter-Gen, 45
Rhythmen
 Bedeutung, 63
- Schüttelapparatur, 57
Schlüpfen, 16
Schlüpfrhythmus, 57
Sehpigment, 35
Sicherheitslicht, 18
skotophil, 68
spektrale Zusammensetzung, 36
Spektralphotometer-Küvette, 60
Synchronisation, 36, 52
 molekulare Grundlagen, 52
synchronisieren, 33
- Tageslänge, 68
Tageslängenmessung, 36
Teflon-Trichter, 57
Temperatur, 55
Temperaturkompensation, 23, 33, 55
Thorax, 29
TIM, 49, 51, 52
Tracheen, 27
Transkription, 51
transkriptionaler Aktivator, 51
- Ubiquitin, 52
Uhr-Gen, 49
Uhr-Getriebe, 49
Uhr-Zelle, 36
Unterschlundganglion, 29
UV, 45
- ventral, 39
Videokamera, 60
- Wellenlänge, 22
Wildtyp, 35
Winter, 72
- Zeitfenster, 16
Zeitgeber, 21
Zeitnehmer, 22
Zeitverschiebung, 64
Zeitverzögerung, 51
Zentralgehirn, 29
Zentraluhr, 39
Zwielicht, 36