

Der Einfluss der Neurotransmitter Dopamin, Serotonin und GABA
sowie ihrer Transporter
auf das Schlafverhalten von *Drosophila melanogaster*

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Gmeiner

geboren in Wetzlar

Würzburg 2014

Eingereicht am: 25. März 2014

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Benavente

Gutachter : Prof. Dr. Ch. Förster

Gutachter: Prof. Dr. St. Schneuwly

Tag des Promotionskolloquiums: 18. Juni 2014

Doktorurkunde ausgehändigt am:

"Ever tried, ever failed, no matter.

Try again, fail again, fail better."

Samuel Beckett

Inhalt

I. Einleitung	8
1. Schlaf im Tierreich	8
2. Charakteristika von Schlaf	8
3. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modelorganismus	9
4. Schlaf bei <i>Drosophila melanogaster</i>	10
5. Die Uhrneurone in <i>Drosophila melanogaster</i>	12
6. Schlafregulation durch Neurotransmitter bei <i>Drosophila melanogaster</i>	13
6.1. Dopamin und Schlaf	13
6.2. Serotonin und Schlaf	15
6.3. GABA und Schlaf	16
7. Der WHITE Transporter	17
8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
II Material und Methoden	19
9. Histologische Methoden	19
9.1. Antikörperfärbung an Ganzgehirnpräparaten (<i>wholemounds</i>) adulter Fliegen	19
9.2. Konfokale Mikroskopie	20
9.3. Quantifizierung von Färbeintensitäten mit Image J / Fiji	20
9.4. Bildbearbeitung	21
10. Molekularbiologische Methoden	22
10.1. Extraktion genomischer DNS	22
10.2. Polymerase Kettenreaktion	22
10.3. DNS Gelelektrophorese	23
10.4. Detektion	23
11. Biolumineszenzmessung von ganzen Köpfen	24
12. Screen der Lopac ¹²⁸⁰ Bibliothek	24

13.	Biolumineszenzmessung von Gehirnen.....	24
14.	UPLC Messung von Amininen.....	25
15.	Genetische Methoden.....	26
15.1.	Fliegenaufzucht	26
15.2.	Fliegenstämme	26
15.3.	Meiotische Rekombination	28
15.4.	Ko-Expression von <i>RNAi</i> -Linien mit <i>UAS-dicer2</i>	28
16.	Verhaltensmessung	29
16.1.	Lokomotoraufzeichnung.....	29
16.2.	Datenanalyse	29
17.	Mikrobiologische Methoden	31
17.1.	Dechorionierung von Embryos zur Entfernung von Mikrosporidien	31
17.2.	Mikrosporidientest	31
III Ergebnisse		32
18.	Amintransporter und Schlaf	32
18.1.	Das Schlafverhalten der Dopamintransportermutante <i>Dat^{fmn}</i>	32
18.2.	Neuronal dopamindefiziente Fliegen	34
18.3.	Manipulation der Expressionsstärke der Dopaminrezeptoren in den PDF Neuronen.....	36
18.4.	Hinunterregulierung verschiedener Dopaminrezeptoren in allen Uhrgeweben	39
18.5.	Hinunterregulierung verschiedener Dopaminrezeptoren in sechs bis acht DN1 Neuronen ...	40
18.6.	Serotonintransportermutante <i>Sert^{16d}</i>	41
19.	GABA und Schlaf.....	43
19.1.	Hinunterregulierung der GABA _B Rezeptoren in den PDF Neuronen erhöht die Aktivität.....	43
19.2.	Hinunterregulierung der GABA _B Rezeptoren in den PDF Neuronen beeinflusst die Aufrechterhaltung des Schlafes.....	44
19.3.	GABA _B Rezeptoren sind auf den PDF Neuronen lokalisiert.....	46
19.4.	GABA _B R2-RNAi reduziert die Expression der GABA _B -Rezeptoren in den I-LNV um 46%	48
20.	Die Rolle des ABC Transporters WHITE in Bezug auf Schlaf	49

20.1. Untersuchung einer spontanen <i>white</i> Mutation.....	49
20.2. Das Schlafverhalten von <i>brown</i> und <i>scarlet</i> Mutanten.....	50
21. Der Einfluss des <i>white</i> Gens und auf das Schlafverhalten der Amintransportermutanten	52
21.1. Das Schlafverhalten von <i>Dat^{fmn}</i> in Abhängigkeit von <i>white</i>	52
21.2. Das Schlafverhalten von <i>Sert^{d16}</i> in Abhängigkeit von <i>white</i>	53
21.3. Rekombination von <i>Dat^{fmn}</i> und <i>Sert^{16d}</i>	54
21.4. UPLC Messung von Dopamin, Serotonin, β -Alanyldopamin und -serotonin in Köpfen.....	55
22. Der Einfluss von <i>ebony</i> auf das Schlafverhalten.....	58
23. Die Bedeutung der Gliazellen bei der Schlafregulation.....	60
24. Ektopische Variation der <i>white</i> Expression in dopaminergen Neuronen	62
25. Expression der <i>UAS-white-RNAi</i> mit <i>GMR-Gal4</i>	63
26. Circadiane Phänotypen der verschiedenen Kombinationen von Transportermutanten.....	64
27. Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen in Lang- und Kurztagebedingungen	68
28. Nutzung eines Period-Luziferase Reportersystems.....	69
28.1. Lithium verschiebt die Phase des Period-Cyclings.....	69
28.2. Test der LOPAC ¹²⁸⁰ -Bibliothek	70
29. Schlaf in Wildtypstämmen	73
29.1. Schlafvarianz in Wildtypstämmen.....	73
29.2. Videoanalyse der Schlafposition	75
IV Diskussion	76
30. Amintransporter und Schlaf	76
31. Dopaminrezeptoren und Schlaf.....	78
32. GABA _B -Rezeptoren und Schlaf.....	80
33. Der WHITE-Transporter und Schlaf	83
34. Die Interaktion von WHITE und den Amintransportern DAT und SERT in Bezug auf Schlaf	84
35. Die Rolle von <i>ebony</i> bei der Schlafregulation.....	86
36. Die ektopische Expression von <i>white</i> bzw. Hinunterregulierung mittels RNAi.....	87

37. Circadiane Phänotypen der Transportermutanten.....	89
38. Etablierung eines Komponententests mittels des <i>period</i> -Luziferase-Reportersystems	90
39. Schlaf bei verschiedenen Wildtypstämmen	91
Zusammenfassung	93
Summary (in english).....	95
Anhang	97
Literaturverzeichnis.....	97
Abbildungsverzeichnis.....	109
Tabellenverzeichnis.....	111
Abkürzungsverzeichnis.....	112
LOPAC ¹²⁸⁰ Bibliothek	114
Danksagung.....	118
Erklärung	119

I. Einleitung

1. Schlaf im Tierreich

Schlaf ist ein natürlicherweise täglich wiederkehrendes Verhaltensphänomen. Während des Schlafs können Tiere weder Nahrung suchen, sich reproduzieren noch andere überlebenswichtige Aufgaben erfüllen und sind zusätzlich besonders gefährdet, von Räubern entdeckt zu werden. Dennoch konnte man Schlaf in allen bisher dahingehend untersuchten Säugern (Campbell & Tobler, 1984), Fischen, (wie z.B. beim Zebrafisch *Danio Reiro* (Zhdanova *et al.*, 2001)), Insekten, (wie z.B. bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000)) und der Honigbiene *Apis mellifera* (Sauer *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2008) und sogar dem Spulwurm *Caenorhabditis elegans* (Raizen *et al.*, 2008) nachweisen. Bei uns Menschen nimmt der Schlaf durchschnittlich 8 Stunden des Tages ein. Damit sind wir allerdings noch lange nicht Spitzenreiter unter den Säugern. Der in Nordamerika weitverbreitete Goldmantel-Ziesel *Spermophilus lateralis* kommt auf durchschnittlich 15.9 Stunden Schlaf am Tag (Allada & Siegel, 2008).

Obwohl die Omnipräsenz von Schlaf im Tierreich und die Menge der damit verbachten Zeit ein deutliches Indiz für seine Bedeutsamkeit darstellen, ist Schlaf ein äußerst wenig verstandenes Phänomen unseres täglichen Lebens.

2. Charakteristika von Schlaf

Schlaf stellt die inaktive Phase des täglich wiederkehrenden Schlaf-Wach-Zyklus dar. Diese Inaktivität wird begleitet von einer erhöhten Reizschwelle bezüglich externer Stimuli, woraus eine verringerte Erregbarkeit resultiert. Schlaf wird häufig in einer artspezifischen Körperposition ausgeführt. Auf Schlafentzug folgt eine Erholungsphase mit erhöhtem Schlaf. Dies ist ein Indiz für eine homöostatische Komponente in der Regulation von Schlaf. Diese wird ergänzt von einer circadianen Komponente, welche durch die im Tagesrhythmus konsolidierten Ruhephasen erkennbar ist (Borbely, 1982). In Menschen und anderen Säugern korreliert die Schlafphase mit Änderungen im Elektroenzephalogramm (EEG) und kann in REM (rapid eye movement) und Non-REM Phasen

unterschieden werden (Moruzzi & Magoun, 1949; Dumermuth *et al.*, 1983; Campbell & Tobler, 1984; Aeschbach & Borbely, 1993).

3. *Drosophila melanogaster* als Modelorganismus

Drosophila melanogaster ist ein in vielen Forschungsbereichen erfolgreich genutzter Modelorganismus. Dies ist teils eine Folge pragmatischer Gründe, (einfache Zucht, schnelle Generationsdauer, einfach genetische Manipulierbarkeit und im Vergleich zu Säugern, deutlich niedrigerer genetischer Redundanz), teils kommt auf Grund der historischen Entwicklung, *Drosophila melanogaster* ist der erste Organismus in dem Mutationen durch Radioaktivität induziert wurden, eine weiter fortgeschrittene Methodenbreite hinzu. Besonders relevant ist hierbei das UAS-GAL4-System mit dem die gewebespezifische ektopische Expression von DNA-Sequenzen, sowohl endogene als auch exogene, ermöglicht wurde (Brand & Perrimon, 1993).

Auch die Chronobiologie, die sich mit Inneren Uhren und den von ihnen gesteuerten circadianen Rhythmen beschäftigt, wurde durch die Entdeckung der *period*-Mutanten (*per^L*, *per^S*, *per^O*) in *Drosophila melanogaster*, von den bis dahin vor allem deskriptiven und physiologischen Forschungsansätzen in das Zeitalter der funktionalen genetischen Analyse befördert (Konopka & Benzer,



Abbildung 1 *Drosophila melanogaster* Männchen

Foto: Florian Gmeiner

1971). Die Erkenntnis, dass die Innere Uhr von Tieren hoch konserviert ist und dass die Ergebnisse aus *Drosophila melanogaster* auf Säuger, bis hin zum Menschen, übertragbar sind, führte zu einer Vorreiterrolle der Taufliege in der Erforschung circadianer Rhythmen. Trotz des bereits vorhandenen Wissens, dass Schlafregulation eine circadiane Komponente enthält, dauerte es seit der Entdeckung der *period* Mutanten weitere 29 Jahre, bis im Jahr 2000 *Drosophila melanogaster* auch als Modelorganismus der Schlafforschung etabliert wurde (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000).

4. Schlaf bei *Drosophila melanogaster*

In den ersten beiden Studien zu Schlaf in *Drosophila melanogaster* wurden die Charakteristika des Schlafes, welche bereits in Säugern definiert wurden, nachgewiesen. So zeigt auch *Drosophila melanogaster* eine Reaktion auf Schlafentzug durch anschließend gesteigerten Schlaf, eine artspezifische Schlafposition, eine Erhöhung der Reizschwelle während des Schlafes und sowohl eine circadiane als auch eine homöostatische Komponente in der Regulation. Zudem führen Substanzen wie Coffein und Cyclohexyladenosin zu Effekten, welche vergleichbar sind zu den in Säugern erhobenen Daten. Erste Versuche die Regulation aufzuklären, durch Verringerung der Genexpression der N-Acetyltransferase, die in den Monoaminkatabolismus involviert ist, führten zu einer gesteigerten Reaktion auf Schlafentzug (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Auch die neuronale Aktivität wird bei *Drosophila melanogaster* während des Schlafes reduziert, obgleich diese Messungen nur eine Annäherung an ein EEG darstellen (Nitz *et al.*, 2002).

Noch ist nicht vollständig geklärt, welche Neuronen bzw. Areale im Gehirn von *Drosophila melanogaster* das Schlafzentrum bilden. Jedoch häufen sich Informationen bezüglich der Beteiligung spezifischer Neuronengruppen, die eine Funktion in der Schlafsteuerung zu haben scheinen. Dazu gehören die Pars Intercerebralis (Foltenyi *et al.*, 2007; Crocker *et al.*, 2010), der Pilzkörper (Joiner *et al.*, 2006; Pitman *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006) und nicht zuletzt die I-LN_v Neurone, eine im Folgenden noch ausführlicher angesprochene Untergruppe der PDF Neurone, die in zahlreichen Publikationen mit der Regulation von Schlaf in Verbindung gebracht wurden (Parisky *et al.*, 2008; Sheeba *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009; Lebestky *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2011). Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Schlafzentren in *Drosophila melanogaster*. Die I-LN_v gehören zu den circadianen Uhrneuronen. Dies zeigt, dass in *Drosophila melanogaster* eine enge Vernetzung der Schlafregulation und der Inneren Uhr aufzufinden ist und dass die Mechanismen, die Schlaf steuern, sehr früh in der Evolution etabliert worden sind. Die I-LN_v sind die auffälligste Gruppe der Uhrneuronen. Ihre Verzweigungen erstrecken sich über den optischen Lobus, verbinden die beiden Hemisphären und sind im Zentrum der Inneren Uhr von Insekten, der Akzessorischen Medulla, stark verzweigt (Helfrich-Förster *et al.*, 2007a). Auf Grund der anatomischen Vernetzung sind die I-LN_v Neurone gut geeignet um neuronale Aktivität zu modulieren. Zudem überlappen die Verzweigungen der I-LN_v Neurone mit denen monoaminerger Nervenzellen (Hamasaka & Nassel, 2006). Wie in Kapitel 5 noch erläutert wird, belegen erste Studien, dass es auch eine funktionale Vernetzung dieser überlappenden Nervennetze gibt, und dass die I-LN_v Neurone sowohl dopaminerge, als auch octopaminerge und GABAerge Signale empfangen und diese Schlaf und Aktivität regulieren (Agosto

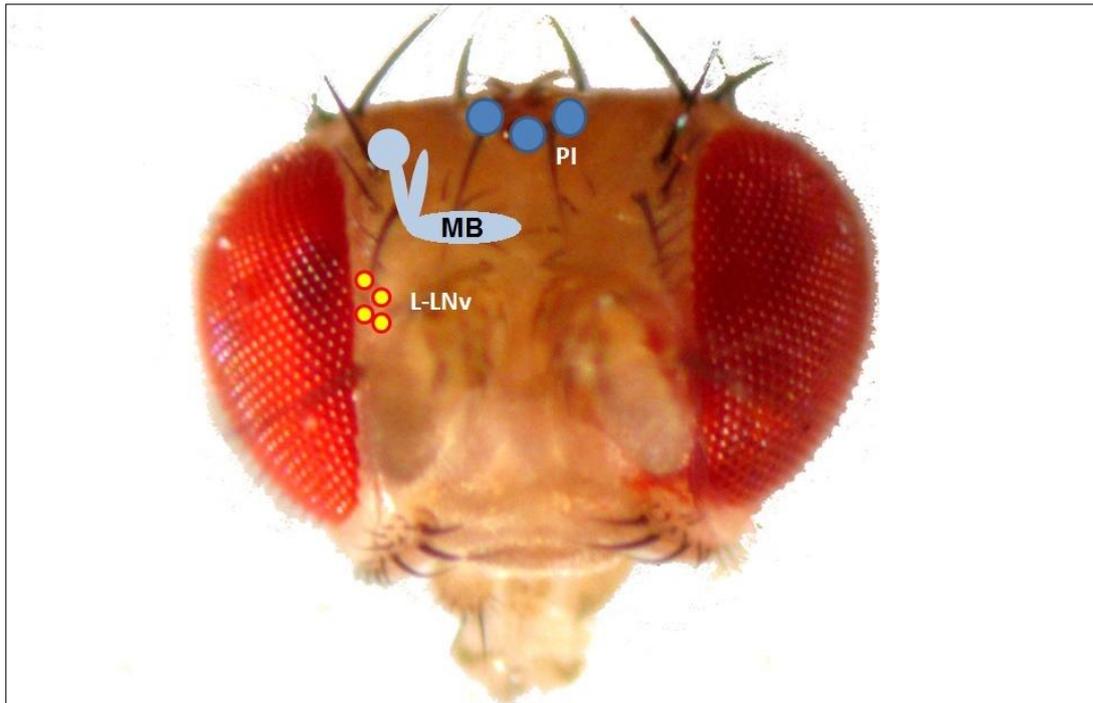


Abbildung 2 Schematische Übersicht der neuronalen Schlafzentren in *Drosophila melanogaster*

Zu den Neuronengruppen, denen eine Funktion als Schlafzentrum zugeschrieben wird gehören die Pars Intercerebralis (PI), die Pilzkörper (MB) und die großen laterale-ventralen Neuronen (L-LNv). Foto und Schema: Florian Gmeiner

et al., 2008; Parisky *et al.*, 2008; Kula-Eversole *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2011). Zudem ist bekannt, dass die L-LNv selbst lichtsensitiv sind und das Erwachen und die Aktivität als Reaktion auf Licht steuern, insbesondere morgens (Shang *et al.*, 2008; Fogle *et al.*, 2011).

5. Die Uhrneurone in *Drosophila melanogaster*

Die Innere Uhr von *Drosophila melanogaster* besteht aus 150 Neuronen pro Gehirnhemisphäre. Diese werden auf Grund ihrer Lage in eine dorsale (DN) und eine laterale Neuronengruppe (LN) unterteilt. Die lateralen Neurone werden weiterhin unterteilt in die Gruppen der I-LN_v, s-LN_v, LPN und LN_d. Die dorsalen Neurone werden in die Gruppen der DN1, DN2 und DN3 unterteilt (Abbildung 3). Die I-LN_v und s-LN_v, mit Ausnahme der fünften s-LN_v, enthalten den Pigment Dispersing Faktor (PDF), ein Signalpeptid, das für die Synchronisierung der Uhrneurone relevant ist (Kaneko, 1998; Helfrich-Förster, 2005). Eine Nullmutation für dieses Peptid *pdf01*, sowie eine selektive Ablation der PDF Neurone resultierten in arhythmischem Aktivitätsverhalten der Fliegen in konstanter Dunkelheit und zeigen die zentrale Rolle von PDF als circadianem Transmitter auf (Renn *et al.*, 1999).

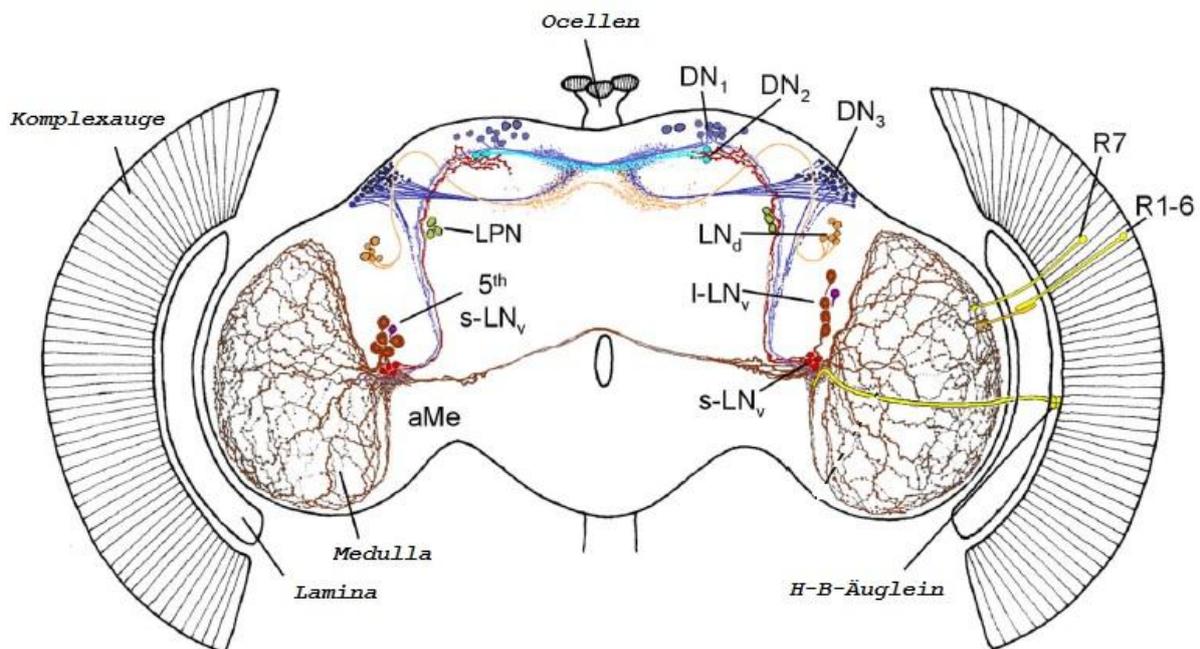


Abbildung 3 Die Uhrneuronen von *Drosophila melanogaster* aus (Helfrich-Förster *et al.*, 2007a)

Die Uhrneurone werden nach ihrer Lage in dorsale Gruppen (DN1, DN2, DN3) sowie laterale Gruppen (LPN, LN_d, I-LN_v, s-LN_v) eingeteilt. Die Abbildung zeigt zudem die relevanten Strukturen der Lichtrezeption, die Photorezeptorzellen des Komplexauges (R1-8), die Ocellen, sowie das Hofbauer-Buchner-Äuglein (H-B-Äuglein)

Alle Uhrneurone exprimieren die Proteine der Inneren Uhr. Das Kernprotein ist das bereits angesprochene PERIOD. *Period*-Nullmutanten zeigen keinen Rhythmus in konstanter Dunkelheit (Konopka & Benzer, 1971). PERIOD bildet mit TIMELESS, ein weiteres Kernprotein der Inneren Uhr, ein funktionales Dimer, das in einer negativen Rückkopplungsschleife seine eigene Expression unterdrückt (Sehgal *et al.*, 1994; Peschel & Helfrich-Förster, 2011). Abgesehen von den Uhrneuronen weisen sowohl eine Vielzahl von Gliazellen (Helfrich-Förster, 1995) als auch weitere nicht neuronale Gewebe eine Expression von Uhrproteinen auf (Plautz *et al.*, 1997). Allerdings ist die Rettung der Expression von PERIOD und TIMELESS in den Uhrneuronen ausreichend um ein rhythmisches Aktivitätsverhalten messen zu können (Grima *et al.*, 2004; Rieger *et al.*, 2006). Wie bereits im vorangegangenen Kapitel 4 (Schlaf bei *Drosophila melanogaster*) besprochen, kontrollieren Teile der Inneren Uhr auch die Rhythmik des Schlafverhaltens.

6. Schlafregulation durch Neurotransmitter bei *Drosophila melanogaster*

6.1. Dopamin und Schlaf

Dopamin ist ein Monoamin, welches aus der Aminosäure Tyrosin gebildet wird und ist unter anderem der derzeit am besten untersuchte Modulator von Aktivität und Schlaf in *Drosophila melanogaster*. Der limitierende Schritt in seiner Biosynthese ist die Hydroxylierung am C3-Atom zu L-DOPA durch die Tyrosinhydroxylase (TH) welche durch das Gen *pale (ple)* codiert wird (Budnik & White, 1987). L-DOPA wird durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Dopamin decarboxyliert (Fragoulis & Sekeris, 1975; Livingstone & Tempel, 1983).

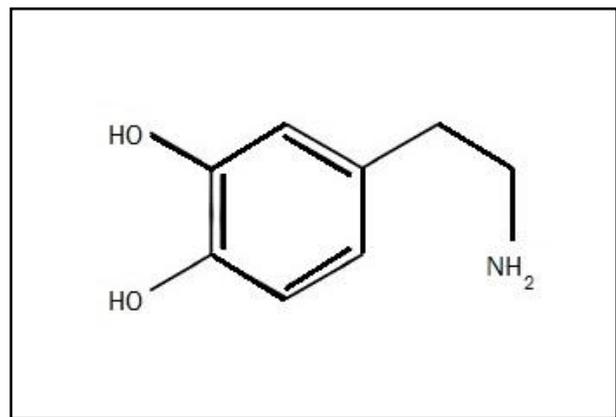


Abbildung 4 Strukturformel Dopamin

In *Drosophila melanogaster* gibt es 600 dopaminerge Neurone, welche auf Grund der Lage ihrer Zellkörper in verschiedene Cluster - je nach Veröffentlichung zwischen 6 und 15 - eingeteilt werden (Nassel & Elekes, 1992; Monastirioti, 1999; Friggi-Grelin *et al.*, 2003; Mao & Davis, 2009). Das Dopaminsignal steigert die Aktivität. Fliegen mit einer funktionalen Deletion der ersten drei Exone des Dopamintransportergens weisen sowohl eine gesteigerte Aktivität als auch eine höhere

Aktivierbarkeit auf. Der Dopamintransporter bewerkstelligt die Wiederaufnahme des Dopamins aus dem synaptischen Spalt. Die funktionale Deletion des Dopamintransporters (*Dat*) wurde auf Grund des Schlafphänotyps nach dem japanischen Wort *fumin* (zu deutsch: schlaflos) als *Dat^{fumin}* benannt (Kume *et al.*, 2005). Pharmakologische Untersuchungen mit Methamphetamin (METH), das die Aktivität des Dopamintransporters herabsetzt, sowie 3-Idodo-Tyrosine (3IT), ein Hemmstoff der Dopaminsynthese, bestätigen die bedeutende Rolle von Dopamin bei der Regulation des Schlaf-/Wachverhaltens (Andretic *et al.*, 2005). Ausgeschüttetes Dopamin kann an vier Rezeptortypen binden und somit als Signal verarbeitet werden. Die Benennung hat sich im Laufe der Jahre mehrfach geändert. In dieser Arbeit werden die zum Zeitpunkt der Einreichung (Februar 2014) auf flybase.org aufgeführten Bezeichnungen für die Rezeptoren verwendet. Es gibt zwei aktivierende Rezeptoren DopR (Gotzes *et al.*, 1994) und DopR2 (Han *et al.*, 1996). Beide sind ein Ortholog der Gruppe der D1 Rezeptoren von Säugern. Desweiteren gibt es den inhibierenden Dopaminrezeptor D2R, ein Ortholog der Gruppe der D2 Rezeptoren von Säugern (Hearn *et al.*, 2002). Zudem wurde mit dem *Drosophila melanogaster* Dopamin/Ecdysteroid Rezeptor (DmDopEcR) ein Homolog der Beta-Adrenergen Rezeptoren von Wirbeltieren identifiziert. Dieser Rezeptor wurde bisher nicht mit Schlaf in Zusammenhang gebracht (Srivastava *et al.*, 2005). Der Rezeptor DopR reguliert primär Stress induzierte Aktivität, während er in Bezug auf Schlaf eine untergeordnete Rolle bei der Aktivierbarkeit hat. Anatomisch wurde in der selben Arbeit einer bestimmten Gruppe von Uhrneuronen, den I-LNV Neuronen, die vermutlich teil des Schlafzentrums von *Drosophila melanogaster* sind (siehe Kapitel 4), die Regulation des Schlafes zugeordnet (Lebestky *et al.*, 2009). Für den inhibitorischen D2R Rezeptor wurde eine Rolle bei der Regulation von Schlaf postuliert, jedoch nicht direkt gezeigt (Shang *et al.*, 2011). Dies beruhte vor allem auf seiner Expression und Signaltransduktion auf den I-LNV Neuronen bei der Dopaminapplikation. Die I-LNV Neurone sind eine Untergruppe der PDF-Neurone, welche die Zentralen Schrittmacherzellen der Inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* bilden (Ewer *et al.*, 1992; Frisch *et al.*, 1994; Renn *et al.*, 1999) und mit Ihren Verzweigungen sowohl die Kommunikation zu den dorsalen Uhrneuronen als auch die Verbindung der beiden Gehirnhemisphären ermöglichen (Helfrich-Förster *et al.*, 2007a). Abgesehen von der Wirkung von Dopamin auf die I-LNV-Neurone, konnten neuere Arbeiten zudem einen Steigerung der Aktivität und Verlängerung der Wachphase durch eine Subpopulation dopaminerger Neurone zeigen, die auf die neuronale Struktur des Fächerförmigen Körpers projizieren (Liu *et al.*, 2012; Ueno *et al.*, 2012).

6.2. Serotonin und Schlaf

Serotonin ist wie Dopamin, ein Monoamin. Serotonin wird aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Bei der Biosynthese wird Tryptophan durch die Tryptophan-5-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Im nächsten Schritt wird dieses, ebenso wie L-DOPA, durch die DOPA-Decarboxylase decarboxyliert. Das Endprodukt ist Serotonin (5-HT).

In *Drosophila melanogaster* gibt es 106 serotonerge Neurone. Die anatomische Charakterisierung ist im Gegensatz zum dopaminergen System noch nicht durch Einzelzellanalyse im Detail vervollständigt, insbesondere das Verzweigungssystem ist derzeit noch unvollständig analysiert (Valles & White, 1988; Alekseyenko *et al.*, 2010). Derzeit sind 4 Serotoninrezeptoren, 5-HT_{1a}, 5-HT_{1b}, 5-HT₂ und 5-HT₇, beschrieben. Der Rezeptor 5-HT_{1b} konnte auf den

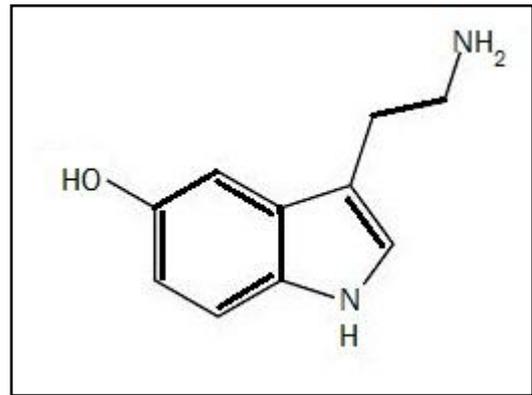


Abbildung 5 Strukturformel Serotonin

PDF-Neuronen nachgewiesen werden. Dazu wurden zum einen eine 5HT-1BGal4-Linie etabliert und deren Expressionsmuster mittels eines Antikörpers verifiziert. Es wurde gezeigt, dass das Entrainment der Inneren Uhr durch Signalweiterleitung durch den 5-HT_{1b} Rezeptor beeinflusst werden kann, insbesondere die Synchronisation der Inneren Uhr durch Licht. Eine Überexpression des 5-HT_{1b} Rezeptors führt zu einer verringerten Phosphorylierung des Uhrproteins TIMELESS. Dies erfolgt nicht direkt sondern durch SHAGGY, dem *Drosophila* Homolog von GSK-3 β . In Lichtpulsexperimenten wurde gezeigt, dass die Überexpression des 5-HT_{1b} Rezeptors zu einer gesteigerten Menge an TIM nach dem Lichtpuls führt. Im Gegenzug dazu steigert die Signalweiterleitung durch den Rezeptor 5-HT_{1a} den Schlaf, ohne circadiane Phänotypen zu erzeugen. Beide Rezeptoren werden in den I-LN_v Neuronen der PDF-Zellen exprimiert (Yuan *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006). Auch für Serotonin gibt es einen spezifischen Wiederaufnahmetransporter, SERT. Im Labor von Prof. Dr. Henrike Scholz wurde eine funktionale Deletion dieses Transporters etabliert (unveröffentlicht, Diplomarbeit (Kaiser, 2009)), die mir im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurde.

6.3. GABA und Schlaf

GABAerge Neurone, die den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) ausschütten, fördern den Schlaf. GABA verkürzt die Einschlafphase und verlängert den Gesamtschlaf. Der Aspekt der schlaffördernden Wirkung von GABA konnte auf eine Signalweiterleitung durch den GABA_A Rezeptor Rdl in den I-LNv Neuronen zurückgeführt werden, insbesondere auf den Aspekt der verkürzten Einschlafzeit nach *Licht Aus* (Agosto *et al.*, 2008). Jedoch vermitteln GABA_A Rezeptoren schnelle inhibitorische Signale (Lee *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine GABA Applikation die Feuerungsrate von Aktionspotenzialen in den I-LNv Neuronen herabsetzt, wohingegen die Zugabe von Picrotoxin, einem GABA_A Rezeptor Antagonisten, die Rate erhöhte (McCarthy *et al.*, 2011).

Auf die Aufrechterhaltung des Schlafs hat die Manipulation des Rdl Rezeptors jedoch keinen Einfluss. Bei einer Signalreduktion aller GABAergen Neurone kommt es zu einem Effekt in Bezug zur Aufrechterhaltung der Schlafphase (Parisky *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass weitere GABA Rezeptoren an der Schlafregulation beteiligt sein müssen. Geeignete Kandidaten sind die langsamen, metabotropen GABA_B Rezeptoren, welche oft mit den GABA_A Rezeptoren kolokalisiert sind (Enell *et al.*, 2007). In *Drosophila melanogaster* bestehen metabotrope GABA_B Rezeptoren aus den Untereinheiten GABAB-R1, die den Liganden bindet und GABAB-R2, die für die Translokation in der Zellmembran und die Kopplung zu den G-Proteinen verantwortlich ist (Kaupmann *et al.*, 1998; Galvez *et al.*, 2001; Mezler *et al.*, 2001).

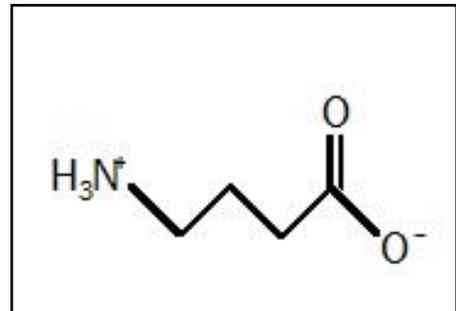


Abbildung 6 Strukturformel GABA

7. Der WHITE Transporter

Die Mutante *white*, welche zu weißen anstelle der wildtypisch roten Augen führt, ist die erste charakterisierte Mutation von *Drosophila melanogaster*. Sie wurde von Thomas Hunt Morgan 1910 beschrieben und legte die Grundlage für die Erkenntnis das Chromosomen, genauer die Gene Träger der Erbinformation sind (Morgan, 1910). Das Protein WHITE ist Transporter homolog der humanen ABCG Gruppe. Zu dieser gehören als bekannteste Vertreter in *Drosophila melanogaster* neben WHITE (Bingham *et al.*, 1981) auch BROWN (Dreesen *et al.*, 1988; Tearle *et al.*, 1989) und SCARLET (Tearle *et al.*, 1989). WHITE bildet sowohl mit BROWN als auch SCARLET funktionale Heterodimere, deren Funktion bei dem Transport der Augenpigmente namensgebend für die jeweiligen Mutanten war. Von Säugern ist bekannt, dass ABC Transporter für eine Vielzahl von Transportprozessen zuständig sind, und auch in *Drosophila* steigt das Wissen um Funktionen der drei genannten Transporter abseits der Lokalisation der Augenpigmente (Mackenzie *et al.*, 2000). Interessant ist im Zusammenhang mit dieser Arbeit die kontrovers diskutierte Annahme, dass der White Transporter einen Einfluss auf die Dopaminmenge im Gehirn von *Drosophila melanogaster* hat (Borycz *et al.*, 2008). Der Transporter WHITE ist zudem in der Lage Tryptophan, die Aminosäure aus der Serotonin synthetisiert wird, zu transportieren (Sullivan & Sullivan, 1975; Sullivan *et al.*, 1980). Eine neuere Studie, welche einen Einfluss der funktionalen Mutation des Transporters WHITE auf die Dopaminmenge in Köpfen von adulten Tieren nachwies, zeigte einen ähnlichen Effekt auf die Menge von Serotonin in Köpfen adulter Fliegen, die ebenfalls durch die Mutation w^{1118} verringert wurde (Borycz *et al.*, 2008). Diese Studie gelangt zu der These, das Dopamin möglicherweise vergleichbar zu Histamin im optischen System durch WHITE transportiert wird. Allerdings konnten andere Arbeiten keine membrangebundene Lokalisation von SCARLET und WHITE (Mackenzie *et al.*, 2000), sowie die fehlende Detektierbarkeit von WHITE im Gehirn von *Drosophila melanogaster* feststellen. (Fjose *et al.*, 1984; Mackenzie *et al.*, 2000).

8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Schlaf-/Wachverhalten von *Drosophila melanogaster* in Abhängigkeit von den Neurotransmittern Dopamin, Serotonin und GABA untersucht werden.

Dazu wurden sowohl die funktional deletierten Transportermutanten für den Dopamin-, als auch den Serotonintransporter und auch neuronal dopamindefiziente Tiere genutzt.

Um den möglichen Input auf die Uhrneuronen, insbesondere die PDF-Neuronen weiter aufzuklären wurden spezifische RNAi Linien für die GABA-, Dopamin- und Serotoninrezeptoren genutzt.

Die Hypothese, dass der Transporter WHITE möglicherweise Amine transportiert, sollte überprüft werden, in dem der Einfluss der Mutation von *white* auf das Schlafverhalten überprüft wurde.

Des Weiteren sollten erste Versuche zu einer möglichen Beteiligung von Gliazellen durchgeführt werden.

Mit Hilfe eines Luziferasereporters und den neuronal dopamindefizienten Tieren sollte überprüft werden, inwieweit Dopamin- und Serotoninsignale einen direkten Effekt auf das Uhrprotein PERIOD haben.

Teile der im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelnden Daten bezüglich der Funktion der GABA_B-Rezeptoren in Bezug auf Schlaf wurden bereits veröffentlicht (Gmeiner *et al.*, 2013):

Gmeiner, F., Kolodziejczyk, A., Yoshii, T., Rieger, D., Nassel, D.R. & Helfrich-Förster, C. (2013) GABA_B receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, **216**, 3837-3843.

II Material und Methoden

9. Histologische Methoden

9.1. Antikörperfärbung an Ganzgehirnpräparaten (*wholemounds*) adulter Fliegen

Drei bis fünf Tage alte Fliegen wurden für 2,5 Stunden, in 4% Paraformaldehyd gelöst in Phosphatpuffer, fixiert. Anschließend wurde das Fixativ durch reinen Phosphatpuffer ausgetauscht und nach 15 Minuten noch zwei weitere Male mit Phosphatpuffer für je 15 Minuten gewaschen.

Die Präparation der Gehirne aus den Köpfen erfolgte ebenfalls in Phosphatpuffer mit Hilfe von Dumont Pinzetten Größe 5. Es wurde für 2 Stunden mit 5% Normal Goat Serum sowie 0,03% Triton X in Phosphatpuffer bei Raumtemperatur geblockt. Triton X permeabilisiert die Zellmembran. Deshalb wurde in allen Versuchen, bei denen Green Fluorescent Protein exprimiert wurde, 5% NGS in PB ohne Triton X verwendet, da ansonsten das GFP diffundieren und das Signal abschwächen würde. Anschließend wurde mit dem primären Antikörper gelöst in 5% NGS in PBT über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag, nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur, wurde sechs mal für zehn Minuten mit PBT gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, ebenfalls gelöst in 5% NGS in PBT, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde wieder sechs mal für 10 Minuten mit PBT gewaschen und anschließend einmal mit reinem Phosphatpuffer gespült. Danach wurden die Gehirne in die Rinne eines aus drei Deckgläsern geklebten Objektträgers (siehe Abbildung 7) gebracht und mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckelt. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: anti-PDF 1:2500, anti-GABAB-R2 1:10000, anti-GAD1 1:1000. Sekundäre Antikörper der ALEXA Flour Serie (Molecular Probes, Carlsbad, CA), 488nm (Ziege anti-Maus) bzw. 546nm (Ziege anti-Kaninchen), als auch Cy2 und Cy3 gekoppelte IgGs (Ziege anti-Maus oder anti-Kaninchen; Jackson Immuno Research) wurden in einer Verdünnung von 1:1000 genutzt. Das GABA_B-R2 Antiserum (Code B7873/3) wurde in der Literatur beschrieben (Hamasaka *et al.*, 2005). Das polyklonale GAD1 Antiserum gegen GAD1 aus Kaninchen wurde freundlicherweise von Rob Jackson, Tufts University, Medford, MA, USA zur Verfügung gestellt und ist bereits in zwei Arbeiten beschrieben (Jackson *et al.*,

1990; Featherstone & Broadie, 2000). Das monoklonale PDF Antiserum gegen das Drosophilapeptid NSELINSLLSLPKNMND₂-NH₂ wurde von Justin Blau zur Verfügung gestellt (ursprünglich aus DSHB [Developmental Studies Hybridoma Bank]).

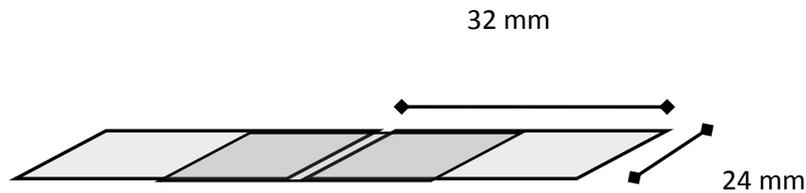


Abbildung 7 Schema der geklebten Objektträger

9.2. Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen der Gehirnpräparate wurden mit einem Leica SPE Konfokalmikroskop erstellt. Hierzu wurden z-Stacks je einer Gehirnhemisphäre pro Fliege mit einem ACS APO 20.0x0.60 IMM Objektiv mit Glycerin aufgenommen. Für Detailaufnahmen wurde das Objektiv APO 63.0x1.30 OIL und für Übersichtsaufnahmen das ACS APO 10.0x0.30 DRY verwendet. Der Abstand einer z-Ebene zur nächsten betrug jeweils 1,5µm. Die verwendeten Laser hatten eine Anregungswellenlänge von 488nm, 532nm sowie 635nm. Die Geschwindigkeit des Lasers betrug 400Hz. Weitere Einstellungen wie Offset und Gain sind von Experiment zu Experiment verschieden und den Originaldateien zu entnehmen. Bei anschließender Quantifizierung der Intensitäten wurden die Einstellungen für alle zu vergleichenden Präparate identisch vorgenommen.

9.3. Quantifizierung von Färbeintensitäten mit Image J / Fiji

Die .lif-Dateien der z-Stacks wurden mit Image J unter als "Split Channels" geöffnet. Für die Messung von Färbeintensitäten im Nukleus wurde das "Brush Tool" mit einer Pixelgröße von sieben verwendet. Bei cytosolischen Proteinen wurde mit Hilfe des "Freehand Selection Tools" der zu messende Bereich ausgewählt. In beiden Fällen wurde zudem eine Messung

des Hintergrunds in unmittelbarer Umgebung der Zelle vorgenommen und vom eigentlichen Messwert abgezogen.

9.4. Bildbearbeitung

Scalebars und Beschriftungen wurden mit Leica AF Lite eingefügt. Abgesehen von Änderungen des Kontrastes und der Intensität, sowie der Wahl des Bildausschnitts, wurden keinerlei Änderungen vorgenommen. Für die Gestaltung der Diagramme und Abbildungen wurden des Weiteren die Programme Windows Paint, Gimp 2, Qtiplot und Excel verwendet.

10. Molekularbiologische Methoden

10.1. Extraktion genomischer DNS

Um die erfolgreiche Rekombination aus der Dopamintransportermutante *Dat^{fmn}* und der Serotonintransportermutante *Sert^{16d}* überprüfen zu können wurde genomische DNA der Fliegen extrahiert. Hierzu wurde je eine Fliege in 50µl Squishing buffer und 200µg/ml Proteinase K in einem Eppendorfgefäß (1,5ml) mit einer Pipettenspitze zerdrückt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für zwei Minuten bei 95°C inkubiert, um die Proteinase K zu denaturieren. Nach Zentrifugation wurde der Überstand, der die genomische DNS enthält, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt (Gloor *et al.*, 1993).

10.2. Polymerase Kettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion wurde jeweils ein 25µl Ansatz gewählt, bestehend aus 1µl gDNS, 2 µl Primerpaar, 1µl DMSO und 21µl JumpStart™ REDTaq DNA Polymerase Ready Mix (Sigma) und im Mastercycler *Gradient* (Eppendorf) durchgeführt.

Standardprogramm für Dopamintransporter-PCR und Serotonintransporter-PCR:

Zyklus	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
2-41	95°C	30s
	60°C	15s
	72°C	2 min
42	72°C	2 min

(*) *Annealing Temperatur ist anhängig von den verwendeten Primern. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurden konnten alle Primer bei 60°C verwendet werden.*

Im Falle der Sequenzierung des *Whitegens* wurde jeweils ein 50µl Ansatz gewählt, bestehend aus 2µl gDNS (100ng/µl), 2,5 µl Primerpaar, 1,5µl DMSO, 32µl H₂O, 0,5µl Phusion-Polymerase (NEB), 10µl HF-Buffer (NEB), 1µl NTP-Mix und 0,5µl MgCl₂.

Tabelle 1 Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
Dat R	ATC CTT CAC CAA CTC GCT GC	Überprüfung der Dat ^{fmn} Deletion
Dat L	GTG GTC TAT CCA GCT GCC AT	Überprüfung der Dat ^{fmn} Deletion
Sert R	AAA AGT TCA GTT CGA CGC TAA	Überprüfung der Sert 16d Deletion
Sert L	TGT CCC TAT CTT TTC CGA CTT	Überprüfung der Sert 16d Deletion

10.3. DNS Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 1% peqGOLD Universal Agarose in 150ml TAE Puffer aufgekocht. Zur Detektion der DNS wurde 7µl Midori Green (Nippon Genetics) hinzugegeben und in der Gelkammer ausgehärtet. Der Gellauf zur Auftrennung der DNS erfolgte bei 100 V für 2 Stunden bzw. bei 10 V über Nacht. Als Größenstandard wurde GeneRuler™ DNA Ladder Mix 1kb (Fermentas) verwendet. Die Aufnahme der Banden erfolgte unter UV Licht mit Hilfe der E-Box VX₂ (Vilber Lourmat, Germany).

10.4. Detektion

Die Detektion erfolgte unter UV Licht mit Hilfe der E-Box VX₂ (Vilber Lourmat, Germany). Für die anschließende Bearbeitung der Aufnahmen wurde das zugehörige Programm E-Capt 15.06 für Windows verwendet.

11. Biolumineszenzmessung von ganzen Köpfen

Das PERIODcycling wurde mit Hilfe eines Luziferasereportersystems gemessen um den Einfluss diverser chemischer Komponenten auf den molekularen Rhythmus der Inneren Uhr zu testen und in Folge besonders aktive Komponenten auf deren Einfluss auf das Schlafverhalten zu testen. Hierzu wurden *XLG-luc* Fliegen verwendet, die eine Fusion des Luziferaseproteins an das PERIODprotein darstellen. Hiermit können Schwankungen im Expressionslevel des *Periodgens* gut anhand der Lumineszenz nachgewiesen werden. Die Köpfe der Fliegen wurden mit Hilfe von Pinzetten abgetrennt und in mit 100µl Medium befüllte 96 Mikrotiterplatten der Firma Nunc überführt. Das Medium bestand aus 88% Insect Xpress Medium der Firma BioWhittaker, 10% Fetal Bovin Serum, 1% Penicilin/ Streptomycin, 1mM Luciferin und 1% Insulin. Die Platten wurden mit einer Schutzfolie zugeklebt. Die emittierten Photonen wurden mit dem LUMIstar OMEGA einmal pro halbe Stunde für 1 Minute gemessen. Dabei wurde nach Einzug eine Wartezeit von 2 Minuten einprogrammiert. Bei mehreren Mikrotiterplatten wurde darauf geachtet, dass sie jeweils von einer transparenten Platte getrennt sind, so dass keine Platte vom Licht abgeschirmt wurde.

12. Screen der Lopac¹²⁸⁰ Bibliothek

Hierzu wurden ebenfalls Köpfe der *XLG-luc* Fliegen verwendet, nur dass dem Medium die jeweiligen Komponenten in einer Konzentration von 100µM zugeführt wurden. Da diese in DMSO gelöst sind, wurde den Kontrollen anstelle einer Komponente, die selbe Volumenmenge DMSO zugeführt.

13. Biolumineszenzmessung von Gehirnen

Die Biolumineszenzmessung in Gehirnen, vergleichbar zu der von ganzen Köpfen, wurde erfolglos versucht. Die präparierten Gehirne verstarben innerhalb weniger, Stunden bevor ein Cycling messbar war. Hierzu werden lediglich die Varianten der Behandlung und Medienzusammensetzung aufgelistet:

Folgende Medien wurden getestet:

Insect Xpress (BioWhittaker),
Schneider Insect Medium (Sigma-Aldrich),
Ringer -Lösung

in folgenden Mischverhältnissen:

99%, 1% Luciferin
98% Medium, 1% Insulin, 1% Luciferin
93% Medium, 5% Fetal Bovine Serum, 1% Insulin, 1% Luciferin
88% Medium, 10% Fetal Bovine Serum, 1% Insulin, 1% Luciferin

mit folgenden Handhabungen:

Fliegen vorher in Ethanol gewaschen / PBS gewaschen / in der Sterilbank gearbeitet

14. UPLC Messung von Aminen

Die Stämme der Fliegen wurden in Kreuzungen von 2 Männchen und 5 Weibchen angesetzt, um vergleichbare Aufzuchtbedingungen zu gewährleisten. Nach dem Schlüpfen wurden die Männchen in Gruppen von 20 Stück auf frische Gläser gesetzt und für fünf Tage bei 25°C gealtert. Am fünften Tag wurden sie zum Zeitpunkt ZT3 mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Köpfe wurden anschließend auf Trockeneis abgesammelt. Die Messung der Amine erfolgte am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, der Julius-Maximilians Universität Würzburg, durch Dr. Markus Krischke. Gemessen wurde der Gehalt an Serotonin, Dopamin, β -Alanylserotonin und β -Alanyldopamin um eine mögliche Korrelation zwischen Amingehalt und Schlafverhalten zu untersuchen.

15. Genetische Methoden

15.1. Fliegenaufzucht

Alle Fliegen wurden auf *Drosophilamedium* (0.8% Agar, 2.2% Rübensirup, 8.0% Malzextrakt, 1.8% Hefe, 1.0% Sojamehl, 8.0% Maismehl und 0.3% 4-Hydroxybenzoesäure) auf 25°C in einem 12:12 Licht-Dunkel-Zyklus bei einer Luftfeuchtigkeit von 60% aufgezogen. Während Zeiten, in denen mit bestimmten Stämmen keine Versuche bzw. Kreuzungen durchgeführt wurden, wurden diese bei 18°C bei ansonsten gleichen Bedingungen gehalten.

15.2. Fliegenstämme

Tabelle 2 Fliegenstämme

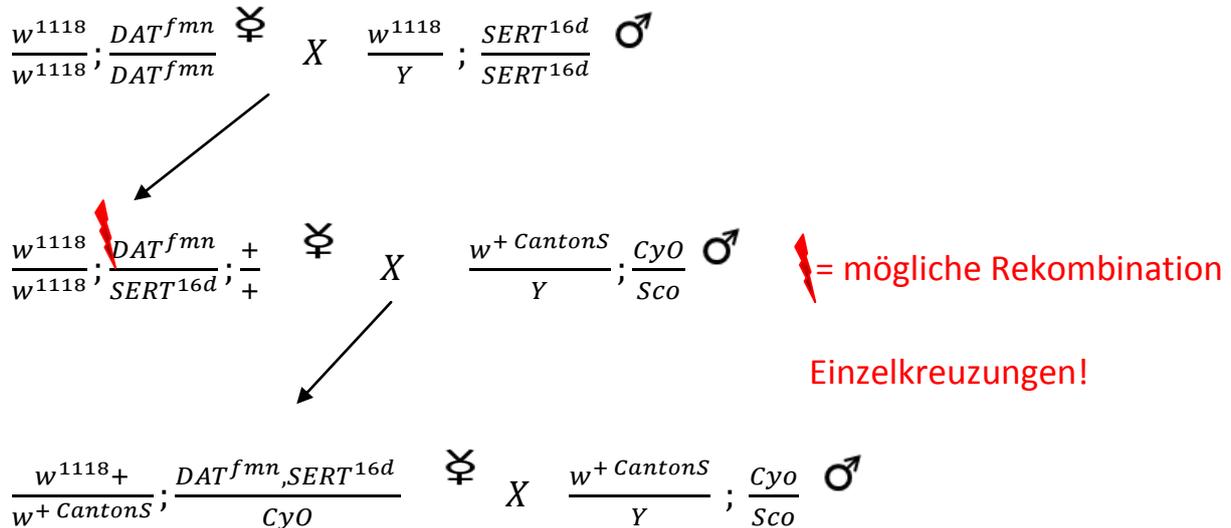
Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Literatur
<i>wt ALA</i>	Wildtypstamm	(Vanin <i>et al.</i> , 2012)
<i>CantonS</i>	Wildtypstamm	(Konopka <i>et al.</i> , 1989)
<i>Flotte Lotte</i>	Wildtypstamm	Charlotte Förster (Regensburg)
<i>HU 2-1</i>	Wildtypstamm	Houten Kyriacou CP
<i>w¹¹¹⁸</i>	Spontane Mutation im <i>white</i> -Gen	(Lindsley & Grell, 1968)
<i>+,bw¹</i>	Spontane Mutation im <i>brown</i> -Gen	(Lindsley & Grell, 1968)
<i>+,bw¹⁶</i>	EMS Mutation im <i>brown</i> -Gen	(Kondrashov <i>et al.</i> , 2006)
<i>+,bw¹⁹</i>	EMS Mutation im <i>brown</i> -Gen	(Kondrashov <i>et al.</i> , 2006)
<i>+bw¹;st¹</i>		Bloomington
<i>+,;st¹</i>	Mutation im <i>scarlet</i> -Gen	(Lindsley & Grell, 1968)
<i>w; e¹</i>	Mutation im <i>ebony</i> -Gen, weißäugig*	Rob Jackson
<i>+, e¹</i>	Mutation im <i>ebony</i> -Gen, rotäugig*	Rob Jackson
<i>w;Dat^{fmn}</i>	Deletion im <i>dDAT</i> -Gen, weißäugig	(Kume <i>et al.</i> , 2005)
<i>+,Dat^{fmn}</i>	Deletion im <i>dDAT</i> -Gen, rotäugig	vorliegende Arbeit
<i>w; Dat^{fmn};e¹</i>	Kombination der <i>white/DAT/ebony</i> Mutationen	vorliegende Arbeit
<i>+, Dat^{fmn};e¹</i>	Kombination <i>DAT/ebony</i> Mutationen, rotäugig	vorliegende Arbeit
<i>w;Sert^{4d}</i>	Kontrollstamm zu <i>dSert16</i> ; p-Element jump-out, weißäugig	Doktorarbeit Andrea Kaiser / Betreuung Henrike Scholz
<i>+,Sert^{4d}</i>	Kontrollstamm zu <i>dSert16</i> ; p-Element jump-out, rotäugig	vorliegende Arbeit
<i>w;Sert^{16d}</i>	Deletion von 3 Exons im <i>Sert</i> -Gen	Doktorarbeit Andrea Kaiser/ Betreuung Henrike Scholz
<i>+,Sert^{16d}</i>	Deletion von 3 Exons im <i>Sert</i> -Gen; rotäugig	vorliegende Arbeit

<i>w;dSert¹⁶;e¹</i>	Kombination der <i>Sert</i> -Deletion mit <i>white</i> und <i>ebony</i> Mutation	vorliegende Arbeit
<i>+/dSert¹⁶;e¹</i>	Kombination der <i>Sert</i> -Deletion mit <i>ebony</i> Mutation	vorliegende Arbeit
<i>w;Dat^{fmn},Sert^{16d}</i>	Meiotische Rekombinante der Dopamintransportermutante <i>Dat^{fmn}</i> mit der Serotonintransportermutante <i>Sert^{16d}</i>	vorliegende Arbeit
<i>+/Dat^{fmn},Sert^{16d}</i>	Meiotische Rekombinante der Dopamintransportermutante <i>Dat^{fmn}</i> mit der Serotonintransportermutante <i>Sert^{16d}</i>	vorliegende Arbeit
<i>w;roo²²</i>	Spontane <i>white</i> Mutation im <i>roo²²</i> Stamm	B. Possidente
<i>w⁺;roo²²</i>	Originaler <i>roo²²</i> Stamm	B. Possidente
<i>TH-Gal4</i>	Dopaminerge Treiberlinie	(Friggi-Grelin <i>et al.</i> , 2003)
<i>+/NP3233-Gal4</i>	Ensheating Glia Treiberlinie	(Awasaki <i>et al.</i> , 2008)
<i>w;NP3233-Gal4</i>		vorliegende Arbeit
<i>+/NP6520-Gal4</i>	Astrocyten Glia Treiberlinie	(Awasaki <i>et al.</i> , 2008)
<i>w;NP6520-Gal4</i>		vorliegende Arbeit
<i>+/repo-Gal4/TM3,Sb1</i>	Pan Glia Treiberlinie	Bloomington
<i>w;repo-Gal4</i>		vorliegende Arbeit
<i>pdf-Gal4</i>	PDF Neuronen Treiberlinie	(Park <i>et al.</i> , 2000)
<i>UAS-dicer2; pdf-Gal4</i>	PDF Neuronen Treiberlinie mit <i>dicer2</i>	vorliegende Arbeit
<i>UAS-dicer2;tim-Gal4(UAS)</i>	Treiberlinie für alle Uhrgewebe mit <i>dicer2</i>	O.Shafer
<i>UAS-dicer2;clk 4.1-Gal4</i>	Treiberlinie für 6-8 DN1 Zellen mit <i>dicer 2</i>	Zang 2010
<i>GBR2-Gal4</i>	GABA B2 Rezeptor Treiberlinie	(Root <i>et al.</i> , 2008)
<i>GMR-Gal4</i>		Stammsammlung
<i>UAS-white</i>		E. Ohmann Regensburg
<i>UAS-white-RNAi</i>	Vienna Drosophila RNAi Centre	VDRC 30033
<i>pUAS-DTHgFS+; ple</i>		(Hirsh <i>et al.</i> , 2010)
<i>pUAS-DTHgFS+/-; ple</i>		(Hirsh <i>et al.</i> , 2010)
<i>TH-Gal4,Ddc-Gal4; ple</i>		(Hirsh <i>et al.</i> , 2010)
<i>UAS-DopR-RNAi</i>	TRiP-Linie	Bloomington
<i>UAS-DopR2-RNAi</i>	TRiP-Linie	Bloomington
<i>UAS-D2R-RNAi</i>	TRiP-Linie	Blomington
<i>UAS-D2R-RNAi</i>	Vienna Drosophila RNAi Centre	VDRC
<i>y w;;XLG-luc</i>	Period-Luziferase Fusionsprotein	(Stanewsky <i>et al.</i> , 1997)
<i>UAS-GFP S65T</i>	Green Flourescent Protein mit Mutation S65T zur Steigerung der Leuchtintensität unter UAS Kontrolle	Stammsammlung Lehrstuhl
<i>+/+;UAS-10x myrGFP</i>	Zehn Kopien von myrestiliertem Green Flourescent Protein unter UAS Kontrolle auf dem III. Chromosom	Stammsammlung Lehrstuhl
<i>w¹¹¹⁸;Sco/Cyo;TM6B/TM3</i>	Balancer Stamm	Christa Kistenpfennig
<i>w+; Sco/Cyo;TM6B/TM3</i>	Balancer Stamm	Christa Kistenpfennig
<i>w¹¹¹⁸;Sco/Cyo</i>	Balancer Stamm	Christa Kistenpfennig
<i>w+; Sco/Cyo</i>	Balancer Stamm	Christa Kistenpfennig

*weißäugig/rotäugig entspricht einem defekten/intaktem *white* Gen. Da in dieser Arbeit die auch Rolle des *white*-Gens in Bezug auf Schlaf untersucht wurde, wurden viele Stämme einmal mit dem intaktem *white* Gen (X-Chromosom *CantonS*) und einmal mit der *w¹¹¹⁸* Mutation kombiniert.

15.3. Meiotische Rekombination

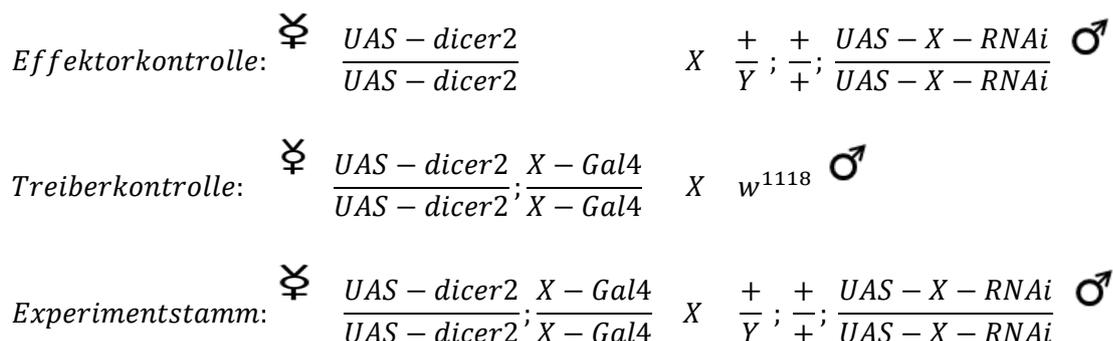
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine meiotische Rekombination der Dopamintransportermutante Dat^{fmn} und der Serotonintransportermutante $Sert^{16d}$ nach folgendem Kreuzungsschema durchgeführt:



Nach Auskreuzen von *Cyo* und *Sco* wurden die einzelnen Linien mittels PCR auf erfolgreiche Rekombination getestet. Das Vorhandensein eines w^{1118} X-Chromosoms und eines *CantonS* X-Chromosoms ermöglichte in Folge eine Selektion einer rotäugigen sowie einer weißäugigen Linie aus dem selben Ursprungstamm. Aus 173 Einzelkreuzungen wurde eine Rekombinante erfolgreich etabliert.

15.4. Ko-Expression von RNAi-Linien mit UAS-dicer2

Als Versuchstiere wurden jeweils die F1 Männchen verwendet. *Dicer2* ist Teil der molekularen Maschinerie zum Hinunterregulieren von RNA, indem es diese in kleine Abschnitte (siRNA) spaltet (Kim *et al.*, 2006). Somit kann durch Koexpression von *UAS-dicer2* der Effekt von RNAi Konstrukten gesteigert werden (Dietzl *et al.*, 2007). Bei der Ko-Expression von RNAi-Linien mit *UAS-dicer2* wurde wie folgt vorgegangen:



16. Verhaltensmessung

Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Fliegen verwendet, die zu Versuchsbeginn ein Alter von drei bis sechs Tagen hatten.

16.1. Lokomotoraufzeichnung

Für die Aufzeichnung der Lokomotordaten wurde das Trikinetics DAM2 System (Trikinetiks, Waltham, MA) verwendet. Die Monitore wurden in Boxen mit Weißlicht LEDs (Lumitronix LED-Technik GmbH, Jungingen, Germany) mit einer Lichtintensität von $47.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ während den Lichtphasen beleuchtet. Die Fliegen wurden für 11 Tage in einen 12h:12h Licht-Dunkel-Wechsel und anschließen für weiter 10 Tage in konstanter Dunkelheit aufgezeichnet. Die Aufzeichnungseinheiten befanden sich in eine Klimakammer mit einer konstanten Temperatur von 20°C und $60\% \pm 1\%$ Luftfeuchtigkeit. Bei den Langtagexperimenten wurden die Fliegen ebenfalls für 11 Tage bei gleichen Bedingungen im Licht-Dunkelwechsel aufgezeichnet, jedoch mit den Lichtregimen (L:D) 4h:20h/ 8h:16h / 16h:8h und 20h:4h.

16.2. Datenanalyse

Zur Darstellung der Rohdaten in Form von Aktogrammen wurde das ImageJ Plugin ActogramJ benutzt (Schmid *et al.*, 2011). Für die Analyse der Schlaf sowie Aktivitätsdaten wurden die Tage zwei bis 11 des LD Zyklus verwendet. Für die Berechnung der Perioden im Dauerdunkel (DD) sowie für Experimente, bei denen ebenfalls die Aktivität oder der Schlaf im Dauerdunkel (DD) berechnet worden ist, wurden die Tage 12-21 verwendet. Für die Auswertung der Aktivität in Lang- bzw. Kurztagbedingungen wurden die Tage 4-11 genutzt. Die ersten drei Tage Adaptationsphase wurden nicht zur Erstellung der Durchschnittstage in Lang- und Kurztagbedingungen herangezogen.

In dieser Arbeit wurde Schlaf als Inaktivität definiert, welche länger als 10 Minuten andauert. Dies weicht von anderen Publikationen ab, in denen bisher 5 Minuten Inaktivität als Schlaf gewertet wurden (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000; Andretic and Shaw, 2005; Ho and Sehgal, 2005). Diese Änderung dient dazu, eine noch genauere Abtrennung der wirklichen Schlafphasen von reinen Ruhephasen zu erreichen. Für die Auswertung wurden von Taishi Yoshii geschriebene Makros für Excel verwendet. Durchschnittstage und Durchschnittsschlafkurven wurden zuerst für jedes Individuum ermittelt und dann für jeden Genotyp der Durchschnitt ermittelt. Im Falle der Aktivität wurden Werte pro Minute im Falle von Schlaf pro Stunde errechnet.

In der Analyse der Daten zu GABA wurde abweichend vom sonstigen Verfahren der Tag in vier 6-Stunden-Intervalle unterteilt und die durchschnittliche Aktivität, die Schlafabschnittslängen sowie der Gesamtschlaf für jedes 6 Stundenintervall ermittelt. Zusätzlich wurde die Latenzzeit in Minuten nach *Licht AUS* bestimmt, indem die Rohdaten für jede Fliege der Trikinetiks txt Dateien in Excel kopiert wurden und darin manuell nach dem ersten Auftreten von 10 Nullen in Reihe, also dem ersten Schlafabschnitt gesucht wurde.

Die Freilaufperioden wurden für die Fliegen, die anschließend an den LD Zyklus einen DD Zyklus erfuhren für die Tage 12 bis 21 mittels Periodogrammanalyse ermittelt (Sokolove & Bushell, 1978) und mit einem Chi-Quadrat Test mit 5% Signifikanzlevel gekoppelt (Schmid *et al.*, 2011). Alle Verhaltensdaten wurden mittels einer ANOVA und Bonferroni Korrektur auf einen Signifikanzlevel von 5% hin überprüft. Im Falle nicht normalverteilter Daten können p Werte, in Abhängigkeit davon wie stark die Daten von einer Normalverteilung abweichen, durch die Multiplikation mit einem Faktor zwischen 2 und 10 angepasst werden (Glaser, 1978).

17. Mikrobiologische Methoden

17.1. Dechorionierung von Embryos zur Entfernung von Mikrosporidien

Da einige Stämme zu Beginn der Arbeit stark von Mikrosporidien befallen waren und dies einen Einfluss auf das Aktivitätsverhalten in extremen Fällen auch auf die Lebensspanne haben kann, wurden alle verwendeten Stämme auf Befall untersucht und gegebenenfalls gereinigt. Hierzu wurde ein Objektträger mit doppelseitigem Klebeband beklebt. Die Fliegen wurden zur Eiablage auf Agarplatten gesetzt. Mit Hilfe eines handelsüblichen Pinsels wurden die Embryonen einzeln auf das Klebeband transferiert und anschließend gerollt, so dass das Chorion zerreißt. Der dechorionierte Embryo wurde auf eine frische Agarplatte überführt. Diese Prozedur wurde für 5 Generationen in Folge wiederholt.

17.2. Mikrosporidientest

Fliegen wurden für 10 Tage bei 25°C gealtert und anschließend auf Objektträgern (Superfrost) ein Quetschpräparat angefertigt. Dieses wurde 10 Minuten in Aceton unter dem Abzug fixiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das Präparat wurde mit einem Fettstift umrandet und ein Tropfen Uvitex 2B (in 1% PBS) für 10 Minuten darauf gegeben. Anschließend wurde mit H₂O abgewaschen und für weitere 10 Minuten bei 60°C vollständig

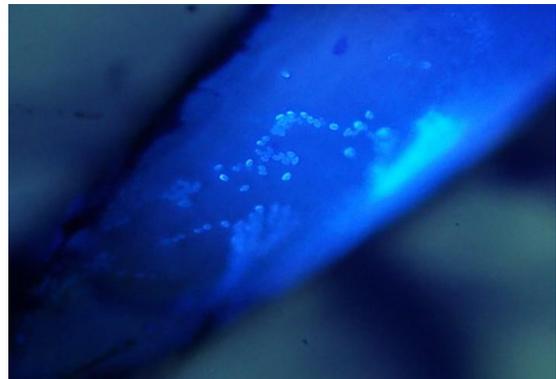


Abbildung 8 Beispiel eines Mikrosporidienbefalls

getrocknet, bevor zur Gegenfärbung ein Tropfen Toulidinblau auf das Präparat gegeben wurde. Nach einer Minute wurde das Präparat erneut mit H₂O abgewaschen und wiederum bei 60°C getrocknet, bevor es mit Glycergel Mounting Medium eingedeckelt wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate auf einen möglichen Mikrosporidienbefall hin untersucht.

III Ergebnisse

18. Amintransporter und Schlaf

18.1. Das Schlafverhalten der Dopamintransportermutante Dat^{fmn}

Bei der Dopamintransportermutante Dat^{fumin} handelt es sich um die Insertion eines 2kb großen Teilstücks eines *roo* Transposons in den Dopamintransporterlokus (*dDAT*) des w^{1118} Stammes (Kume *et al.*, 2005). Ein daraus resultierendes Stopcodon resultiert in der Expression eines auf 343 Aminosäuren verkürzten, nicht funktionalen Dopamintransporters, dessen Länge ohne die p-Element Insertion 632 Aminosäuren beträgt. Die Mutante Dat^{fumin} wurde ursprünglich als hyperaktiv, mit verminderten Ruhephasen und erhöhter Erregbarkeit beschrieben. Da der Dopamintransporter für den Rücktransport von Dopamin aus dem synaptischen Spalt verantwortlich ist, werden die gefunden Phänotypen auf eine verlängerte Dopaminsignal zurückgeführt (Kume *et al.*, 2005). Bei der Messung der Aktivität im LD 12:12 zeigte sich eine deutliche Steigerung der Aktivität von Dat^{fmn} im Vergleich zu dem Kontrollstamm w^{1118} (Abbildung 9).

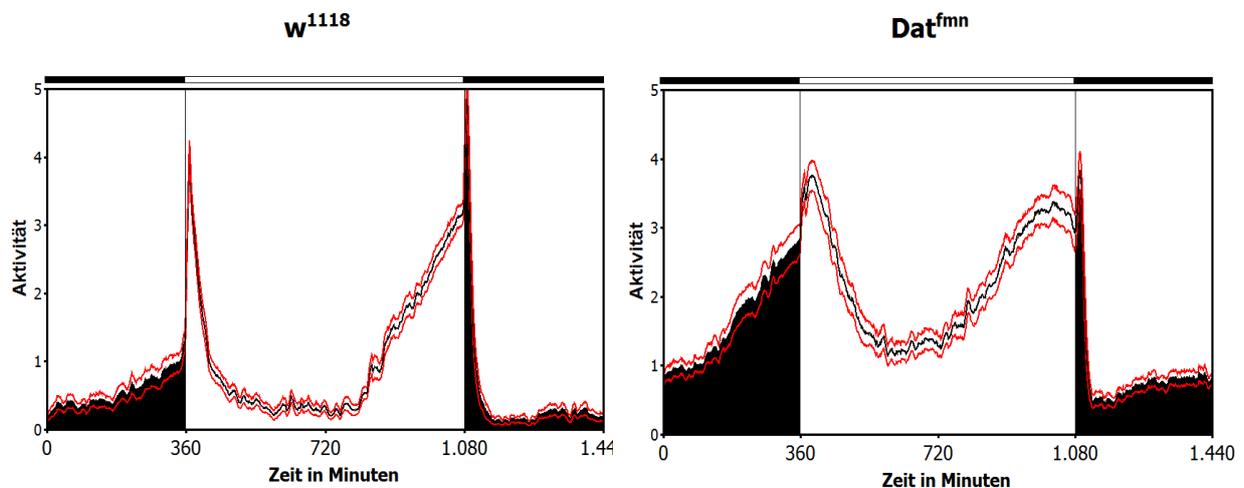


Abbildung 9 Aktivität von Dat^{fmn} und w^{1118}

Vergleich des Aktivitätsprofils der Durchschnittstage (10 Tage) von w^{1118} (n=30) und Dat^{fmn} (n=29) im LD 12:12 (10 Zyklen). Rote Linien zeigen den Standardfehler an. Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

Hierbei erreicht Dat^{fmn} mit einem mittleren Aktivitätswert von $1,75 \pm 0,09$, einen um den Faktor 2 höheren Wert, als w^{1118} mit $0,82 \pm 0,05$. Die erhöhte Aktivität resultiert aus einer Steigerung sowohl im Licht als auch im Dunkel, wobei die Lichtphase die höhere Aktivität aufweist. Als Nächstes wurde das Schlafverhalten analysiert. Auch hierbei zeigt Dat^{fmn} eine massiv reduzierte Schlafmenge von 5,2

Stunden (313 Minuten) an einem 24 h Tag (1440 min) im Vergleich zu 16,5 Stunden (988 Minuten) Gesamtschlaf von w^{1118} (Abbildung 10A). Auffällig ist, dass vor allem die Schlafabschnittslänge mit 18,25 min im Vergleich zu 67,44 min der Kontrolle signifikant verkürzt ist. Dies deutet darauf hin, dass vor allem eine Aufrechterhaltung der einzelnen, initiierten Schlafabschnitte beeinträchtigt ist (Abbildung 9B). Die Schlafkurven zeigen, dass diese Reduktion des Schlafes sich über den gesamten 24 Stunden Bereich des Licht-Dunkel-Zyklus erstreckt (Abbildung 12, S. 34).

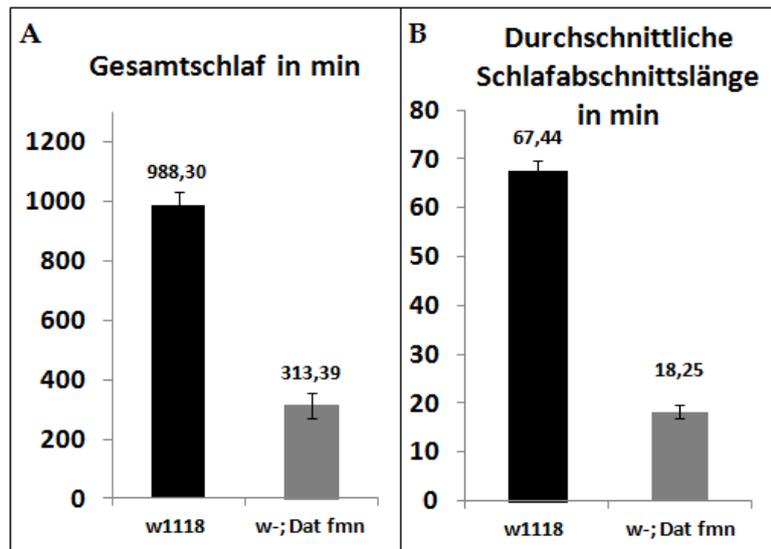


Abbildung 10 Gesamtschlaf und Schlafabschnittslänge von $w-;Dat^{fmn}$ und w^{1118}

A Durchschnittlicher Gesamtschlaf von $w-;Dat^{fmn}$ (n=29) und w^{1118} (n=30) im LD 12:12 (10 Zyklen) in 24h (=1440 min)
B Durchschnittliche Schlafabschnittslänge
 Indikatoren zeigen den Standardfehler an.

Eine Auswertung der Periodenlänge ergab eine geringe, aber trotz allem signifikant längere Periode für w^{1118} von 23,86 Stunden im Vergleich zu Dat^{fmn} mit 23,63 Stunden (Abbildung 11). Beide Stämme sind zu 96% rhythmisch.

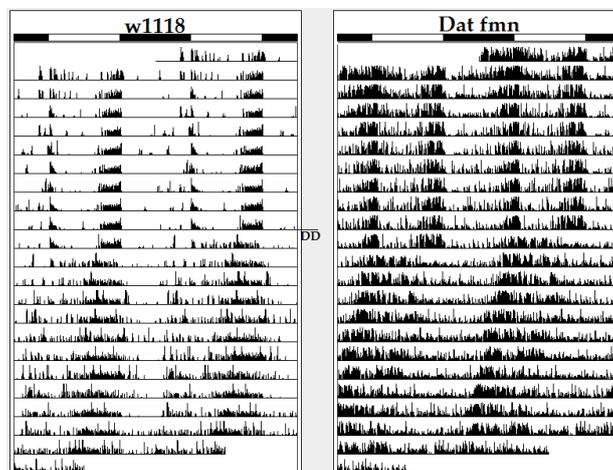


Abbildung 11 Aktogramme von w^{1118} und Dat^{fmn}

Das verlängerte Dopaminsignal übt trotz der massiven Effekte auf Schlaf und Aktivität nur einen geringen Einfluss auf die Innere Uhr aus.

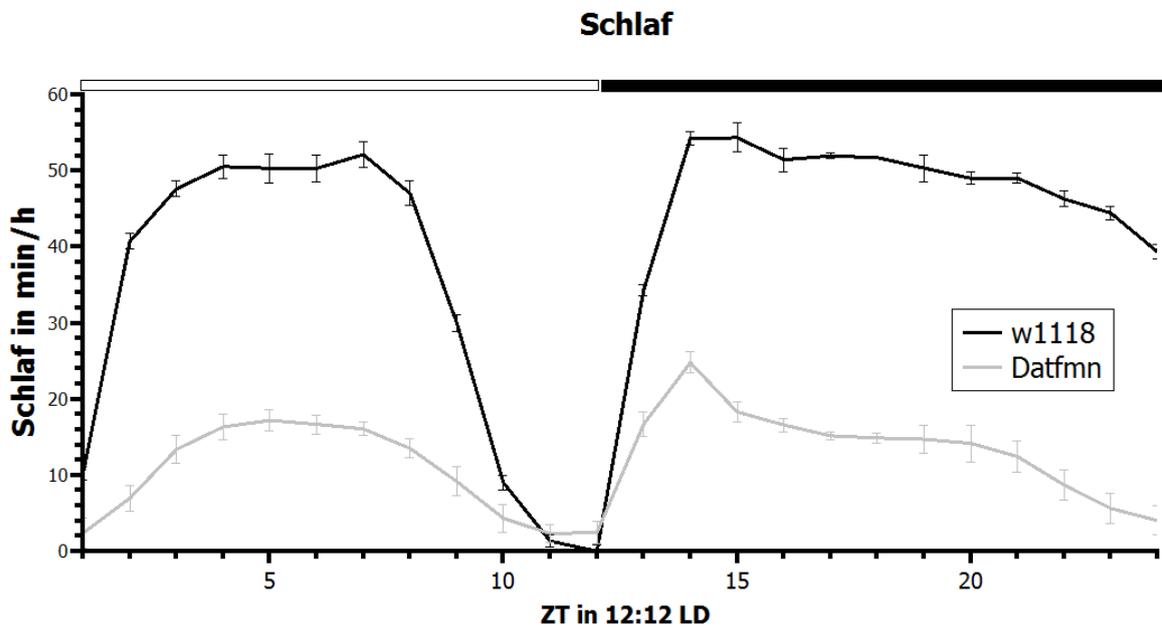


Abbildung 12 Schlaf pro Stunde von Dat^{fmn} und w^{1118}

Schlafkurven von Dat^{fmn} (n=29) und w^{1118} (n=30) im LD 12:12 (10 Zyklen) in 24h (=1440 min) Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

18.2. Neuronal dopamindefiziente Fliegen

Um die Auswirkungen von Dopamin auf das Schlafverhalten und die Aktivität genauer zu charakterisieren, wurden als nächstes Fliegen analysiert, die im Gegensatz zu Dat^{fmn} (verlängertes Dopaminsignal) kein Dopamin im Gehirn mehr bilden. Diese Fliegen tragen eine Mutation im Gen *pale*, das für das limitierende Enzym der Dopaminsynthese, Tyrosinhydroxylase, codiert. Diese Mutation (*pale*) ist letal, weswegen mit Hilfe zweier Treiber, *Ddc-Gal4* und *TH-Gal4* ein Rettungskonstrukt exprimiert wird. Da es für die Tyrosinhydroxylase zwei Isoformen gibt, eine hypodermale und eine neuronale, wurden zwei verschiedene Rettungskonstrukte kloniert, eines das beide Isoformen rettet, und eines, das ausschließlich die hypodermale Isoform rettet. Letzteres basiert auf einem Frameshift, der eine für die neuronale Isoform notwendige Splicesite verändert gefolgt von einem zweiten Frameshift der im Anschluss die Basensequenz wieder korrigiert, so dass alle für die hypodermale Isoform relevanten Bereiche abgelesen werden können (Hirsh *et al.*, 2010; Riemensperger *et al.*, 2011). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der Genotyp der Expression des

Rettungskonstruktes sowohl der hypodermalen als auch neuronalen Isoform als *dTHg;ple* abgekürzt, und der Genotyp der neuronal dopamindefizienten Fliegen mit *dTHg^{FS+/-};ple*. Die vollständige Genotypenbezeichnung kann dem Material und Methodenteil (Tabelle 2, S. 26) bzw. der

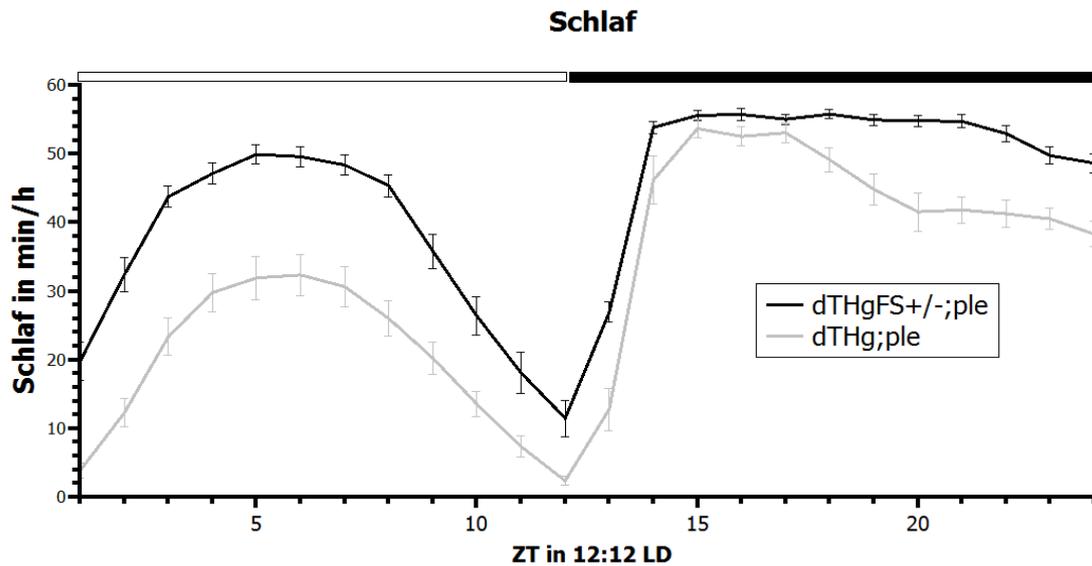


Abbildung 13 Schlaf pro Stunde von neuronal dopamindefizienten Fliegen und Kontrolle

Neuronal dopamindefiziente Fliegen (*dTHgFS+/-;ple* n=28) zeigen konstant erhöhten Schlaf im Vergleich zu den Fliegen bei denen sowohl die hypodermale als auch neuronale Isoform der Tyrosinhydroxylase gerettet wurde (*dTHg;ple* n=30). Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

ursprünglichen Veröffentlichung entnommen werden (Hirsh *et al.*, 2010). Die neuronal dopamindefizienten Fliegen zeigen erhöhten Schlaf über den gesamten LD-Zyklus. Dies bestätigt die Rolle von Dopamin bei der Schlafregulation. Auch die Aktivität zeigt mit einem durchschnittlichen Wert von 0,79 +/- 0,04 für *dTHg;ple* einen signifikant höheren Wert als die neuronal dopamindefizienten Fliegen *dTHg^{FS+/-};ple* mit 0,52 +/- 0,04. Wie anhand der Durchschnittstage erkennbar ist, ist die Aktivität ebenfalls durchgehend erhöht (Abbildung 14). Bei der Analyse der Periodenlänge ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Periode von 24,06 +/- 0,21 für *dTHg;ple* und 24,65 +/- 0,43 für *dTHg^{FS+/-};ple*. Allerdings zeigte *dTHg^{FS+/-};ple* einen niedrigeren Prozentsatz von rhythmischen Fliegen von 67,8% (n=28) zu 96,3% (n=27) *dTHg;ple* auf ($p=0.00639$ Chi-Square Test). Für die Rhythmik von *dTHg;ple*, konnten nur 27 der 30 Tiere verwendet werden, die zur Aktivitäts- und Schlafanalyse herangezogen wurden, da drei Individuen nicht volle zehn Tage im Dauerdunkel überlebt haben und deshalb für die Periodenanalyse ausgeschlossen wurden.

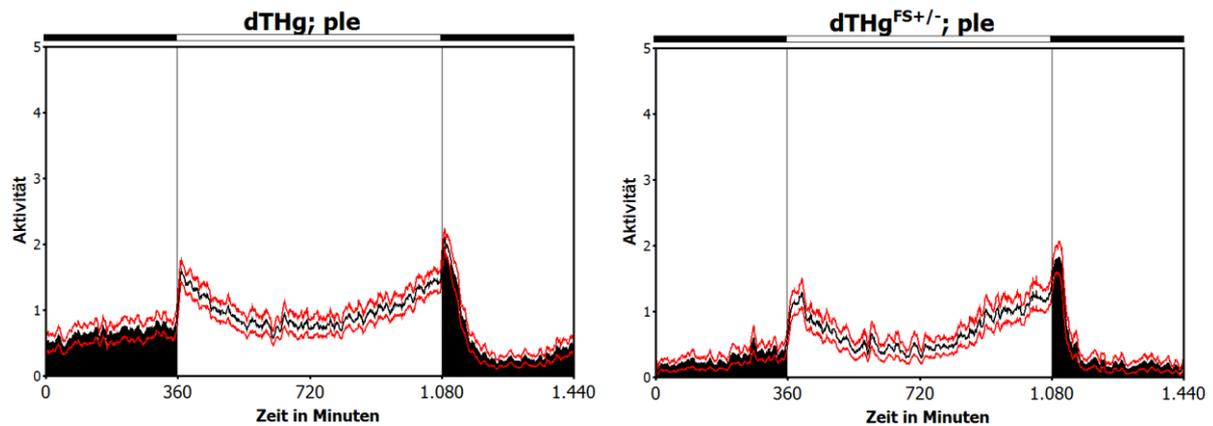


Abbildung 14 Aktivität von *dTHg;ple* und *dTHg^{FS+/-};ple*

Vergleich des Aktivitätsprofils der Durchschnittstage von den neuronal dopamindefizienten *dTHg^{FS+/-};ple* (n=28) und der Vergleichsgruppe *dTHg;ple* (n=30) bei denen die *ple* Mutation auch neuronal gerettet wurde. Rote Linien zeigen den Standardfehler an.

18.3. Manipulation der Expressionsstärke der Dopaminrezeptoren in den PDF Neuronen

Aufgrund der massiven Phänotypologie von sowohl *Dat^{fmn}* als auch *dTHg^{FS+/-};ple* Tieren wurden als nächstes Dopaminrezeptoren in den PDF Neuronen mit Hilfe der RNAi Technologie hinunterreguliert. Um die Effizienz der RNAi zu steigern, wurde dazu gleichzeitig *UAS-dicer2* exprimiert (Dietzl *et al.*, 2007). Die TRiP Linien von Bloomington für die Rezeptoren DopR, DopR2 und D2R wurden mit Hilfe einer *Pdf-Gal4* Treiberlinie exprimiert. TRiP Linien basieren auf einer kurzen Haarnadel RNAi Sequenz, die im Empfängerstamm an einer spezifischen attP-Sequenz im Genom integriert wird (Dietzl *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2008). Die *Pdf-Gal4* Treiberlinie ist extrem spezifisch und treibt ausschließlich in den PDF positiven Neuronen (Park *et al.*, 2000), dazu gehören die vier sLNv (ohne die "fünfte", die PDF negativ ist) und die 4-6 l-LNv, die mehrfach als mögliches Schlafzentrum von *Drosophila melanogaster* diskutiert wurden (Parisky *et al.*, 2008; Sheeba *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009; Lebestky *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2011). Eine Analyse des Schlafverhaltens ergab in keinem Fall eine Abweichung der Experimentgruppe von den Kontrollen (Abbildung 15). Die vollständige Auswertung des Aktivitätsverhaltens und der Rhythmik ergab lediglich im Falle der Hinunterregulierung von DopR2 und D2R eine leichte Verminderung der Rhythmik auf 74,25% bzw. 87,1%. Für eine Übersicht aller ermittelnden Daten siehe Tabelle 3, S.38. Für den D2R Rezeptor wurde zusätzlich die Linie des Wiener Drosophila RNAi Zentrums verwendet (VDCR). Auch mit dieser konnte kein Phänotyp bezüglich des Schlafverhaltens, der Aktivität und Rhythmik festgestellt werden.

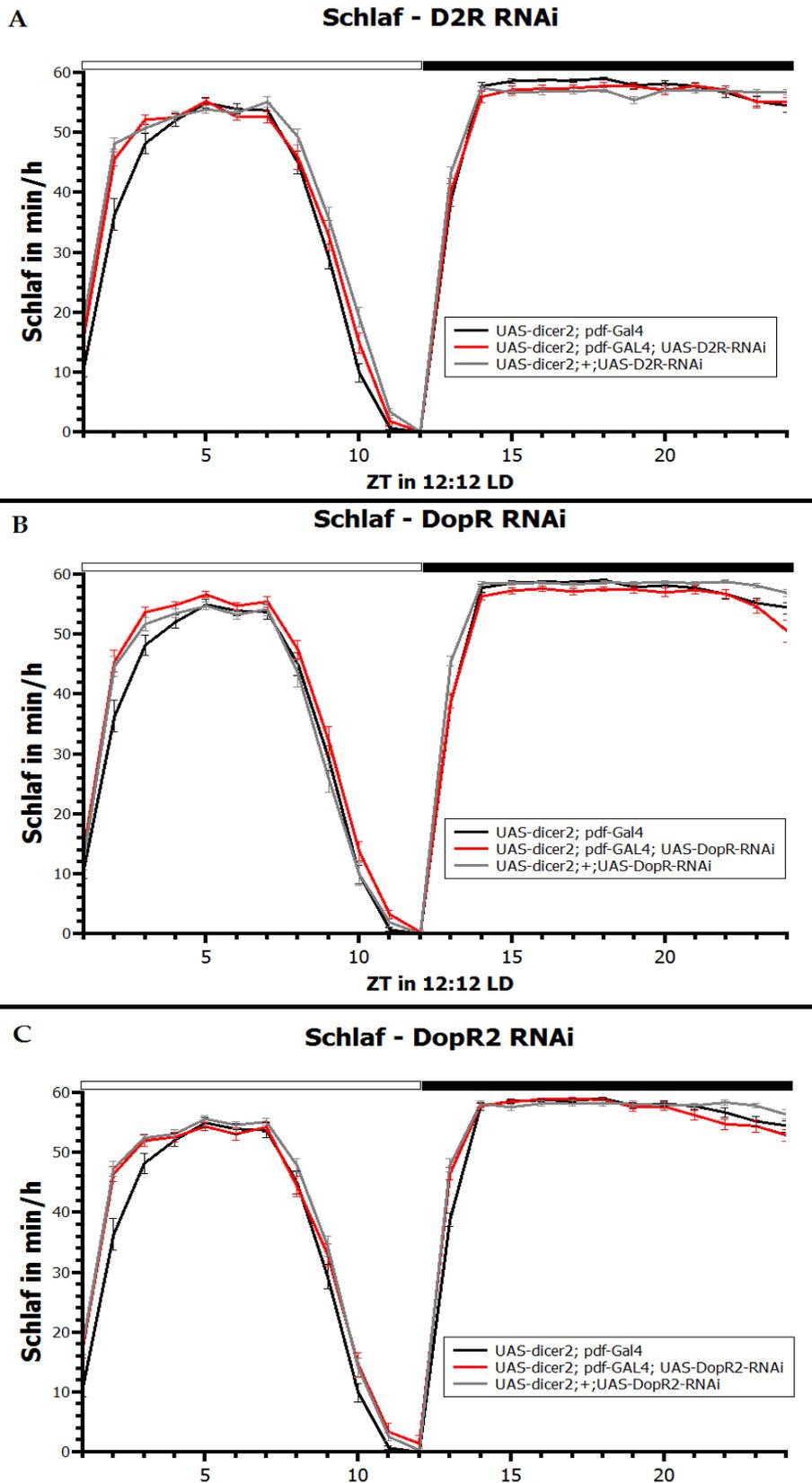


Abbildung 15 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen

Durch Co-Expression von UAS-Trip-RNAi Linien für die Rezeptoren D2R (A), DopR (B) und DopR2 (C) mit *UAS-dicer2* konnte kein Effekt auf das Schlafverhalten im Vergleich zu Treiber- und Effektorkontrolle gefunden werden.

UAS-dicer2; pdf-Gal4 n=32 / *UAS-dicer2; pdf-Gal4; UAS-D2R-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; pdf-Gal4; UAS-DopR-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; pdf-Gal4; UAS-DopR2-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; UAS-D2R-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; UAS-DopR-RNAi* n= 28 / *UAS-dicer2; UAS-DopR2-RNAi* n= 32 Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

Tabelle 3 Übersicht der Ergebnisse der Hinunterregulierung von Dopaminrezeptoren in PDF Neuronen

Die statistisch signifikanten Werte sind **rot** markiert, schwarze Werte sind nicht signifikant verschieden von den Kontrollen

Genotyp	n	Aktivität Gesamt Tag Nacht	Schlaf Gesamt in min und h	Schlaf- Abschnitts- Länge in min	Periode in h	Power	Rhythmik in %
UAS-dicer2; Pdf-Gal4 ; UAS-D2R-RNAi Wien	32	0.33 0.54 0.12	1148min = 19,1 h	120	24.29	29.35	93,75
UAS-dicer 2; UAS-D2R-RNAi Wien	30	0.27 0.46 0.09	1157 min = 19,3 h	117	23.74	34.08	96,55
UAS-dicer2; Pdf-Gal4	32	0.33 0.53 0.14	1085 min = 18,1 h	102	23.85	37.68	100
UAS-dicer2; Pdf-Gal4 ; UAS- DopR2-RNAi	31	0.28 0.45 0.11	1117 min = 18,6h	108	24.12	20.71	74,19 p=0.0001 Chi=18 df=2 N=95
UAS-dicer 2; UAS-DopR2-RNAi	32	0.24 0.39 0.08	1138 min = h	106	23.83	23.93	100
UAS-dicer2; Pdf-Gal4 ; DopR-RNAi	31	0.47 0.72 0.22	1106 min = 18,4 h	110	23.86	25.88	93,55
UAS-dicer 2; DopR-RNAi	28	0.41 0.73 0.10	1110min = 18,5 h	117	24.81	28.54	92,86
UAS-dicer2; Pdf-Gal4; UAS-D2R-RNAi Bloomington	31	0.41 0.66 0.16	1107min = 18,5 h	106	23.79	27.91	87,09 p=0.0073 Chi=7.2 Df=2 N=96
UAS-dicer 2; UAS-D2R-RNAi Bloomington	31	0.34 0.54 0.14	1129min = 18,8 h	85	23.51	26.21	96,77

18.4. Hinunterregulierung verschiedener Dopaminrezeptoren in allen Uhrgehoben

Nachdem bei der Reduktion der Expression von Dopaminrezeptoren in PDF-Neuronen keine Effekte in Bezug auf Schlaf festgestellt werden konnten, wurde als Nächstes die Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren auf alle Gewebe, die eine Innere Uhr besitzen ausgeweitet, indem *tim-Gal4* als Treiberlinie verwendet wurde. Diese Treiberlinie beinhaltet alle bekannten Uhrneuronen in *Drosophila melanogaster*. *UAS-dicer2* wurde koexprimiert. Wie im Falle des PDF-Treibers konnte kein Effekt in Bezug auf den Schlaf festgestellt werden (Abbildung 16).

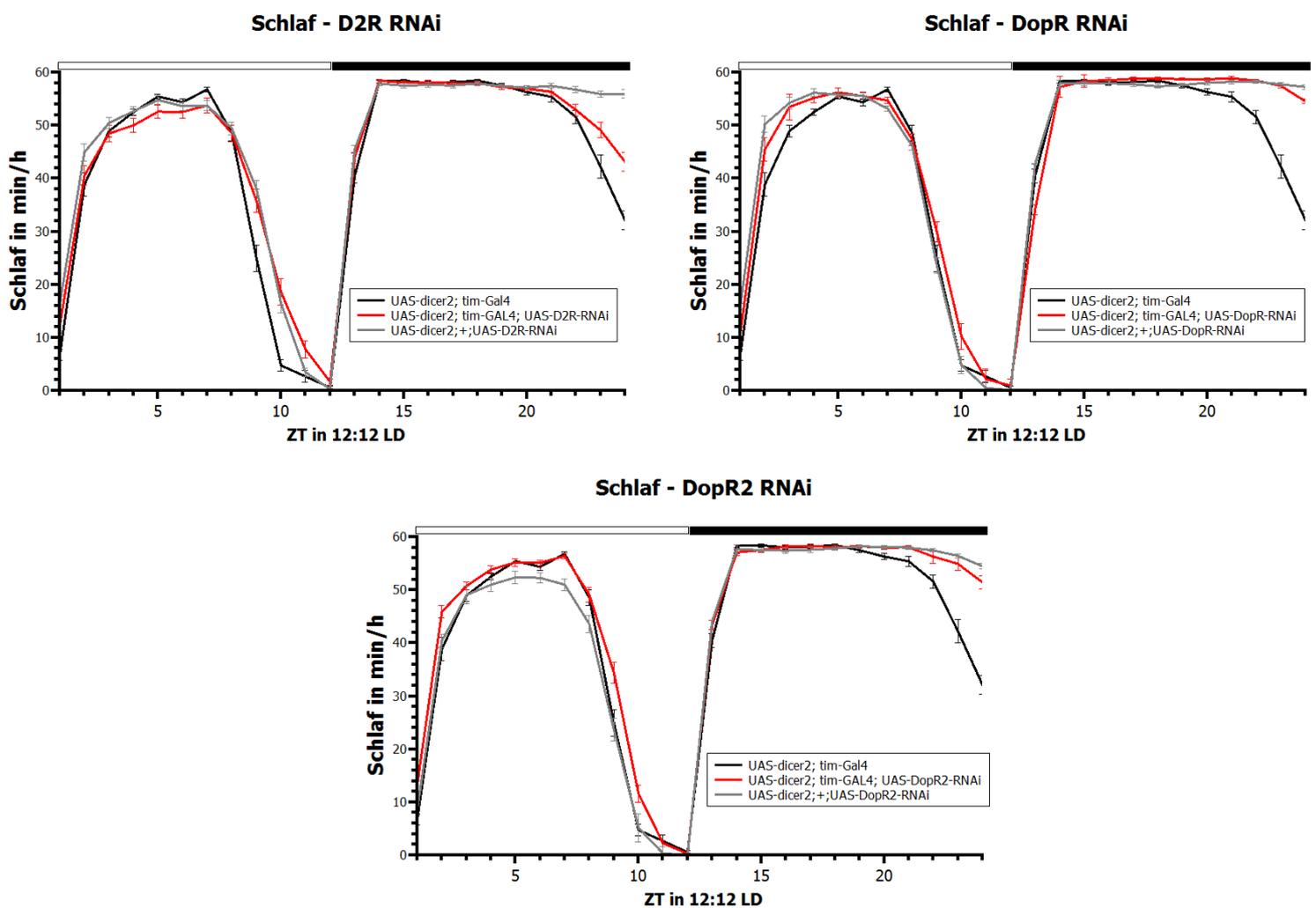


Abbildung 16 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in allen Uhrgehoben

Durch Co-Expression von *UAS-Trip-RNAi* Linien, sowie für die Rezeptoren D2R, DopR und DopR2 sowie *UAS-dicer2* mit *tim-GAL4* wurde keine Effekt auf das Schlafverhalten im Vergleich zur Treiber- und Effektorkontrolle gefunden.

UAS-dicer2; tim-Gal4 n=32 / *UAS-dicer2; tim-Gal4; UAS-D2R-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; tim-Gal4; UAS-DopR-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; tim-Gal4; UAS-DopR2-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; UAS-D2R-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; UAS-DopR-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; UAS-DopR2-RNAi* n= 31 Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

18.5. Hinunterregulierung verschiedener Dopaminrezeptoren in sechs bis acht DN1 Neuronen

Die Expression der RNAi-Konstrukte für die Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen, sowie allen Uhrgebewen zeigte keinen Unterschied im Schlafverhalten. Im Folgenden wurde eine Teilpopulation

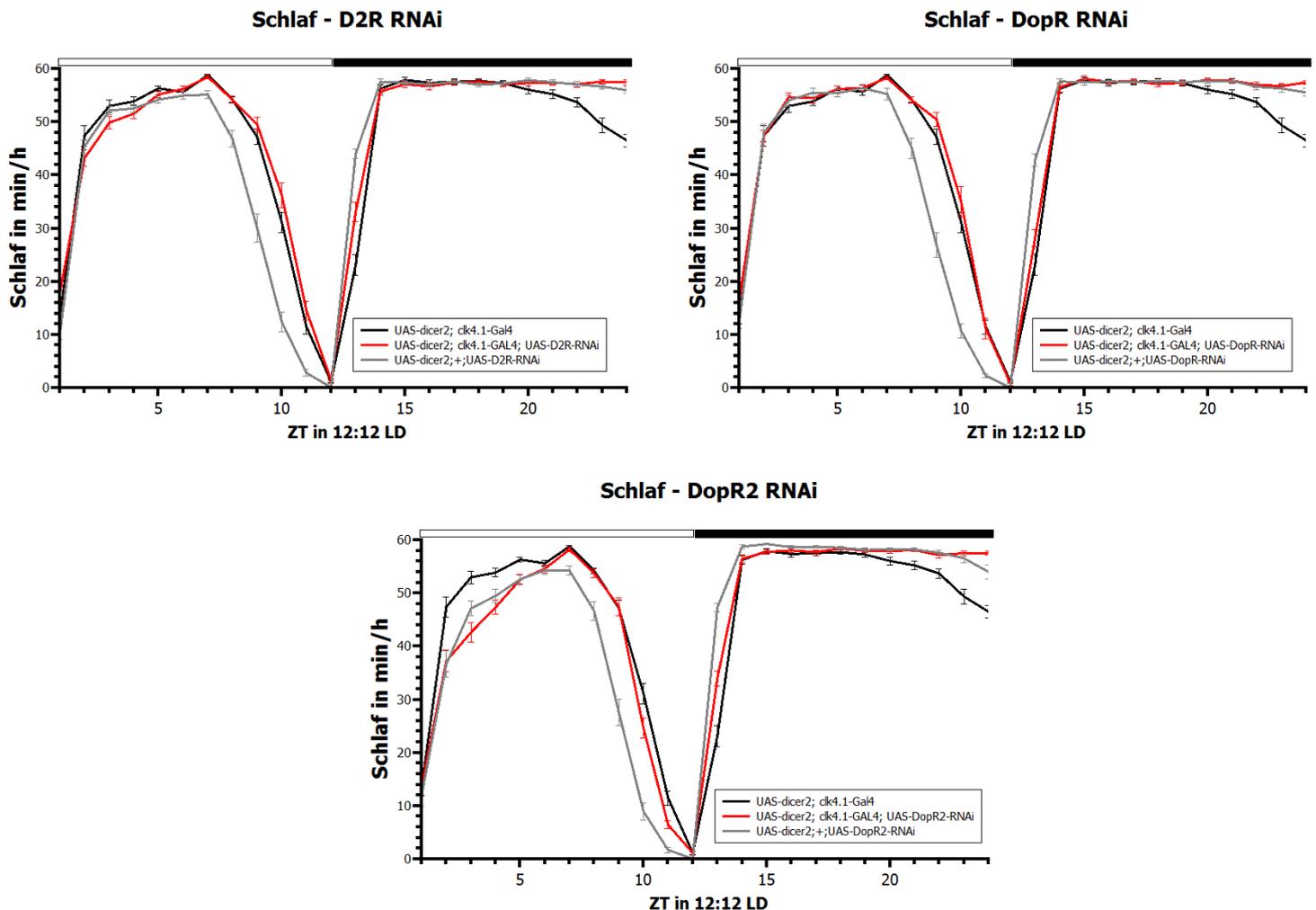


Abbildung 17 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in sechs bis acht DN1 Neuronen

Durch Co-Expression von *UAS-Trip-RNAi* Linien für die Rezeptoren D2R, DopR und DopR2 mit *UAS-dicer2* durch *clk4.1-GAL4* wurde kein Effekt auf das Schlafverhalten im Vergleich zu Treiber- und Effektorkontrolle festgestellt.

UAS-dicer2; clk4.1-Gal4 n=32 / *UAS-dicer2; clk4.1-Gal4; UAS-D2R-RNAi* n= 31 / *UAS-dicer2; clk4.1-Gal4; UAS-DopR-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; clk4.1-Gal4; UAS-DopR2-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; UAS-D2R-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; UAS-DopR-RNAi* n= 32 / *UAS-dicer2; UAS-DopR2-RNAi* n= 30. Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Balken über dem Diagramm zeigt Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

der dorsalen Neuronen hinsichtlich eines Effekts auf den Schlaf bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren untersucht. Der verwendete *clk4.1-Gal4* Treiber exprimiert in sechs bis acht Neuronen des DN1 Clusters. Auch hierbei ergab sich kein Effekt auf das Schlafverhalten, weshalb von einer Ausweitung des Screens auf weitere Treiberlinien abgesehen wurde (Abbildung 17).

18.6. Serotonintransportermutante $Sert^{16d}$

Bei der Serotonintransportermutante $Sert^{16d}$ handelt es sich um eine transgene Fliege bei der das p-Element P(XP)d04388 mobilisiert wurde. Dadurch entstand eine Deletion von 1192 Basenpaaren, beginnend 514 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart. Die Deletion erfasst regulatorische Bereiche, den Transkriptionsstart, das erste Exon sowie einen Teil des ersten Introns. Dies führt zu einer funktionalen Deletion des Serotonintransporters. Bei der Mobilisierung wurde auch eine Linie mit präziser Entfernung des p-Elementes erzeugt: $Sert^{4d}$, welche als Kontrolle dient. Da beide Stämme aus dem selben Ursprungsstamm etabliert wurden, ist der genetische Hintergrund der Linien vergleichbar (Kaiser, 2009).

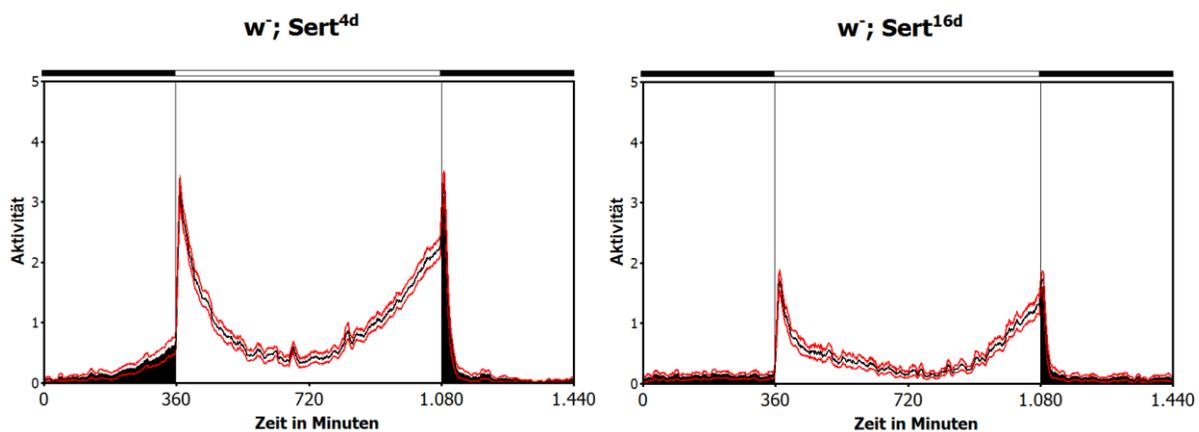


Abbildung 18 Aktivitätsprofile von $w; Sert^{4d}$ und $w; Sert^{16d}$

Vergleich des Aktivitätsprofils der Durchschnittstage von der Kontrolle $w; Sert^{4d}$ ($n=32$) und der Serotonintransportermutante $w; Sert^{16d}$ ($n=30$). Die roten Linien zeigen den Standardfehler an.

Die Serotonintransportermutante $Sert^{16d}$ zeigt mit einem durchschnittlichen Wert von $0,32 \pm 0,02$ eine signifikante Verringerung der Aktivität im Vergleich zum Kontrollstamm $Sert^{4d}$, der eine durchschnittliche Aktivität von $0,62 \pm 0,04$ aufweist (Abbildung 18). Die Serotonintransportermutante beeinflusst jedoch nicht nur die Aktivität, sondern zeigt zudem auch eine verlängerte Periode von $23,75 \pm 0,1$ ($p=0,026$). Für den Kontrollstamm $Sert^{4d}$ wurde eine Periodenlänge von $23,49 \pm 0,06$ ermittelt. Zudem ist die Serotonintransportermutante mit 70% weit weniger rhythmisch als die Kontrolle mit 90,6% ($p=0,04$).

Außerdem ist auch das Schlafverhalten verändert. So zeigt die Serotonintransportermutante einen deutlich erhöhten Gesamtschlaf von 18,4 Stunden (1105 +/- 15 Minuten) im Vergleich zu 14,8 Stunden (888 +/- 26 Minuten) des Kontrollstammes. Wie aus Abbildung 19 ersichtlich ist, ist auf Grund der hohen Schlafmenge in der Nacht die Zunahme vor allem auf eine Erhöhung des Schlafes

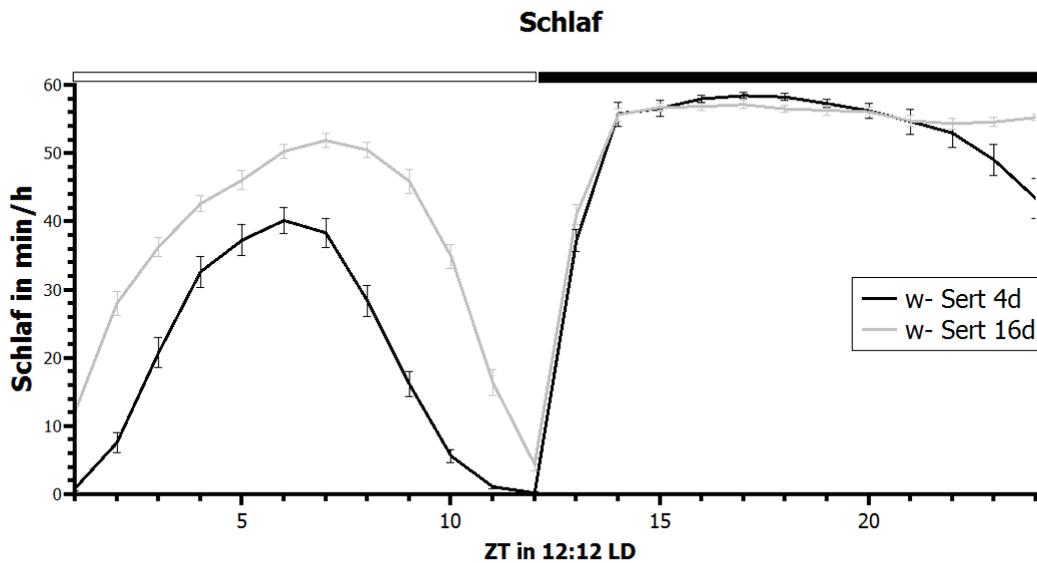


Abbildung 19 Schlaf pro Stunde der Serotonintransportermutante und Kontrolle

Serotonintransportermutanten $w\text{-Sert}^{16d}$ ($n=30$) zeigen eine deutlich erhöhte Schlafmenge über den Tagesverlauf. Durch den hohen Schlaf während der Dunkelphase des Kontrollstammes $w\text{-Sert}^{4d}$ ($n=32$) ist dies vor allem in der Lichtphase ersichtlich. Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

während der Lichtphase zurückzuführen. Jedoch sieht man am Ende der Dunkelphase, dass die Mutante eine konstant hohe Schlafmenge pro Stunde beibehält.

19. GABA und Schlaf

Das Kapitel stellt mehrheitlich eine Übersetzung des Ergebnisteils meiner Publikation dar (Gmeiner *et al.*, 2013):

Eine vorangegangene Studie hat gezeigt, dass der GABA_A Rezeptor Rdl relevant für das Schlafverhalten ist, insbesondere für die Latenzzeit zu Beginn der Dunkelphase (Parisky *et al.*, 2008). Wie in der Einleitung bereits erwähnt (Kapitel 6.3), legen die Ergebnisse der Studie nahe, dass es über den Rdl Rezeptor hinaus eine weitere GABAerge Komponente bei der Schlafregulation gibt. Zudem wurde im Vorfeld gezeigt, dass es eine große Zahl an GABAergen Neuronen im Gehirn von *Drosophila* gibt, von denen einige in der Akzessorischen Medulla stark verzweigen (Enell *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2009). Die Akzessorische Medulla enthält unter anderem auch die dendritischen Fortsätze der PDF Neuronen (Hamasaka *et al.*, 2005).

Um zu untersuchen, ob GABA_B Rezeptoren auf den PDF Neuronen relevant für das Schlaf- und Aktivitätsverhalten sind, wurden die GABA_BR2 Rezeptoren mit einer in früheren Arbeiten erfolgreich verwendeten RNAi Linie (Root *et al.*, 2008), wie es schon für die Dopaminrezeptoren versucht wurde (siehe Kapitel 18.3), in den PDF-Neuronen hinunterreguliert.

19.1. Hinunterregulierung der GABA_B Rezeptoren in den PDF Neuronen erhöht die Aktivität

Bei der Untersuchung der Aktivität der Fliegen zeigte sich, dass die Experimentgruppe mit den hinunterregulierten GABA_B Rezeptoren signifikant mehr Aktivität zeigte, als die Kontrollgruppen (Abbildung 20E, S. 45). Zwischen der Treiberkontrolle und der Effektorkontrolle gab es keine signifikanten Unterschiede. Alle drei Gruppen zeigten ein bimodales Aktivitätsmuster. Die Rhythmik im Dauerdunkel war unbeeinflusst von der Hinunterregulierung der GABA_B Rezeptoren. Alle drei Stämme waren sehr rhythmisch (86-100%) und wiesen eine Periode von etwa 24 Stunden auf (Abbildung 21C,D S. 46).

19.2. Hinunterregulierung der GABA_B Rezeptoren in den PDF Neuronen beeinflusst die Aufrechterhaltung des Schlafes

Bezüglich des Schlafes konnte eine stark verringerte Schlafmenge in der Dunkelphase festgestellt werden. Dies betraf vor allem die zweite Hälfte der Nacht. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte die Experimentgruppe in dem 6 Stunden Intervall der zweiten Nachthälfte 30 Minuten weniger Schlaf (Abbildung 20A,C, S. 45). Gleichzeitig verringerte sich in diesem Abschnitt die durchschnittliche Schlafabschnittslänge auf 108 Minuten im Vergleich zu 135 bzw. 160 Minuten Schlafabschnittslänge bei den Kontrolltieren (Abbildung 20D, S.45). Offensichtlich sind Fliegen mit hinunterregulierten GABA_B Rezeptoren nicht in der Lage, den Schlaf in der zweiten Hälfte der Nacht aufrecht zu erhalten. Während der Lichtphase sowie der ersten Hälfte der Dunkelphase konnte trotz der durchgehend erhöhten Aktivität der Experimentgruppe kein Effekt auf den Schlaf beobachtet werden. Somit ist die Schlafregulation mechanistisch unabhängig von der Aktivität. Auch die Latenzzeit, die im Falle der Studie zum GABA_A Rezeptor Rdl beeinflusst wurde, veränderte sich durch die Herabregulierung der GABA_B Rezeptoren nicht (Abbildung 20B, S. 45). Die Fliegen schliefen nach "Licht-Aus" ebenso schnell ein wie Fliegen der Treiberkontrolle (Control 2). Die Effektorkontrolle (Control1) zeigte eine geringere Latenzzeit. Abbildung auf Folgeseite:

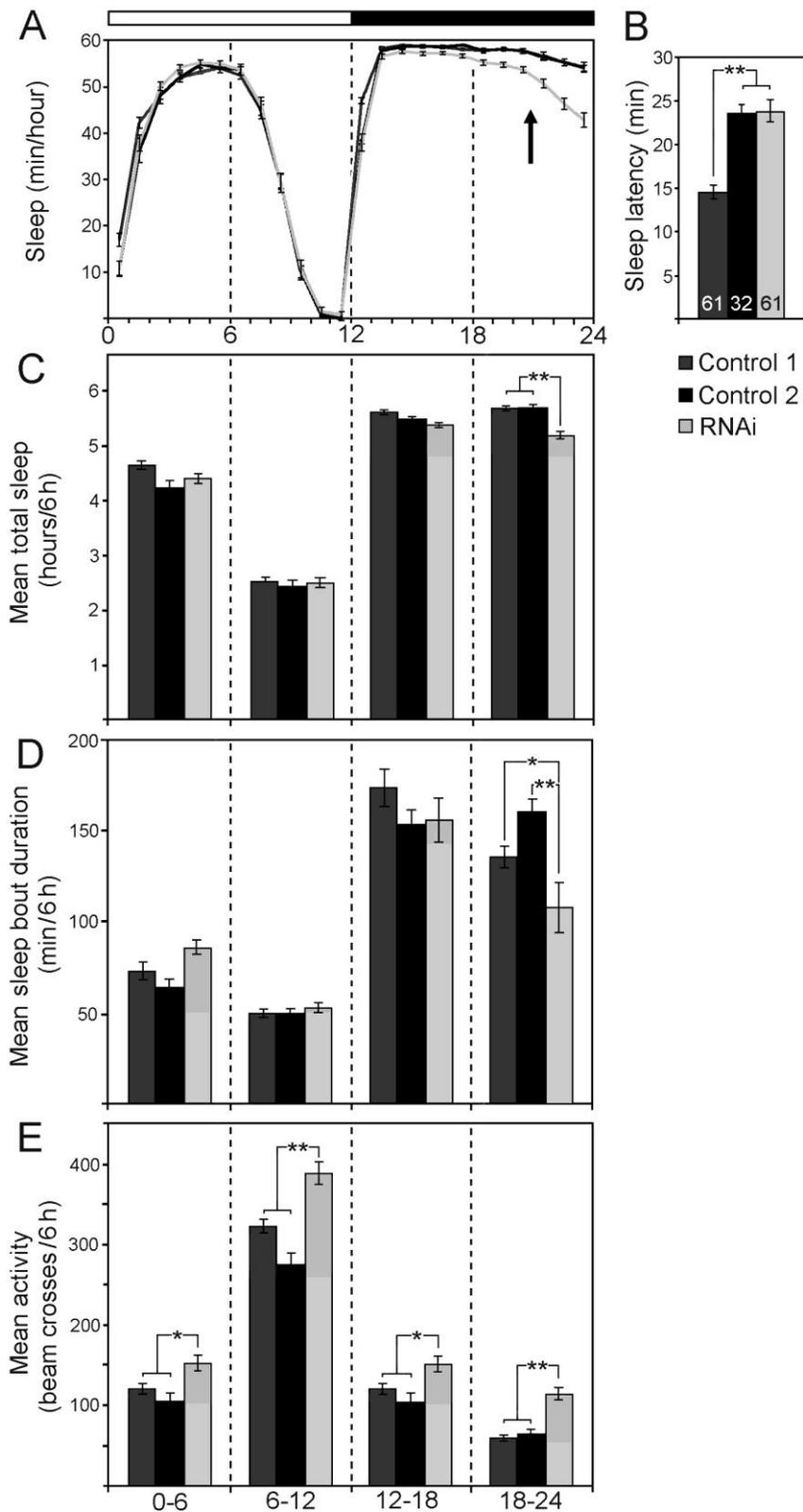


Abbildung 20 Die Hinunterregulierung der GABA_B-R2 Rezeptoren in den PDF Neuronen verringert den Schlaf in der zweiten Hälfte der Nacht

RNAi = *UAS-dicer2; pdf-Gal4; UAS-GABABR2-RNAi* (n=61); Control 1 = *UAS-dicer2; UAS-GABABR2-RNAi* (n=61); Control2 = *UAS-dicer2; pdf-Gal4* (n=32)

A) Schlafkurven im LD 12:12 (10 Zyklen) in 24h (=1440 min) für Fliegen, bei denen GABAB2-Rezeptor hinunterreguliert wurde. Der Pfeil zeigt den reduzierten Schlaf. B) Die Schlaflatenz nach "Licht Aus" ist in Kontrolle 1 ungewöhnlich kurz. Kontrolle 2 unterscheidet sich jedoch nicht von der Experimentgruppe. (C-E) Der 24-h Tag ist in 6 h Intervalle unterteilt. C) Gesamtschlaf, D) durchschnittliche Schlafabschnittslänge und E) durchschnittliche Aktivität. Signifikante Unterschiede, die mit ANOVA und anschließendem Post-Hoc Test ermittelt wurden sind mit einem Stern markiert

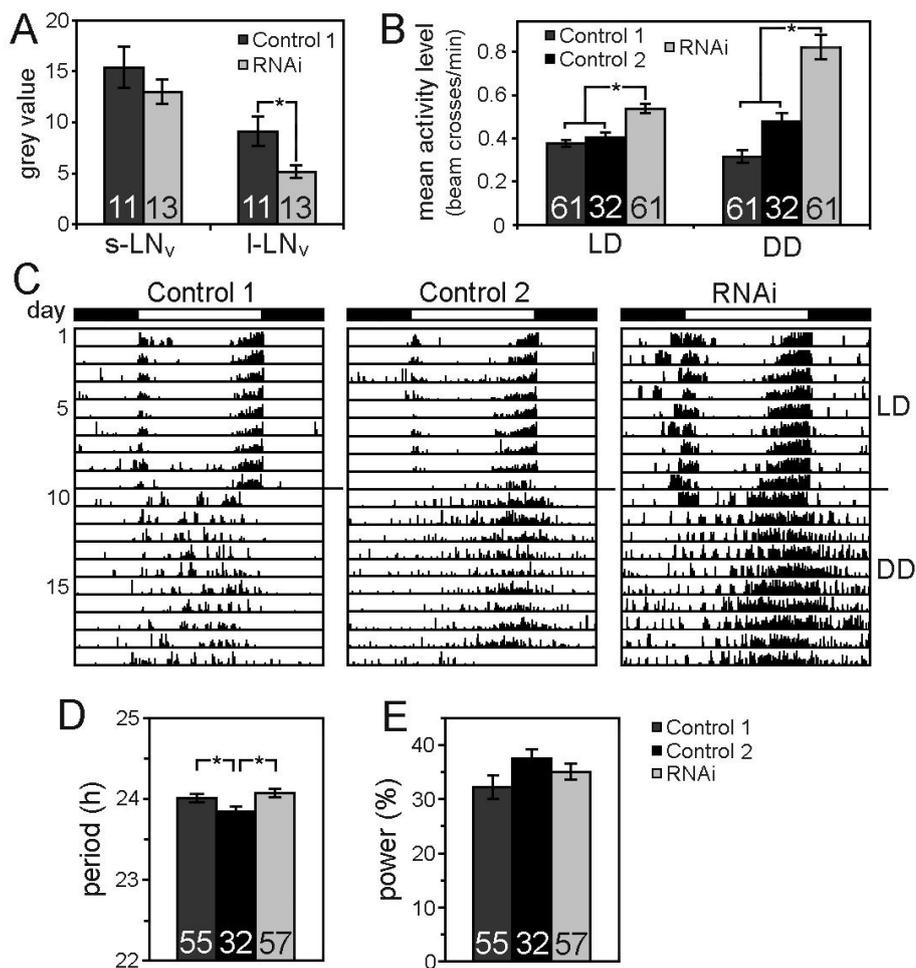


Abbildung 21 Hinunterregulierung der GABA_BR2 Rezeptoren in den I-LNV erhöht den Aktivitätslevel

Hinunterregulierung der GABA_BR2 Rezeptoren in den I-LNV erhöht den Aktivitätslevel in LD und DD aber beeinflusst nicht die circadiane Rhythmik. A) GABA_BR2 Immunologische Färbung gegen GABA_BR2 ist in den I-LNV der Experimentgruppe signifikant reduziert (ANOVA $F_{1,21}=7.409, P=0.0128$), nicht jedoch in den s-LNV (ANOVA $F_{1,21}=0.2927.409, P=0.5047$). B) Fliegen mit hinunterregulierte GABABR2 Rezeptoren (RNAi) zeigen signifikant erhöhte Aktivität in LD und DD im Vergleich zu den Kontrollen. C) Repräsentative Aktogramme von Einzelfliegen der Kontroll- sowie Experimentfliegen. D) ANOVA gefolgt von Post Hoc Test offenbarte das die Periode vom Genotyp abhängig ist (ANOVA $F_{1,141}=4.597, P=0.0118$). Sie war in Kontrolle 2 signifikant verkürzt. Die Stärke des Rhythmus, als auch die Rhythmik selbst waren unabhängig vom Genotyp (ANOVA; power $F_{1,141}=2,678; P=0,0722$). Zahlen in den Säulen zeigen die Anzahl (n) der getesteten Fliegen.

19.3. GABA_B Rezeptoren sind auf den PDF Neuronen lokalisiert

Um auch histologisch zu zeigen, dass die PDF Neuronen tatsächlich GABAerge Signale empfangen können wurden zwei verschiedene Markierungen vorgenommen. In Kooperation mit dem Labor von Dick Nässel, exprimierte Agata Kołodziejczyk GFP mit einer GABA_BR2 spezifischen Treiberlinie (Root

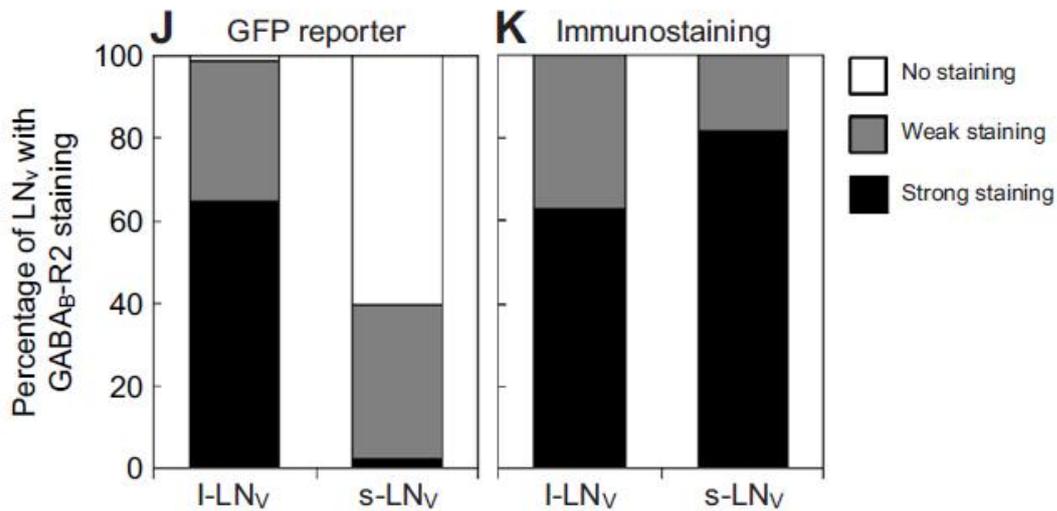
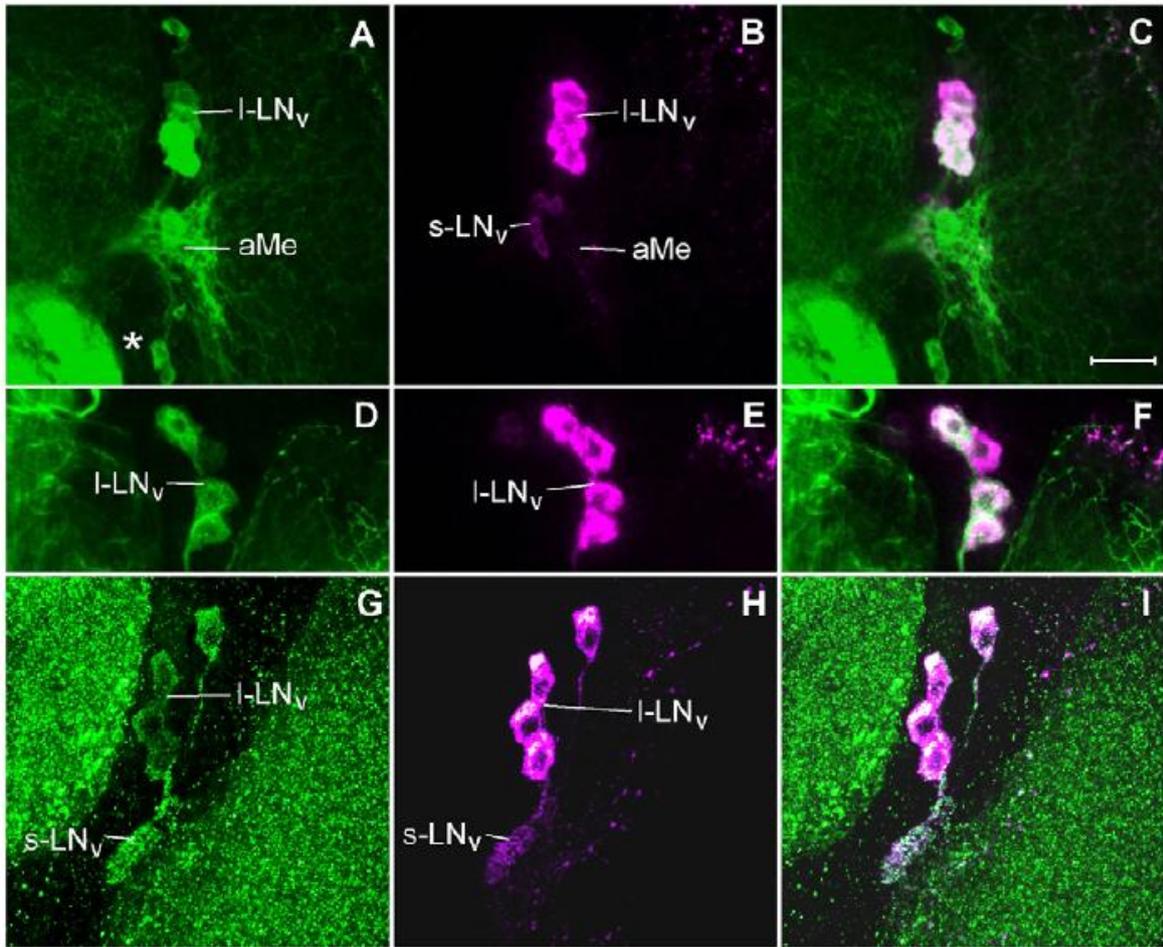


Abbildung 22 Die PDF positiven lateralen Neurone (I-LN_v und s-LN_v) exprimieren den GABA_BR2 Rezeptor

A-I) Projektionen von jeweils 10 konfokalen Ebenen der anterioren Region rechter Gehirnhemisphären. Der GABA_B Rezeptor ist grün dargestellt, PDF Neuronen magenta. Die rechte Spalte zeigt eine Überlagerung beider Färbungen. Die Vergrößerung ist in allen gleich, Größenmarker in C ist 20µm.

A-F) *GABA_BR2-GAL4; UAS-gfp*. Starke Expression in der akzessorischen Medulla (aME), in eins bis drei I-LN_v (A,D) und in einen wenigen nicht-I-LN_v Neuronen (Stern in A). Die s-LN_v sind schwach oder gar nicht markiert.

G-I) GABA_BR2 Antikörperfärbung. Sowohl s-LN_v, als auch I-LN_v zeigen eine punktuelle Färbung

J,K) Auswertung des GFP-Signals (22 Hemisphären - 85 I-LN_v/73 s-LN_v), und der Antikörperfärbung (11 Hemisphären - 43 I-LN_v/ 44 s-LN_v)

et al., 2008). Diese zeigte eine deutliche Kolo-kalisation mit den PDF-Neuronen (Abbildung 22A-F).

Eine Wiederholung und Quantifizierung des Experiments bestätigte dieses Ergebnis und zeigte zudem auf, dass der GFP-Reporter deutlich stärker in den I-LNV exprimiert wurde, als in den s-LNV (Abbildung 22J). Um dieses Ergebnis weiter zu validieren, nutzen wir ein Antiserum gegen den GABA_BR2 Rezeptor (Hamasaka *et al.*, 2005) und konnten in einer Doppelfärbung mit dem Antiserum gegen PDF die Expression des GABA_BR2 Rezeptors sowohl auf den s-LNV als auch den I-LNV feststellen (Abbildung 22G-I). Die Quantifizierung ergab eine stärkere Expression des Rezeptors auf den s-LNV (Abbildung 22K). Beide Methoden zeigten eine deutliche Expression des Rezeptors auf den I-LNV auf (GFP =98,8% / Antikörper = 100%). GFP wurde durch die GABA_BR2-Gal4 in zwei von vier I-LNV stark exprimiert, in den anderen beiden nur schwach. In den s-LNV wurden nur 39,7% der s-LNV mit GFP markiert. Auf Grund der Antikörperfärbung folgerten wir jedoch, dass der GABA_BR2 Rezeptor in allen beiden Zellgruppen exprimiert wird und lediglich die GABA_BR2-GAL4 Treiberlinie in den s-LNV weniger stark exprimiert ist.

19.4. GABA_BR2-RNAi reduziert die Expression der GABA_B-Rezeptoren in den I-LNV um 46%

Um zu überprüfen, ob die Verhaltensphänotypen auf eine Reduktion der GABA_BR2 Rezeptoren zurückzuführen sind, wurde die Intensität der GABA_B Immunfärbung in den Experimentaltieren und der Effektorkontrolle verglichen. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Intensität der Färbung der GABA_BR2 Rezeptoren in den I-LNV um 46% festgestellt werden. In den s-LNV wurde keine signifikante Reduktion der Rezeptorfärbung festgestellt (Abbildung 22A). Dies stimmt mit dem Wissen um den PDF-Gal4 Treiber überein, der in den s-LNV weniger stark exprimiert, als in den I-LNV. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Schlafphänotyp vor allem auf eine Funktion der I-LNV in der Aufrechterhaltung des Schlafes in der zweiten Hälfte der Nacht zurückzuführen ist.

20. Die Rolle des ABC Transporters WHITE in Bezug auf Schlaf

Die Mutation des WHITE Transporters beeinflusst die Menge von Dopamin, Histamin und Serotonin im Gehirn und legt eine aktive Funktion von WHITE als Transporter dieser Amine nahe (Borycz *et al.*, 2008). Da Mutanten und genetische Konstrukte in *Drosophila melanogaster* traditionell zumeist im *white* Hintergrund etabliert werden, unter anderem auch die in dieser Arbeit bisher gezeigten Stämme wie z. B. *Dat^{f^{mn}}*, *Sert^{16d}* usw., kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Phänotypen auch durch die somit zugleich vorhandene *white* Mutation verursacht oder beeinflusst werden. Im folgenden wurde die Rolle des WHITE-Transporters für das Schlafverhalten von *Drosophila melanogaster* genauer untersucht und es sollte geklärt werden, welchen Einfluss der *white* Hintergrund auf die durch Dopamin und Serotonin verursachten Phänotypen hat.

20.1. Untersuchung einer spontanen *white* Mutation

Aus dem Labor von Prof. Dr. Bernhard Possidente erhielten wir zwei Stämme, die einem Ursprungsstamm (*roo²²*) entspringen, in dem sich eine spontane Mutation im *white* Gen ereignet hat.

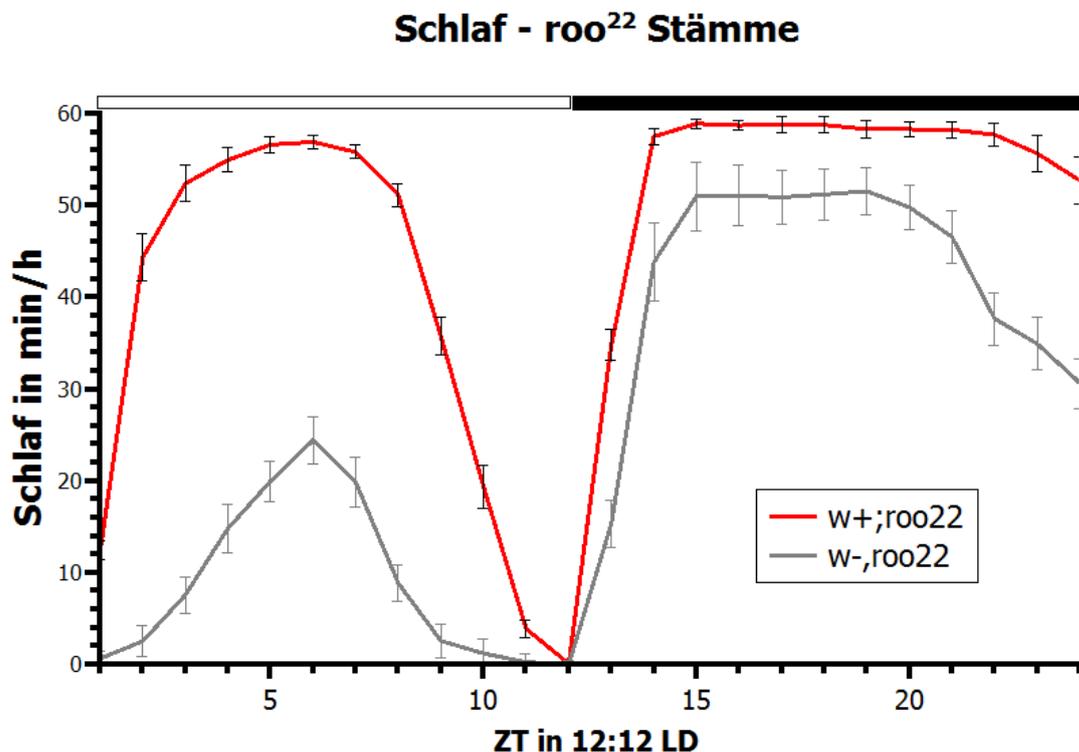


Abbildung 23 Schlaf pro Stunde des roo²² Stammes und der spontanen *white* Mutation in selbigem

Rotäugige *w⁺;roo²²* Fliegen (n=31) zeigen eine normal hohe Schlafmenge über den Tagesverlauf. Die weißäugigen Fliegen *w⁻;roo²²* (n=31) hingegen zeigen eine drastisch reduzierte Schlafmenge, sowohl am Tag als auch in der Nacht. Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

Somit haben wir zwei möglichst vergleichbare Stämme, was den genetischen Hintergrund betrifft, die sich vornehmlich in der Mutation des *white* Gens unterscheiden. Die Untersuchung des Schlafverhaltens zeigte deutliche Unterschiede. Die weißäugigen Fliegen schliefen mit 10,6 Stunden (635 Minuten) nur 56% der Schlafmenge der rotäugigen Fliegen mit 18,9 Stunden (1131 Minuten). Die geringe Gesamtschlafmenge kommt unter anderem durch eine stark reduzierte Dauer der einzelnen Schlafabschnitte zusammen, die für die rotäugigen Fliegen im Schnitt 109 Minuten dauerten, für die weißäugigen hingegen nur 46 Minuten. Zudem zeigten nur 74,19% der weißäugigen Fliegen ein rhythmisches Verhalten in Dauerdunkel, wohingegen 100% der rotäugigen Fliegen rhythmisch waren ($p=0,0021$ Chi Square). Die Periode der weißäugigen Fliegen war mit $23,52 \pm 0,13$ Stunden signifikant verkürzt gegenüber den $24,16 \pm 0,12$ Stunden der rotäugigen Fliegen ($p=0,000$ ANOVA).

20.2. Das Schlafverhalten von *brown* und *scarlet* Mutanten

WHITE bildet zwei Arten von Heterodimeren aus, eines mit BROWN eines mit SCARLET. Deshalb wurde untersucht, inwieweit Mutationen dieser beiden Bindungspartner einen Einfluss auf das

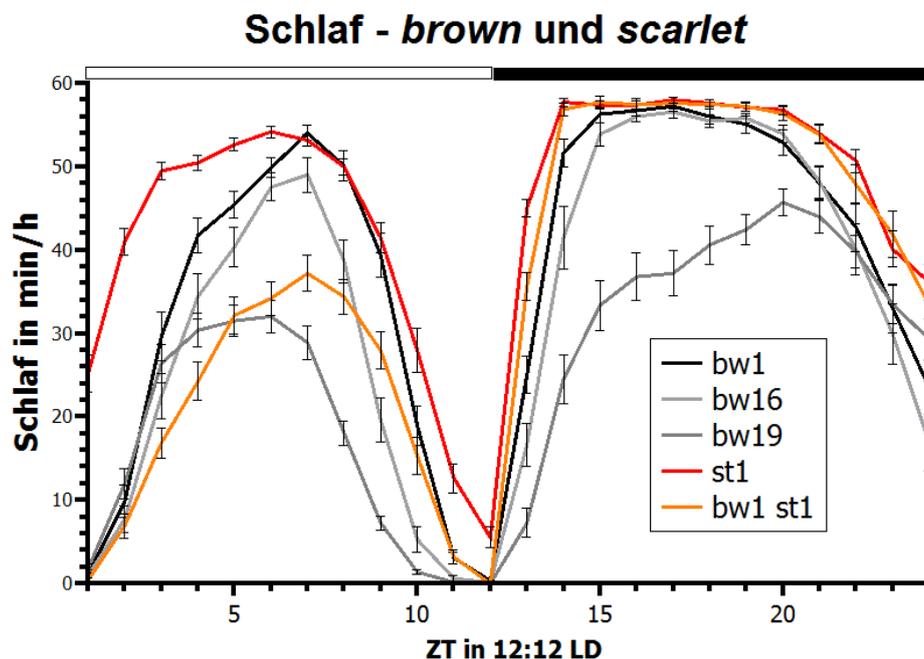


Abbildung 24 Schlaf pro Stunde von *brown* und *scarlet* Mutanten

Die *brown* Mutanten bw^1 ($n=23$), bw^{16} ($n=30$) und bw^{19} ($n=30$) zeigen weniger Schlaf als $scarlet^1$ ($n=23$), wobei bw^{19} ($n=30$) die stärkste Reduzierung aufweist. Die Doppelmutante bw^1st^1 ($n=32$) zeigt eine Verschiebung der Schlafzeiten in die Dunkelphase hinein. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

Schlafverhalten haben. Es zeigte sich, dass sich *scarlet* mit 18,7 Stunden (1120 Minuten) Gesamtschlaf nicht von den rotäugigen $w^+;roo^{22}$ Fliegen unterschied. Jedoch zeigten die *brown* Mutanten bw^1, bw^{16} und bw^{19} eine verringerte Gesamtschlafmenge. Die Mutation *scarlet*, die für sich genommen keinen Effekt auf das Schlafverhalten ausübt, verändert jedoch die Verteilung des Schlafes der bw^1 Mutante im Licht Dunkel Zyklus, wenn man sie miteinander kombiniert. Der Gesamtschlaf von bw^1 und $bw^1 st^1$

unterscheidet sich nicht, jedoch ist an den Schlafkurven deutlich, zu erkennen, das die Doppelmutante am Tag weniger schläft und dies in der Dunkelphase kompensiert. Auch die verschiedenen *brown* Mutanten zeigen eine unterschiedliche Schlafmenge, wobei bw^{19} mit 10,5 Stunden (627 Minuten) am wenigsten schlief, vergleichbar mit den weißäugigen $w;roo^{22}$ Fliegen (Abbildung 25). In Bezug auf die Rhythmik zeigten sich alle *brown* Mutanten mit über 95% rhythmisch, dies war signifikant mehr als die *scarlet* Fliegen mit nur 80% ($p=0,01$ Chi Square). Bei der Analyse der Periode ergab sich kein einheitliches Bild, so unterschieden sich bw^{19} und st^1 mit 23,7h bzw. 23,6h nicht voneinander. Jedoch unterschied sich bw^{16} mit 24,4h signifikant von allen anderen Stämmen außer der Doppelmutante $bw^1 st^1$ mit 24,5h, wohingegen bw^{19} und bw^1 nicht voneinander

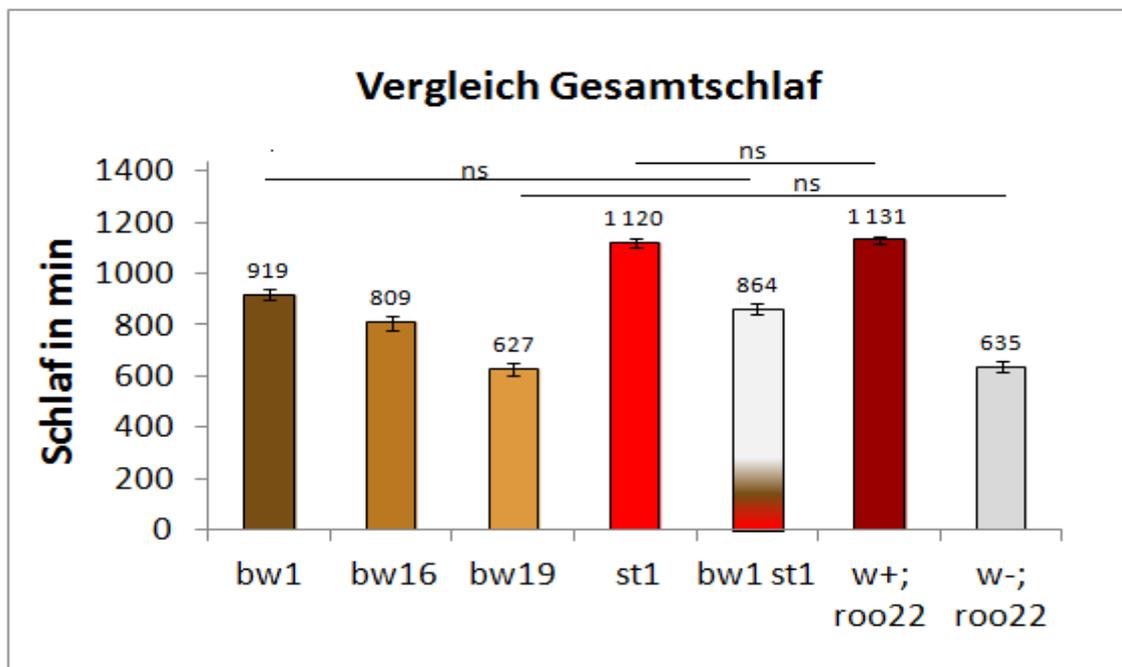


Abbildung 25 Vergleich der Gesamtschlafmenge der *brown* und *scarlet* als auch *roo* Stämme

Alle drei *brown* Mutanten zeigen signifikant weniger Schlaf als *scarlett* bzw. die rotäugige $w^+;roo^{22}$ Linie. Die Schlafmengen von $w^+;roo^{22}$ ist vergleichbar zu der von *scarlett*, $w;roo^{22}$ hingegen vergleichbar zu bw^{19} . Nicht signifikant voneinander abweichende Werte wurden mit ns gekennzeichnet. Der Unterschied zwischen bw^1 und bw^{16} ist signifikant, alle weiteren Vergleiche hochsignifikant. Indikatoren zeigen den Standardfehler an.

unterscheidbar waren, *scarlet* zu *bw¹* hingegen gerade noch signifikant unterschiedlich war ($p=0,046$ ANOVA).

21. Der Einfluss des *white* Gens und auf das Schlafverhalten der Amintransportermutanten

Auf Grund der Effekte der *white* Mutation in den *roo²²* Stämmen, als auch dem Hinweis auf eine mögliche Rolle des WHITE/BROWN-Dimers bei der Schlafregulation wurden sowohl bei der Dopamintransportermutante *Dat^{fmn}*, als auch der Serotonintransportermutante *Sert^{16d}*, welche beide im *w¹¹¹⁸* Hintergrund etabliert wurden, das X-Chromosom gegen das des Stammes *CantonS* getauscht, um beide Mutanten mit und ohne intaktem WHITE-Transporter zu vergleichen und eine mögliche Rolle von WHITE beim Amintransport zu untersuchen.

21.1. Das Schlafverhalten von *Dat^{fmn}* in Abhängigkeit von *white*

Beim Vergleich der Dopamintransportermutante *Dat^{fmn}* im ursprünglichen *w¹¹¹⁸* Hintergrund im Vergleich zu der *Dat^{fmn}* Mutante mit dem X-Chromosom Wildtypstammes *CantonS* mit intaktem

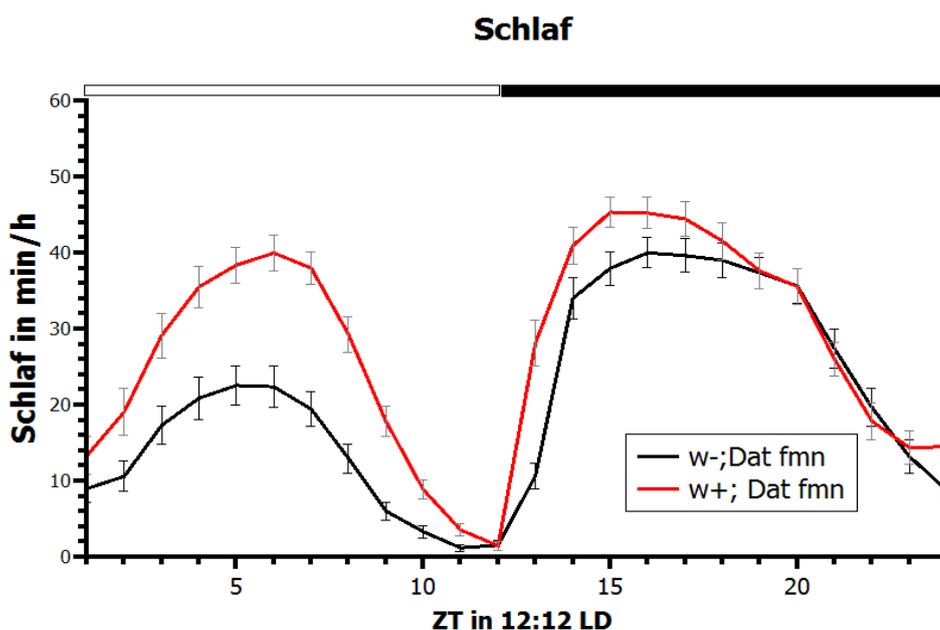


Abbildung 26 Schlaf pro Stunde von *w⁻;Dat^{fmn}* und *w⁺;Dat^{fmn}*

Die *w⁻;Dat^{fmn}* ($n=30$), weniger Schlaf als *w⁺;Dat^{fmn}* ($n=31$). Der Unterschied ist tagsüber deutlicher als "Nachts". Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

white Gen fällt bereits bei den Schlafkurven auf, dass die Fliegen mit intaktem *white* Gen sowohl am Tag als auch in der Nacht mehr schlafen als die Fliegen im w^{1118} -Hintergrund. Beide Stämme zeigen eine sehr geringe Schlafmenge. Die w^+ ; Dat^{fmn} hatten eine Gesamtschlafmenge von 11,5 Stunden (692 Minuten) und waren damit signifikant weniger stark reduziert als der Vergleichsstamm w^- ; Dat^{fmn} , für den in diesem Experiment ein Gesamtschlaf von 8,6 Stunden (518 Minuten) gemessen wurde.

21.2. Das Schlafverhalten von $Sert^{d16}$ in Abhängigkeit von *white*

Im Falle der Serotonintransportermutante $Sert^{16d}$ wurde der Kontrolle $Sert^{4d}$ auf die selbe Weise das X-Chromosom gegen das von *CantonS* getauscht, wie für die Transportermutante auch. Während der Nacht konnten keine Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden, die Schlafmenge ist

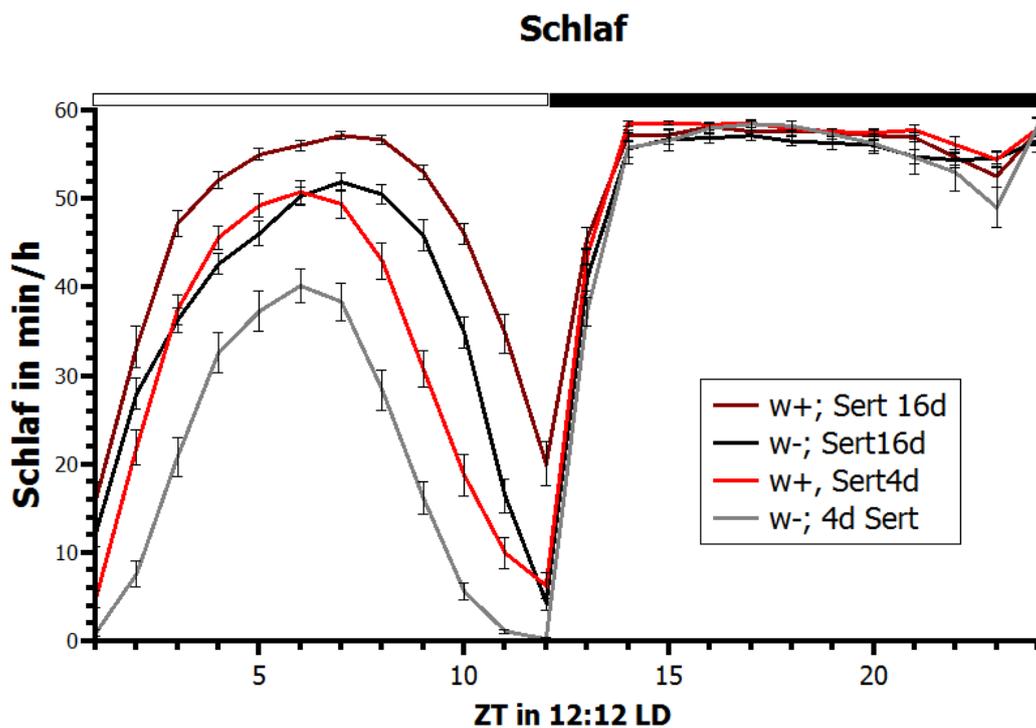


Abbildung 27 Schlaf pro Stunde von w^- ; $Sert^{16d}$ / w^+ ; $Sert^{16d}$ / w^- ; $Sert^{4d}$ und w^+ ; $Sert^{4d}$

Das Auswechseln des X-Chromosoms von w^{1118} nach *CantonS* bewirkt sowohl bei der Serotonintransportermutante, als auch bei der Kontrolle eine Steigerung der Schlafmenge. Auf Grund der hohen Schlafmenge in der Nacht kann diese Erhöhung nur am Tag beobachtet werden. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

allgemein hoch. Während des Tages zeigt die Serotonintransportermutante *Sert*^{16d} sowohl im *w*¹¹¹⁸, als auch im *CantonS* Hintergrund (bezogen auf das X-Chromosom) eine deutlich höhere Schlafmenge als die Kontrolle im selben Hintergrund. Zudem ist auffällig, dass sowohl die Mutante, als auch die Kontrolle im *CantonS* Hintergrund eine erhöhte Schlafmenge während des Tages aufweisen. In beiden Fällen wirkt sich das Einkreuzen des X-Chromosoms mit intaktem *white* Gen, wie bereits im Falle der Dopamintransportermutante *Dat*^{fmn}, schlafsteigernd aus (Abbildung 26 und Abbildung 27). Die statistische Untersuchung der Gesamtschlafmenge ergab, dass sich *w*⁺;*Sert*^{16d} mit 20,2 Stunden (1214 Minuten) Gesamtschlaf signifikant (p=0,000) von allen anderen unterscheidet, *w*⁻;*Sert*^{16d} mit 1006 Minuten sich zwar signifikant von *w*⁻;*Sert*^{4d} mit 889 Minuten (p=0,0000), nicht jedoch von *w*⁺;*Sert*^{4d} mit 16,8 Stunden (1063 Minuten) (p=0,702) unterscheidet.

21.3. Rekombination von *Dat*^{fmn} und *Sert*^{16d}

Um mehr Einblick in die Interaktion der drei Transporter (Dopamintransporter DAT, Serotonintransporter SERT und WHITE) zu bekommen wurde eine Rekombinante der Mutante *Dat*^{fmn} und *Sert*^{16d} hergestellt, da diese beide auf dem zweiten Chromosom liegen. Die erfolgreiche Rekombination wurde mit Hilfe einer PCR nachgewiesen (Abbildung 28). Für das Balancieren der

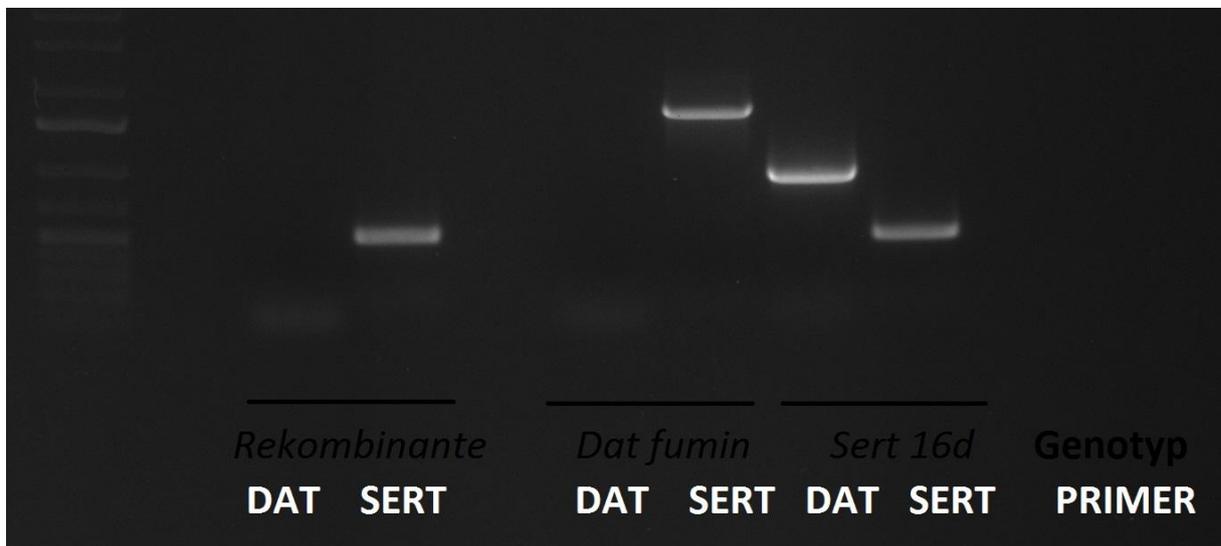


Abbildung 28 PCR Nachweis der erfolgreichen Rekombination von *Dat*^{fmn} und *Sert*^{16d}

Da *Dat*^{fmn} über ein wildtypisches Serotonintransportergen und *Sert*^{16d} über ein wildtypisches Dopamintransportergen verfügt, wurden beide Stämme verwendet, um als wildtypische Kontrolle für den jeweils nicht mutierten Transporter zu dienen. Die Rekombinante zeigt sowohl das durch Deletion verkürzte Serotonintransportergen wie die *Sert*^{16d} Mutante, als auch den auf Grund der Insertion von 2kb eines *roo*-Transposons nicht mehr nachweisbaren Dopamintransporter *Dat*^{fmn}. Die *Sert*^{16d}-Linie zeigt hingegen eine Bande für den Dopamintransporter ohne Insertion.

Rekombinante wurde ein "Balancerstamm" im *CantonS* Hintergrund benutzt. Da die balancierten Weibchen somit X-chromosomal heterozygot waren (w^{1118} aus den Transportermutantenlinien und *CantonS* aus dem Balancer) konnten aus dem Stamm die rotäugigen von den weißäugigen Nachfahren separiert und sowohl eine w^+ , als auch w^- Linie der selben Rekombinante etabliert werden um einen möglichst vergleichbaren genetischen Hintergrund zu erhalten.

Bei der Messung des Schlafverhaltens erwies sich die Dreifachmutante $w^-;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$ insofern als problematisch, als dass sie sich dieser Stamm durch eine hohe Sterberate, geringe Nachkommenzahl und kurze Lebensdauer auszeichnet. Dadurch konnten von $w^-;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$ im Rahmen dieser Arbeit keine verlässlichen Werte ermittelt werden. Im Gegensatz dazu hatten $w^+;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$ Dreifachmutanten keine ungewöhnliche hohe Sterberate während der Messung des Schlafverhaltens. Die ermittelte Gesamtschlafmenge war mit 11,9 Stunden (713 +/-53 Minuten) vergleichbar mit $w^+;Dat^{fmn}$ mit 11,8 Stunden (707 +/- 40 Minuten).

21.4. UPLC Messung von Dopamin, Serotonin, β -Alanyldopamin und -serotonin in Köpfen

Die vorangegangenen Verhaltensversuche haben gezeigt, dass *white* das Schlafverhalten beeinflusst. Da, wie bereits erwähnt, in einer anderen Studie gezeigt wurde, dass *white* ebenso den Dopamingehalt und Serotoningehalt von *Drosophila melanogaster* beeinflusst, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Krischke vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg, mit Hilfe einer UPLC der Gehalt von Dopamin, Serotonin, β -Alanyldopamin und β -Alanylserotonin in Köpfen von *Drosophila melanogaster* gemessen, um zu sehen, ob *white* als potentieller Transporter eines der beiden Amine diesen beeinflusst und die gefunden Schlafphänotypen damit korreliert werden können. Für Dopamin ist bekannt, dass es einen Transportweg über die Gliazellen als β -Alanyldopamin gibt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch andere Amine in Gliazellen alanyliert werden können, wurde ebenso β -Alanylserotonin gemessen. Für die Messung wurden die Stämme $w^+;Dat^{fmn}$ - $w^-;Dat^{fmn}$ - $w^+;Sert^{16d}$ - $w^-;Sert^{16d}$ - $w^+;Sert^{4d}$ - $w^-;Sert^{4d}$ - $w^+;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$ - $w^-;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$, sowie *CantonS* und w^{1118} ausgewählt.

Für alle getesteten Genotypen konnte der Gehalt an Dopamin, β -Alanyldopamin und Serotonin bestimmt werden (Abbildung 29). β -Alanylserotonin konnte in keinem der Genotypen nachgewiesen werden. Beim statistischen Vergleich aller Genotypen bezüglich des Dopamingehalts konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. β -Alanyldopamin hingegen ist in allen rotäugigen

Genotypen mit Ausnahme von $w^+;Sert^{16d}$ signifikant erhöht. Dies ist besonders interessant, da auch der Gesamtschlaf bei den rotäugigen Genotypen im Vergleich zu ihren weißäugigen Pendanten signifikant erhöht ist (Kapitel 21.1 und 21.2). Bei der Messung der Serotoninmenge unterschied sich lediglich *CantonS* signifikant von allen anderen Stämmen. Interessant ist auch, dass der Stamm $w^+;Dat^{fmn}, Sert^{16d}$ den niedrigsten Serotoninwert hat, was eine Ursache für die hohe Sterberate sein könnte (Abbildung 29, S. 57).

Mit Hilfe einer 2-Wege ANOVA konnte gezeigt werden, dass der Serotoningehalt vom *white* Hintergrund abhängig ist ($F=11.874$; $p=0,001$), ebenso der β -Alanyldopamingehalt ($F=81.944$; $p=0,000$), wohingegen der Dopamingehalt nicht signifikant vom *white*-Hintergrund beeinflusst wird ($F=3,161$; $p=0,079$).

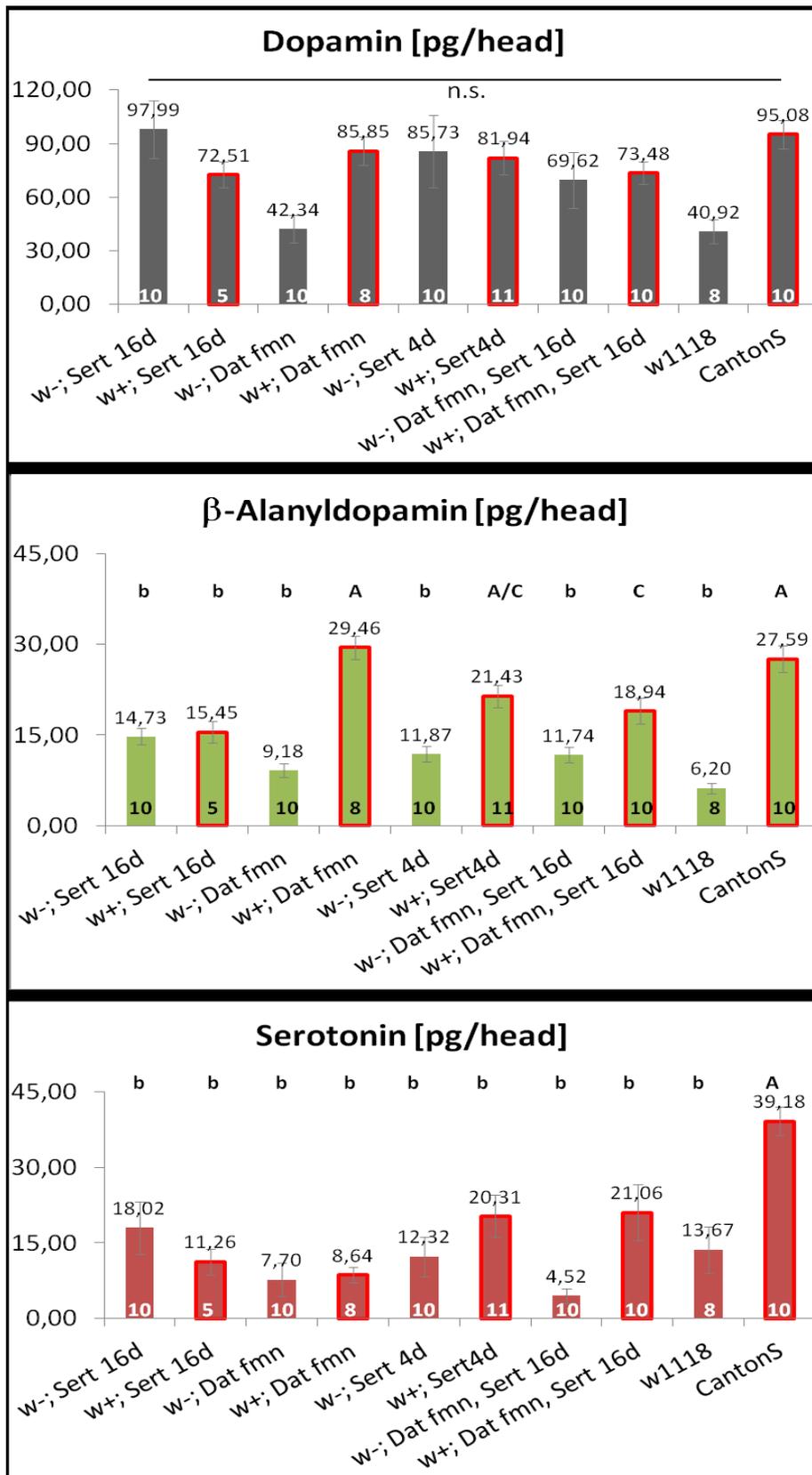


Abbildung 29 UPLC Messung Dopamin, β-Alanyldopamin und Serotonin in Köpfen

Die Genotypen mit intaktem WHITE Transporter sind mit rotem Rand hervorgehoben. Gruppen, die sich nicht signifikant unterscheiden, wurden mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet. Die Zahlen in den Balken entsprechen der Probenmenge. Jede Probe besteht aus 20 Köpfen. Dopamin zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei β-Alanyldopamin zeigt sich, dass die w⁺-Genotypen mit Ausnahme von w⁺;Sert^{16d} eine signifikante Erhöhung der β-Alanyldopaminmenge im Vergleich zu ihren w⁻-Pendants zeigen. Serotonin ist nur in CantonS signifikant erhöht. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

22. Der Einfluss von *ebony* auf das Schlafverhalten

Die β -Alanylgruppe wird durch EBONY, ein für Gliazellen spezifisches Protein, an Dopamin angefügt. Somit stellt sich sowohl die Frage, welchen Einfluss *ebony* selbst auf das Schlafverhalten hat, als auch die Frage nach der Rolle der Gliazellen in Bezug auf die Schlafregulation. Deshalb wurde sowohl *ebony*¹ im *w*¹¹¹⁸, als auch *CantonS* Hintergrund getestet und sowohl die Dopamintransportermutante *Dat*^{fmn}, als auch die Serotonintransportermutante *Sert*^{16d} mit der *ebony*¹ Mutation kombiniert.

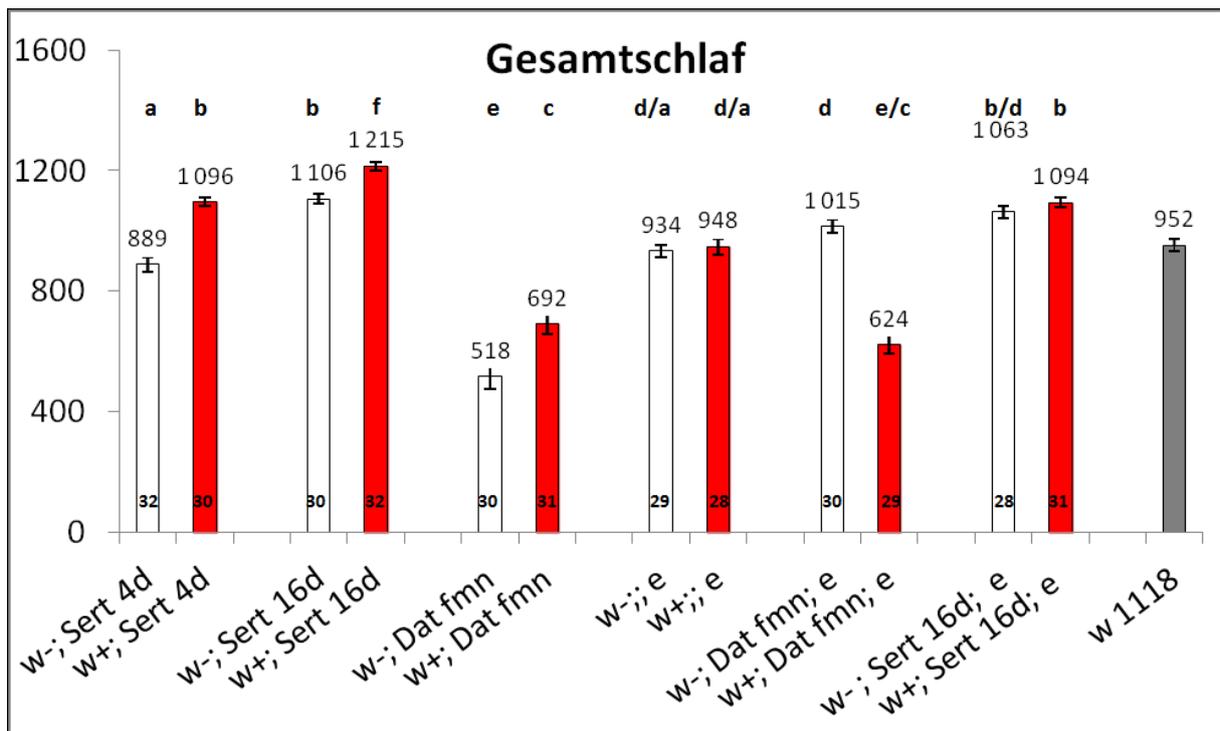


Abbildung 30 Übersicht Gesamtschlaf der Kombinationen aus *white/Dat*^{fmn}/*Sert*^{16d}/*Sert*^{4d} und *ebony*¹

Gruppen, die sich nicht signifikant unterscheiden, wurden mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet. Genotypen mit intaktem White Transporter wurden rot gekennzeichnet. Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an. *w*¹¹¹⁸ wurde als Orientierung miteingefügt, jedoch im statistischen Vergleich nicht miteinbezogen und ist deshalb grau gefärbt. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an.

In Abbildung 30 sind sowohl der Gesamtschlaf der in Kapitel 21.1 und 21.2 getesteten Genotypen, als auch die mit *ebony*¹ kombinierten Stämme dargestellt. Zur Orientierung wurde *w*¹¹¹⁸ mit dargestellt, allerdings im statistischen Vergleich nicht berücksichtigt. Die *ebony* Mutante wird durch den Austausch des X-Chromosoms nicht beeinflusst, auch die Serotonintransportermutante zeigt in Kombination mit *ebony*¹ keine Änderung des Gesamtschlafes. Einen massiven Einfluss zeigt *ebony* auf das Verhalten der *Dat*^{fmn} Mutante. Im Fall der Dreifachmutante *w*⁻;*Dat*^{fmn};*e*¹ heben sich die Effekte gegenseitig auf und sie zeigt im Gegensatz zu *w*⁻;*Dat*^{fmn} keine verringerte Gesamtschlafmenge. Der Gesamtschlaf von *w*⁺;*Dat*^{fmn};*e*¹ unterscheidet sich nicht von den *Dat*^{fmn} Stämmen ohne *ebony* (*w*⁺;*Dat*^{fmn} und *w*⁻;*Dat*^{fmn}) und schläft somit weniger als *w*⁻;*Dat*^{fmn};*e*¹. Im Gegensatz zu den zuvor

besprochenen Stämmen bewirkt das Vorhandensein des WHITE-Transporters in diesem Fall somit keine Zunahme der Schlafmenge im Vergleich zu dem ansonsten identischen Genotyp. Ein Blick auf die Aktogramme zeigt einen bemerkenswerten Unterschied zwischen $w^-;Dat^{fmn};e^1$ und $w^+;Dat^{fmn};e^1$ in Bezug auf die Verteilung der Aktivität (Abbildung 31).

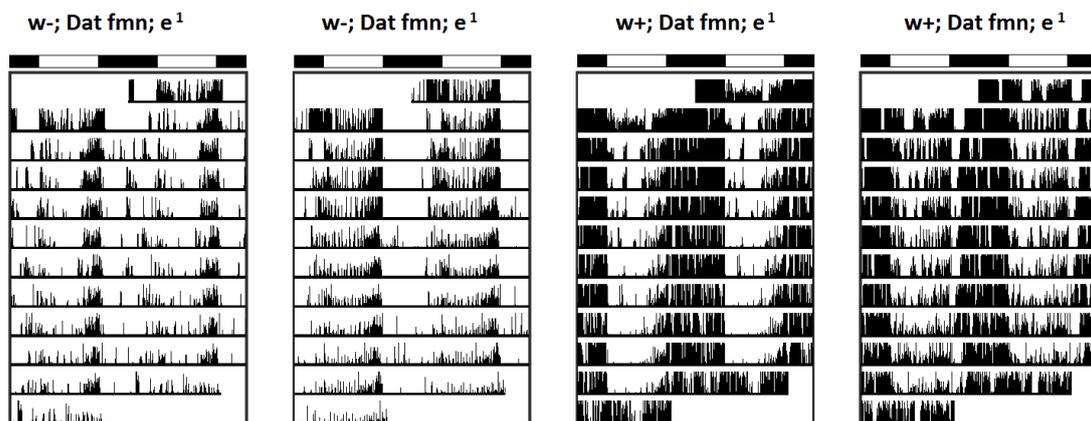


Abbildung 31 Aktogramme von $w^-;Dat^{fmn};e^1$ und $w^+;Dat^{fmn};e^1$

In den Aktogrammen ist deutlich zu sehen, dass $w^+;Dat^{fmn};e^1$ aktiver ist als $w^-;Dat^{fmn};e^1$. Besonders bemerkenswert ist, dass diese Aktivität in die Nacht verschoben wird.

In den Schlafkurven spiegelt sich der Effekt der im Aktogramm zu beobachten war. Während der Nacht ist ein dramatischer Abfall der Schlafmenge in $w^+;Dat^{fmn};e^1$ zu beobachten (Abbildung 32).

Die Aktogramme und Schlafkurven der anderen Genotypen zeigten keine besonderen Auffälligkeiten.

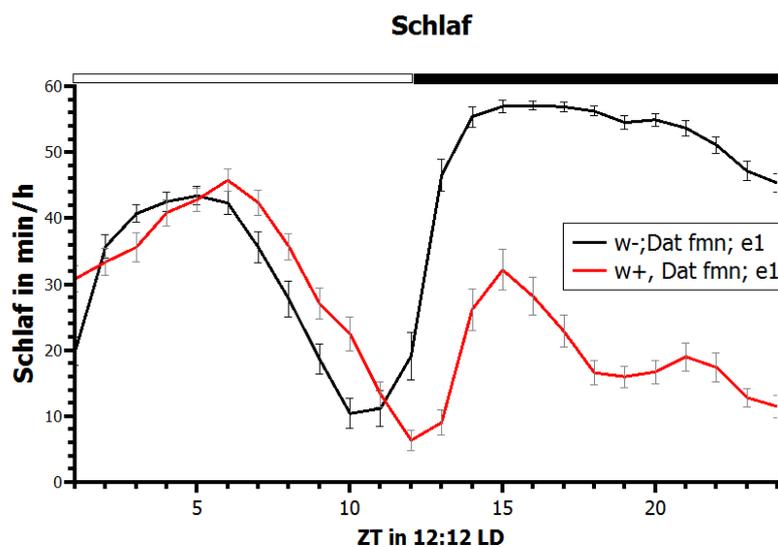


Abbildung 32 Schlafkurven von $w^-;Dat^{fmn};e^1$ und $w^+;Dat^{fmn};e^1$

Die $w^-;Dat^{fmn};e^1$ (n=30), weniger Schlaf als $w^+;Dat^{fmn};e^1$ (n=29). Die Nachtaktivität basiert auf einer starken Reduktion des Schlafes während der Dunkelphase. Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

23. Die Bedeutung der Gliazellen bei der Schlafregulation

Da *white* einen deutlichen Einfluss auf das Schlafverhalten gezeigt hat, der mit dem in Gliazellen durch *ebony* produziertem β -Alanyldopamin korreliert, wurde im Folgenden die Rolle von *white* in Gliazellen in Bezug auf das Schlafverhalten genauer untersucht. Hierzu wurde eine *UAS-white* Linie exprimiert, sowohl mit *repo-Gal4*, der in allen Gliazellen von *Drosophila melanogaster* exprimiert (Sepp *et al.*, 2001), als auch mit *NP3233-Gal4*, der nur in astrocytenähnlichen Gliazellen exprimiert (Awasaki *et al.*, 2008). Beide wurden zuvor das X-Chromosom von *w¹¹¹⁸* eingekreuzt. Die *UAS*-Linie befand sich bereits im *w¹¹¹⁸* Hintergrund. Die Expression von *UAS-white* in Gliazellen (sowohl *repo-Gal4*, als auch *NP3233-Gal4*) ergab keine signifikanten Effekte bezüglich des Schlafverhaltens. Ebenso wurde sowohl die Periode die knapp unter 24 Stunden lag (23,8h bzw. 23,9h), als auch die allgemein

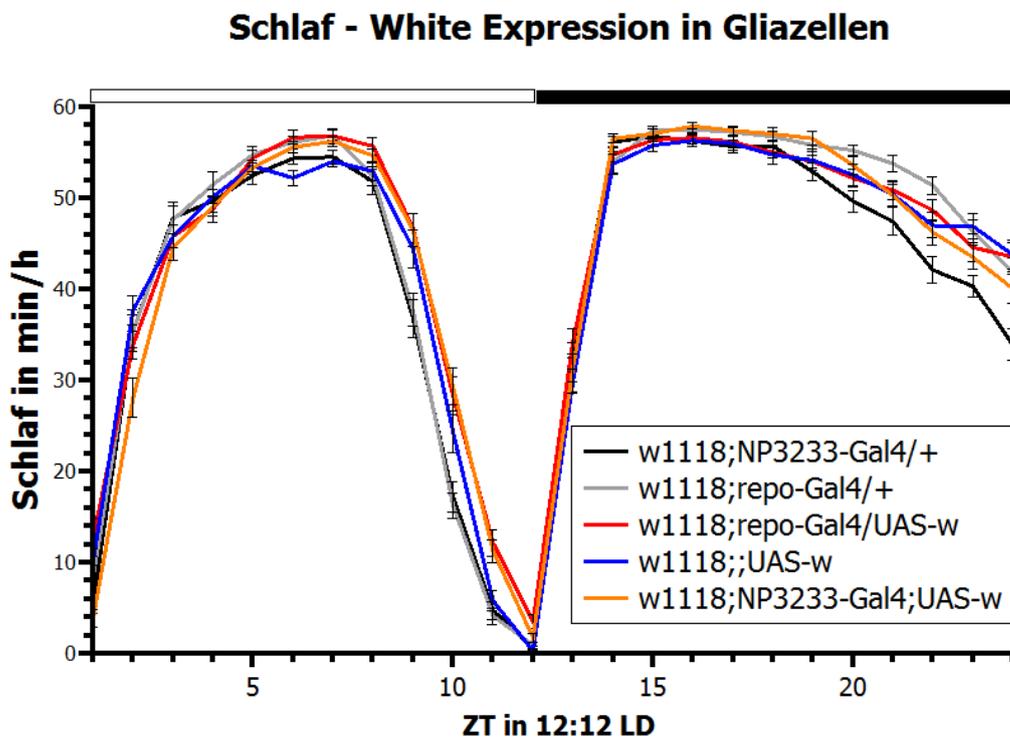


Abbildung 33 Schlafkurven von der Expression von *UAS-white* in Gliazellen

Bei der Expression von *UAS-white* in Gliazellen durch sowohl *repo-Gal4* als auch *NP3233-Gal4* konnte kein Effekt gefunden werden. Die Anzahl der Versuchstiere in der Reihenfolge der Legende von oben beginnend mit *w1118;NP3233-Gal4/+* nach unten ($n=26/n=31/n=32/n=32/n=32$). Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

hohe Rhythmik (94-100%) nicht beeinflusst. Allerdings ist zu bedenken, dass sowohl die *GAL4*, als auch das *UAS*-Konstrukt je eine *mini-white* Sequenz enthalten. Diese ist möglicherweise ausreichend um das Fehlen eines endogenen *white* zu kompensieren, so dass weitere Expression zu keinen zusätzlichen Effekten führt.

24. Ektopische Variation der *white* Expression in dopaminergen Neuronen

Die erhöhten β -Alanyldopaminwerte bei Expression von endogenem *white* sind ein deutlicher Hinweis auf eine Funktion des White Transporters bei der Aufnahme von Dopamin in die Gliazellen. Dennoch wurde bei Expression von *white* in den Gliazellen kein Effekt gefunden. Es kann nicht

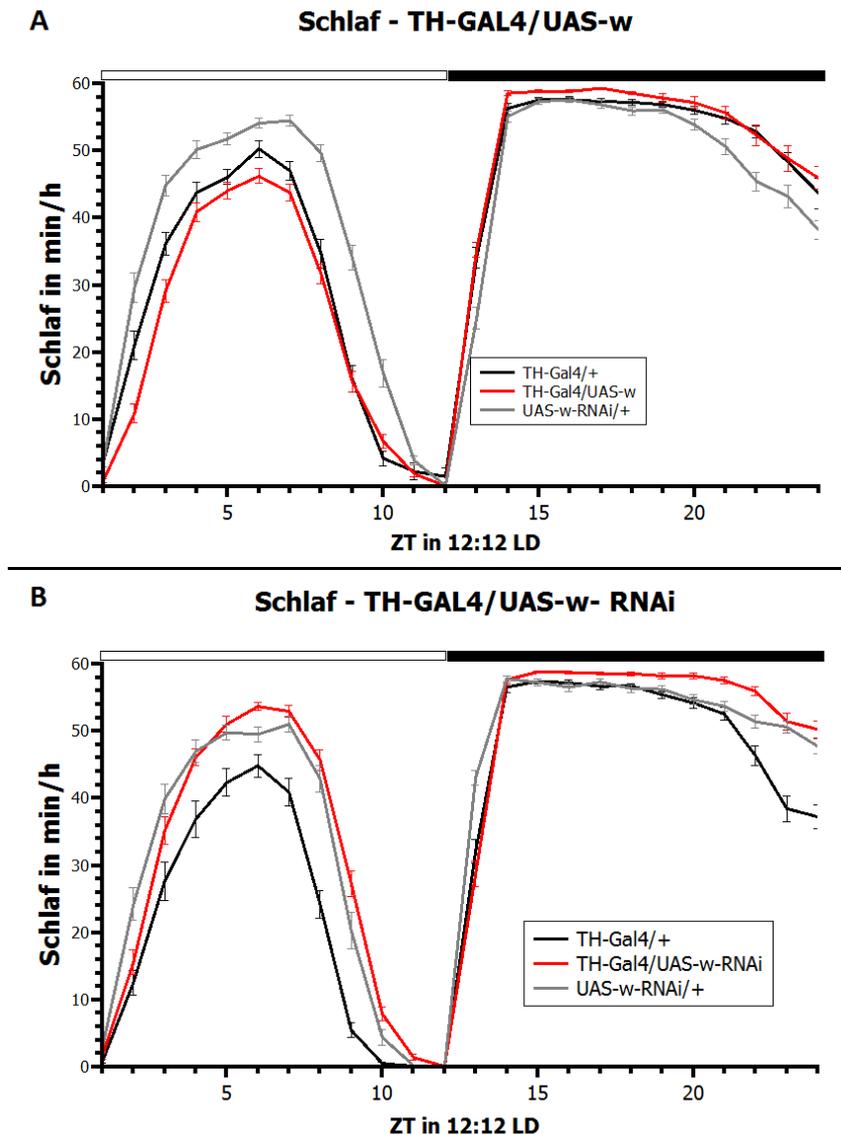


Abbildung 34 Schlafkurven von der Expression von *UAS-white* und *UAS-white-RNAi* in dopaminergen Neuronen

A Zwischen dem Schlaf der Treiberkontrolle *TH-Gal4/+* (n=31), der Effektorkontrolle *UAS-white/+* (n=31) und der Expression von *white* in den dopaminergen Neuronen *TH-Gal4/UAS-w* (n=32) konnte kein signifikanter Unterschied im Schlaf festgestellt werden

B Auch bei der Hinunterregulierung einer potentiellen endogenen Expression von *white* in den dopaminergen Neuronen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Schlaf der Treiberkontrolle *TH-Gal4/+* (n=31), der Effektorkontrolle *UAS-white-RNAi/+* (n=32) und der Expression von *white-RNAi* in den dopaminergen Neuronen *TH-Gal4/UAS-w* (n=32) konnte keine signifikanter Unterschied im Schlaf festgestellt werden

Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an.

ausgeschlossen werden, dass *white* indirekt auf die Menge an β -Alanyldopamin wirkt, zum Beispiel durch einen direkten Rücktransport von Dopamin aus dem synaptischen Bereich in die dopaminergen Neurone. Dies würde eine verringerte Aufnahme und somit Anhäufung von Alanyldopamin aus den Gliazellen bewirken, solange ausreichend Dopamin im dopaminergen Neuron vorhanden ist. Es wurde sowohl *UAS-white* als auch *white-RNAi* mit der *TH-Gal4* Treiberlinie exprimiert, die in fast allen dopaminergen Klustern bis auf das PAM Cluster exprimiert. Wie aus Abbildung 34 ersichtlich ist, zeigt die sowohl Expression von *UAS-white*, als auch *UAS-white-RNAi* kleinere Abweichungen von den Kontrollstämmen, allerdings erwiesen sich die Unterschiede im Gesamtschlaf bei der statistischen Überprüfung als nicht signifikant.

25. Expression der *UAS-white-RNAi* mit *GMR-Gal4*

Da die Expression der *UAS-w-RNAi* keinen Effekt verursacht hatte, wurde die generelle Funktionalität



Abbildung 35 Expression der *UAS-white-RNAi* mit *GMR-Gal4*

Die RNAi-Linie für *white* erweist sich als funktional und führt zu einer deutlichen optischen Reduktion der Expression der Augenpigmente.

der RNAi-Linie bezüglich der Suppression der WHITE Expression überprüft. Dazu wurde die *UAS-White-RNAi* mit *GMR-Gal4*, in den Komplexaugen exprimiert. Wie Abbildung 35 zeigt, erwies sich die *UAS-w-RNAi*-Linie als funktional und unterdrückt die Expression von WHITE in den Komplexaugen.

26. Circadiane Phänotypen der verschiedenen Kombinationen von Transportermutanten

Da die Kombination der Mutation des WHITE-Transporters mit den Mutationen für die Wiederaufnahmetransporter von Dopamin und Serotonin deutliche Effekte auf den Schlaf gezeigt haben, interessierte mich ob es auch weitere Phänotypen auf das Aktivitätsverhalten gibt. Da Schlaf zwar durch das circadiane System reguliert wird, aber an sich kein circadianer Phänotyp ist, testete ich einige der verwendeten Stämme auch in unterschiedlichen Tageslängen und bestimmte die Lage der Aktivitätsmaxima.

Dafür wurden die Aktivität der Stämme $w^+; Sert^{4d} / w^-$; $Sert^{4d} / w^+$; $Sert^{16d} / w^-$; $Sert^{16d} / w^+$; Dat^{fnn} / w^- ; Dat^{fnn} / w^+ bei 100lux in 24-Stunden-Tage mit folgenden Licht/Dunkel Zyklen aufgenommen: 4L:20D - 8L:16D - 12L:12D - 16D:8L - 20L:8D. Für die mittleren drei Tageslängen wurde zusätzlich w^{1118} aufgezeichnet. Die Durchschnittstage sind in Abbildung 36 dargestellt.

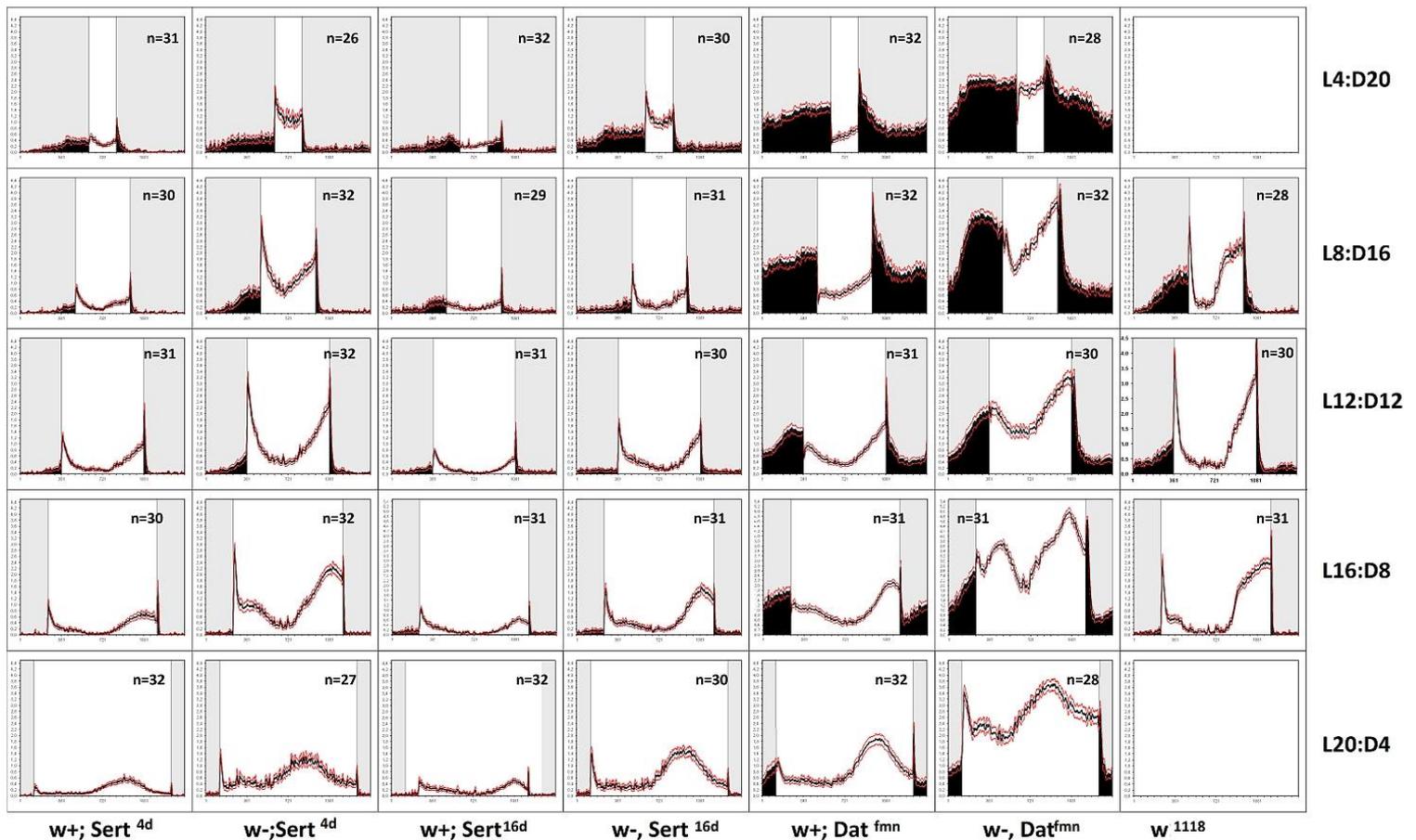


Abbildung 36 Durchschnittstage der Kombinationen aus Transportermutanten in unterschiedlichen Tageslängen

Die Aktivität ist als Durchschnittstag dargestellt. Für die Lichtregime abweichend von 12:12 wurden jeweils die Tage 4-10 für die Auswertung benutzt. Die roten Linien geben den Standardfehler an. Die Dunkelphase ist über der Aktivitätslinie in Grau darunter in schwarz hervorgehoben. Das Lichtregime ist der Legende rechts zu entnehmen, der Genotyp einer Spalte steht unten, die Anzahl der Versuchstiere ist im Graph angegeben. Es sind deutliche Unterschiede der Aktivitätsmaxima eines Genotyps in Abhängigkeit des white Genotyps erkennbar. Dies ist in den Lichtregimen L8:D16 und L20:D4 besonders deutlich.

Insbesondere bei den beiden Transportermutanten *Sert*^{16d} und *Dat*^{fmn} wird der Einfluss von *white* sichtbar, vor allem unter Langtagbedingungen. Um eine genauere Aussage machen zu können, wurden die Maxima der Aktivitätsmaxima morgens und abends bestimmt. Dies erwies sich bei

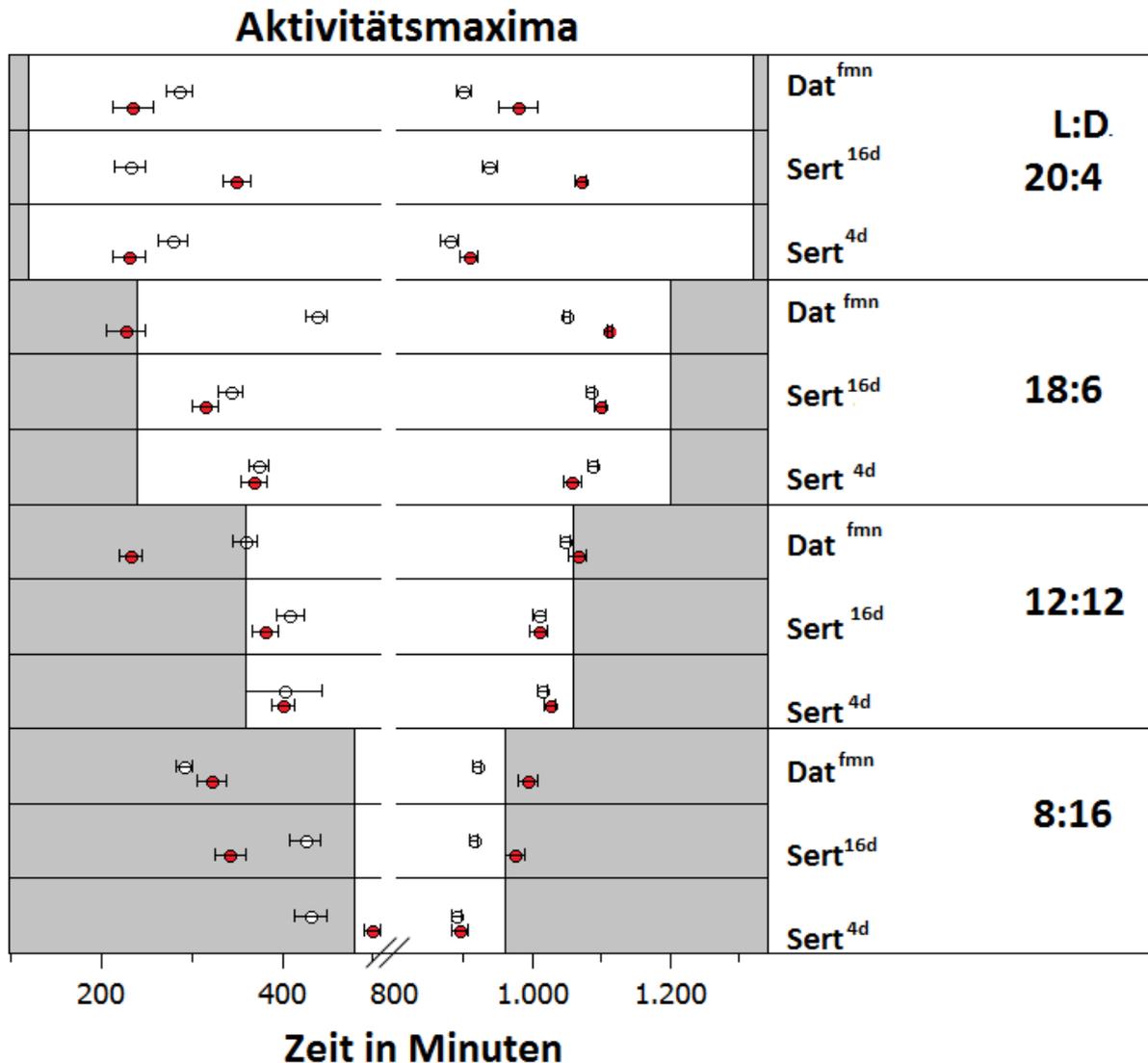


Abbildung 37 Lage der Aktivitätsmaxima von Transportermutanten bei unterschiedlichen Tageslängen

Licht bzw. Dunkelheit sind durch grauen(D)/weißen(L) Hintergrund gezeigt. Die senkrechte schwarze Linie verdeutlicht die Grenze Licht AN bzw. Licht AUS. Die Lage der Maxima ist durch die Datenpunkte gekennzeichnet wobei, die weißen Datenpunkte den Genotyp mit *w*¹¹⁸ Hintergrund, die roten Datenpunkte den Genotyp mit *CantonS* X-Chromosom symbolisieren. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Das Lichtregime L:D ist rechts angegeben. Die Zeit in Minuten ist beginnend um 00:01 mit der Minute 1 zu verstehen.

extrem kurzen Tagen (4L:20D) als nicht mehr möglich, weshalb sich die weitere Analyse auf die Daten von 8L:16D bis 20L:4D beschränkt. Abbildung 37 gibt eine Übersicht über die Verschieben der Maxima aller Genotypen. In allen drei Fällen, *Sert*^{4d}, *Sert*^{16d} und *Dat*^{fmn} zeigte sich eine hochsignifikante Abhängigkeit der Maxima vom Lichtregime. Jedoch bewirkte der Austausch des X-Chromosoms und damit der Wechsel eines intakten *white* Gens zu einem mutanten, lediglich in den

beiden Transportermutanten *Sert*^{16d} und *Dat*^{fmn} einen signifikanten Effekt bezüglich der Lage der Maxima. Im Falle von *Sert*^{16d} war nur das Abendmaxima von *white* abhängig (F=49,518; p= 0,000), im Falle von *Dat*^{fmn}, sowohl das Morgenmaxima (F=50,885; p=0,000), als auch das Abendmaxima (F=117,399; p= 0,000). Bei der Kontrolle *Sert*^{4d} zeigte weder das Morgenmaxima (F=0,192; p= 0,662) noch das Abendmaxima (F=0,202; p= 0,654) eine von *white* abhängige Verschiebung. Dies deutet auf eine Interaktion der Amintransporter und *white* in Bezug auf die circadiane Regelung der Maxima in Lang- und Kurztagen hin.

Eine Auswertung der Tag- und Nachtaktivität (Abbildung 38, S.67) ergab, dass sich die Aktivität der Kontrolle *Sert*^{4d} und *Dat*^{fmn} am Tag in allen Lichtregimen signifikant erhöht, wenn das *white*-Gens mutiert ist. *Dat*^{fmn} zeigt zudem an extrem langen Tagen (L:D 20:4) auch eine signifikante Erhöhung der Nachtaktivität im *w*¹¹¹⁸ Hintergrund.

Die Serotonintransportermutante *Sert*^{16d} zeigte an nur extrem langen Tagen (L:D 20:4) eine signifikante Erhöhung der Aktivität im *w*¹¹¹⁸ Hintergrund, was eine interessante Parallele zu der erhöhten Nachtaktivität von *Dat*^{fmn} darstellt (Abbildung 38, S. 67).

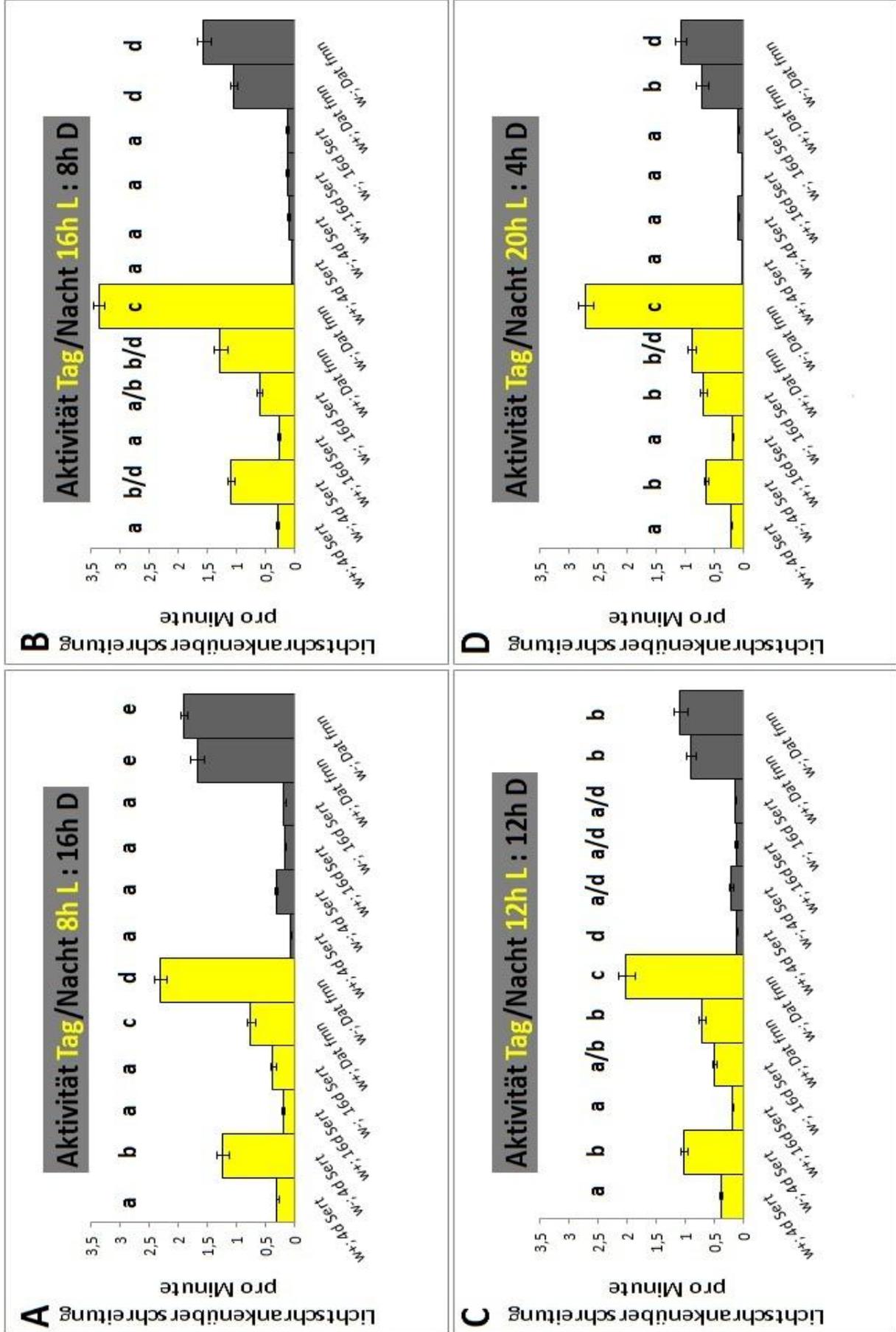


Abbildung 38 Gesamtaktivität für die Licht- bzw. Dunkelphase der Transportermutanten

Die Graphen zeigen die Aktivität der Transportermutanten in der Licht bzw. Dunkelphase in den Lichtregimen **A)** 8h:16h L:D, **B)** 16h:8h L:D, **C)** 12h:12h L:D, **D)** 20h:4h L:D. Die Aktivität während der Lichtphase ist in gelb, die während der Dunkelphase in grau dargestellt. Die Indikatoren geben den Standardfehler an. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Balken zeigen statistische Signifikanz an. Mit einer Ausnahme kann in allen Lichtregimen, bei jedem Genotyp durch Änderung des *white* Hintergrunds eine statistisch signifikante Zunahme der Aktivität während der Lichtphase gemessen werden. Im Falle von *16dSert* ist dies nur unter extrem langen Tagen der Fall (D). Auf die Aktivität in der Dunkelphase hat der *white* Hintergrund keinen Einfluss.

27. Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen in Lang- und Kurztagbedingungen

Auf Grund der komplexen Phänotypen bezüglich der Position der Maxima in den verschiedenen Amintransportermutanten wurde nochmals die Expression der Dopaminrezeptoren mittels RNAi in den PDF-Neuronen herabreguliert und überprüft, ob es in den Lang- und Kurztaglichtbedingungen (18L:6D bzw. 6L:18D bei 100 lux Weißlicht LED) zu einer Beeinflussung der Aktivitätsmaxima kommt. Wie aus Abbildung 39 ersichtlich ist, zeigten die Experimenttiere in allen Genotypen kein von den Kontrollgruppen abweichendes Aktivitätsverhalten, weder in Kurz- noch in Langtagbedingungen.

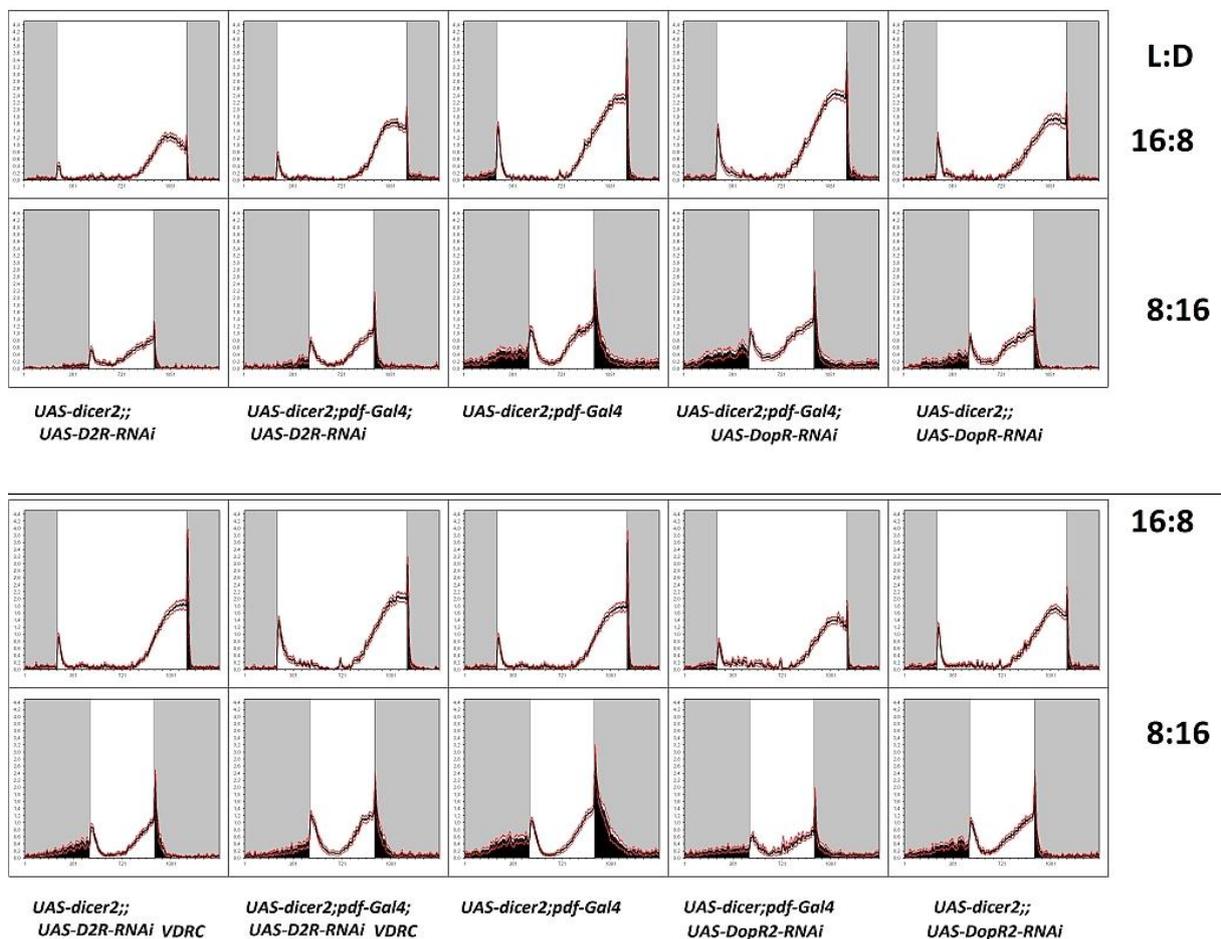


Abbildung 39 Durchschnittstage der Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen in Lang- und Kurztagbedingungen

Mit Hilfe der Expression von RNAi Konstrukten für die Dopaminrezeptoren mittels PDF-Gal4 wurde untersucht, ob es zu einer Verschiebung der Maxima der Aktivität in Lang- (16L:8D) und Kurztagbedingungen (8L:16D) kommt. Es wurden jeweils die Tage 4-10 für die Auswertung benutzt. Die roten Linien geben den Standardfehler an. Die Dunkelphase ist über der Aktivitätslinie in Grau darunter in Schwarz hervorgehoben. Das Lichtregime ist der Legende rechts zu entnehmen, der Genotyp einer Spalte steht unten. Es wurden in allen Fällen zwischen 30 und 32 Versuchstiere gemessen, mit Ausnahme des Genotyps *UAS-dicer2;UAS-DopR-RNAi* für den nur 26 Versuchstiere verwendet wurden. Die Aktivitätskurven der Versuchstiere sind innerhalb des durch die Kontrolltiere vorgegebenen Verhaltens und es kann keine Veränderung des Phänotyps durch Expression der RNAi Konstrukte festgestellt werden.

28. Nutzung eines Period-Luziferase Reportersystems

Die Nutzung von RNAi für die Dopaminrezeptoren führte zu keinem Aufschluss darüber, inwieweit Dopaminsignale in den Uhrneuronen einen Effekt auf den Schlaf haben. Da jedoch die *Dat^{fmn}* Mutante eine verlängerte Periode und die dopamindefizienten Fliegen eine geringere Rhythmik aufwiesen, wurde ein Luziferase-Reportersystem genutzt, um einen möglichen Effekt von Dopaminsignalen auf das PERIODcycling zu überprüfen. Hierzu wurde ein XLG-Luziferase Stamm verwendet, der eine Fusion der Luziferase an das Periodprotein darstellt. Dadurch kann in vivo der molekulare Rhythmus der inneren Uhr anhand der Lumineszenz gemessen werden, solange die Innere Uhr intakt ist. Alle Versuche sind bei 20°C und einem externen Licht-Dunkel Zyklus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkel durchgeführt.

28.1. Lithium verschiebt die Phase des Period-Cyclings

Lithium kann die Phase von *Drosophila melanogaster* beeinflussen, indem es mit dem GSK-3beta Homolog *shaggy* interagiert (Iwahana *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2010). Um die Effizienz des Luziferase-

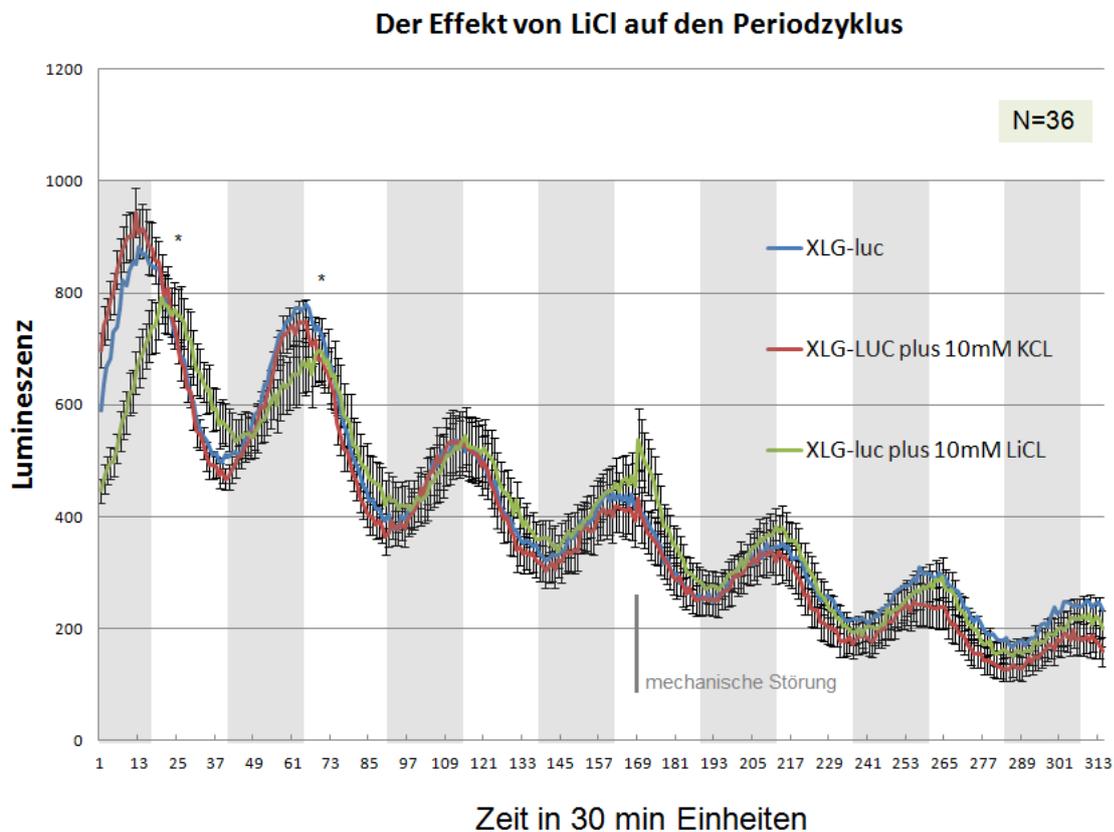


Abbildung 40 Der Effekt von LiCl auf *XLG-luc*

Der Licht-Dunkel-Zyklus ist durch die graue Schattierung für die Dunkelphase angezeigt. Die Lumineszenz von je 36 *XLG-luc* Köpfen in reinem Medium, mit 10mM KCl und 10mMLiCl wurden verglichen. Lithium verschiebt die Phase in den ersten beiden Zyklen (mit Stern gekennzeichnet). An den weiteren Tagen drifteten die mit Lithium behandelten Fliegen wieder in die Phase der Vergleichsgruppen zurück. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Indikatoren von *XLG-luc* (blau) weggelassen.

Reporters bezüglich möglicher den Rhythmus beeinflussender Reagenzien zu überprüfen, wurde 10mM Lithiumchlorid, 10mM Kaliumchlorid als neutrale Kontrolle und gar kein Reagenz zu dem ansonsten identischen Medium zugefügt. Gemessen wurde die Lumineszenz von Köpfen der *XLG-luc* Fliegen. Da der bekannte Effekt von Lithium im genutzten System nachgewiesen werden konnte, wurde das System genutzt um den Effekt anderer Reagenzien auf den PERIODzyklus zu untersuchen.

28.2. Test der LOPAC¹²⁸⁰-Bibliothek

Um zu sehen, ob dopaminerge sowie serotonerge Signale einen direkten Einfluss auf den molekularen Rhythmus der Inneren Uhr haben, wurde das XLG-Luziferase System verwendet um die 181 pharmazeutisch aktiven Komponenten der Lopac¹²⁸⁰ Bibliothek zu testen, von denen 83 Komponenten Effekte auf das serotonerge System haben und 98 Komponenten auf das dopaminerge. Für die Übersicht aller genutzten Komponenten siehe Anhang LOPAC Bibliothek Tabelle 5. Aus diesem ersten Screen wurden die subjektiv auffälligsten Komponenten ausgewählt, um genauere Experimente mit mehr Köpfen durchzuführen (Tabelle 4):

Tabelle 4 Auffällige Komponenten aus erstem Screen

Komponente	Klasse	Wirkung	Ziel im Säuger
Venlafaxine hydrochloride	Serotonin	Wiederaufnahme	5-HT and NE
WAY-100635 maleate	Serotonin	Antagonist	5-HT1A
3-Tropanyl-3,5-dichlorobenzoate	Serotonin	Antagonist	5-HT3
N-omega-Methyl-5-hydroxytryptamine oxalate salt	Serotonin	Ligand	
Metergoline	Serotonin	Antagonist	5-HT2/5-HT1D
L-741,626	Dopamin	Antagonist	D2
1-Phenylbiguanide	Serotonin	Agonist	5-HT3
(±)-Quinpirole dihydrochloride	Dopamin	Agonist	D2 > D3
Propionylpromazine hydrochloride	Dopamin	Antagonist	D2
SKF 75670 hydrobromide	Dopamin	Agonist	D1
ST-148	Dopamin	Antagonist	D2
Trazodone hydrochloride	Serotonin	Inhibitor	Wiederaufnahme
SKF 89626	Dopamin	Agonist	D1

Für erste Versuche aus dieser Hitlist wurden Quinpirole Dihydrochlorid, ein D2 Agonist, Spiperone Dihydrochlorid, ein D2 Antagonist, der jedoch in dem ersten Screen nicht auffällig war und SKF 89626, ein D1 Agonist, ausgewählt. Alle drei wurden in früheren Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* erfolgreich verwendet und sind somit nicht spezifisch für Säugertiere. Da alle drei Komponenten in DMSO gelöst sind, wurde der Kontrolle ebenfalls DMSO zugeführt. Pro Gruppe je zehn Köpfe einzeln in einer Vertiefung der Titerplatte in Medium gehalten und der Lumineszenzzyklus über vier LD 12h:12h Zyklen gemessen.

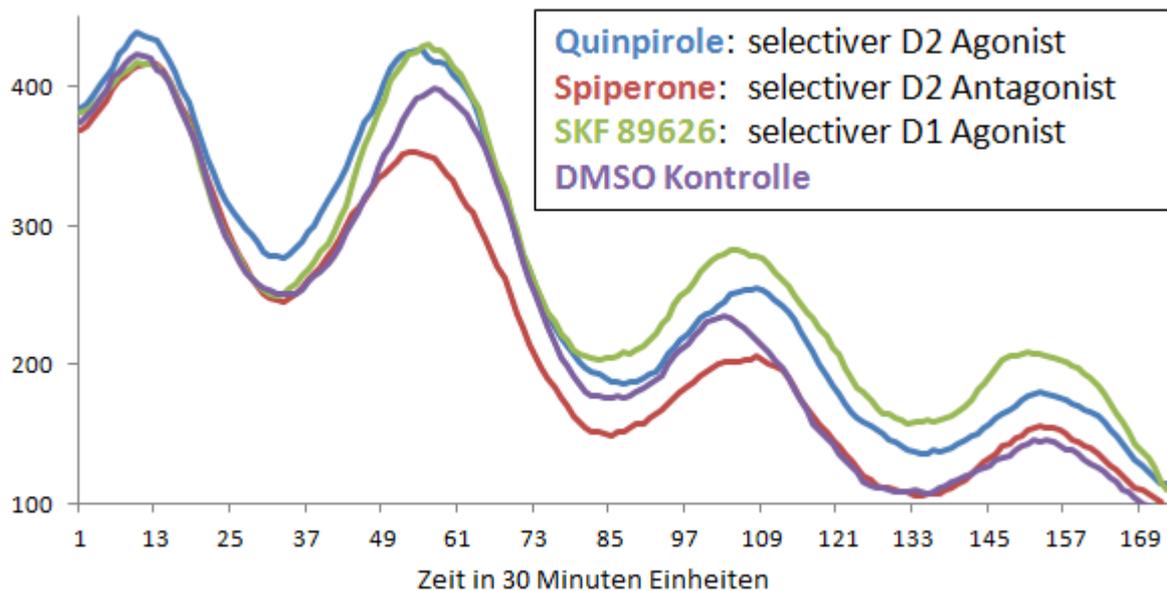


Abbildung 41 Beispiel gemittelter Kurven der Lumineszenz von je 10 gemessenen Köpfen

Die gemittelten Kurven der Lumineszenz von XLG-Köpfen innerhalb von vier LD 12h:12h Zyklen zeigt eine leichte Verschiebung der Phase an Tag 2 nach Zugabe der Komponenten im Vergleich zur Kontrolle. Für eine Auswertung der Verschiebung siehe den ersten Graphen von Abbildung 42. Quinpirole, Spiperone und SKF 89626 wurden in eine Konzentration von 100µM zugefügt.

Von jedem einzelnen Kopf wurde die Zeit des Maximums pro Zyklus bestimmt. Der Mittelwert der DMSO Kontrolle wurde als Referenzzeit = 0 gesetzt und die Abweichung der Experimentgruppen zur Kontrolle zweier Experimente ist in Abbildung 42 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, war der Effekt der einzelnen Komponenten auf die Phasenverschiebung nicht reproduzierbar (Abbildung 42). Mögliche Gründe hierfür stellt unter anderem die Tatsache dar, dass ganze Köpfe verwendet wurden, da diese sowohl das Eindringen der Komponente in das Gewebe erschweren, als auch der Tatsache Rechnung getragen werden muss, dass nicht nur die Uhrneuronen, ein Zyklus des Proteins PERIOD aufweisen, sondern auch andere Gewebe, wie z. B. die Photorezeptoren. Auch die

Amplitude der Lumineszenz, welche in Abbildung 41 einen sichtbaren Unterschied zeigt, zeigte sich als äußerst variabel und nicht reproduzierbar. Deshalb wurde die Untersuchung der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek nicht weitergeführt, sondern versucht eine Kultivierung von Gehirnen zu etablieren. Leider blieb dies erfolglos (siehe Material und Methoden für Details der Versuche: Kapitel 13 Biolumineszenzmessung von Gehirnen Seite 24).

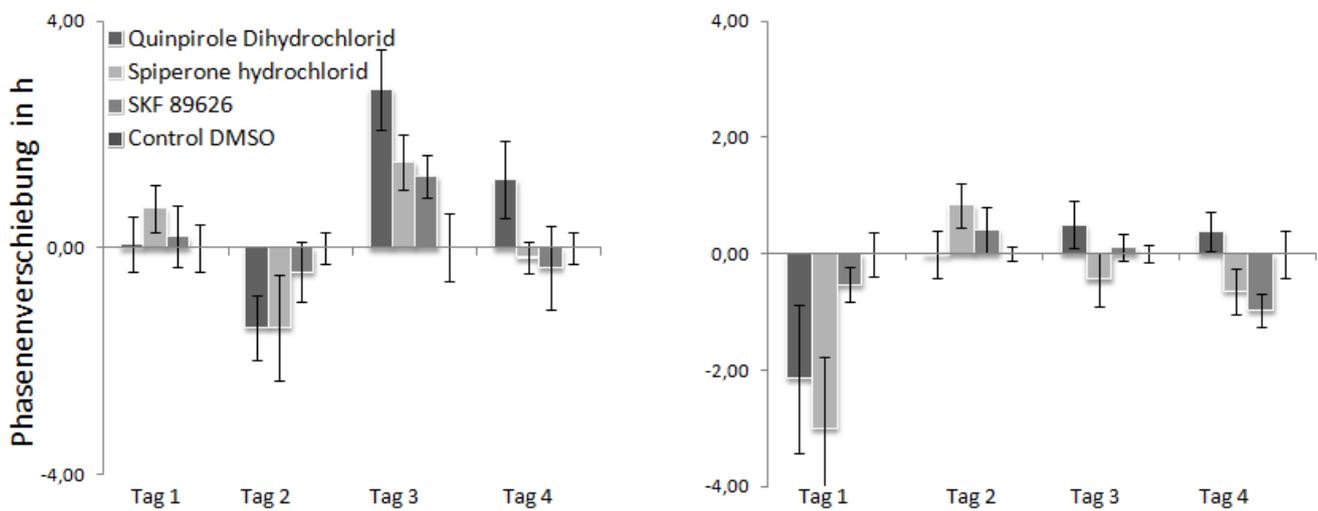


Abbildung 42 Phasenverschiebung in zwei unabhängigen Experimenten

Die Zeit des Maximums der DMSO Kontrolle wurde für jeden Tag als Nullwert definiert. Die Abweichung wurde in Bezug dazu dargestellt. Frühere Maxima, wurden als negative Werte aufgetragen, spätere als positive. Der Vergleich der zwei Experimente zeigt, dass die Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten. Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an.

29. Schlaf in Wildtypstämmen

29.1. Schlafvarianz in Wildtypstämmen

Zum allgemeinen Verständnis der in dieser Arbeit ermittelten Daten möchte ich zum Abschluss kurz das Schlafverhalten verschiedener Wildtypstämme miteinander vergleichen. Ein Blick auf Abbildung 43 zeigt sofort, dass diese ein sehr heterogenes Schlafverhalten aufweisen. Es wurden *CantonS*, *OregonR*, *HU 2-1* und *Flotte Lotte* als echte Wildtypstämme verwendet. Zusätzlich wurde in diesem Experiment *w¹¹¹⁸* verwendet, welcher zwar kein echter Wildtypstamm ist, aber in dieser Arbeit wie in vielen Publikation als Kontrollstamm verwendet wird und der häufigste Ursprungstamm für genetisch veränderte *Drosophila melanogaster* in der Forschung ist. Der starke Effekt, den der *white*

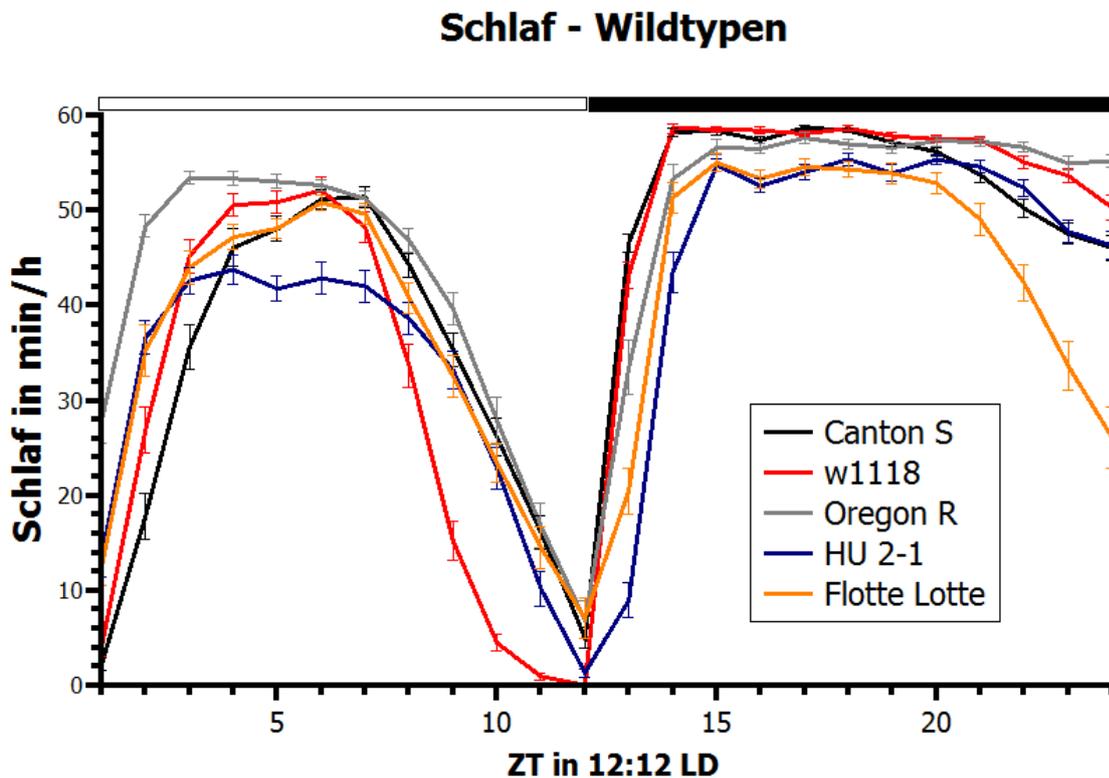


Abbildung 43 Schlaf pro Stunde diverser Wildtypstämme

Schlafkurven von *CantonS* (n=31), *w1118* (n=31), *OregonR* (n=28), *HU 2-1* (n=30) und *Flotte Lotte* (n=32) im LD 12:12 (10 Zyklen) in 24h (=1440 min). Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Der Balken über dem Diagramm zeigt den Licht(weiß)-Dunkel(schwarz) Zyklus mit 12h Licht und 12h Dunkel an. Es können deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden. Der Unterschied zwischen *w1118* und *CantonS* ist allerdings erstaunlich gering. Eine deutliche Abweichung stellt der Stamm *Flotte Lotte* dar, der in der zweiten Hälfte der Nacht keine sehr hohe Schlafmenge pro Stunde mehr aufweist.

Hintergrund in den vorangegangenen Versuchen auf die Amintransportermutanten hatte, konnte hier zwischen *CantonS* und *w¹¹¹⁸* nicht gemessen werden.

Der Vergleich der Gesamtschlafmenge zeigt, dass *CantonS*, *w¹¹¹⁸* und *HU 2-1* eine vergleichbar hohe Schlafmenge aufweisen (16,4 h - 17,6h = 984min-1057min). *OregonR* zeigt eine signifikant erhöhte

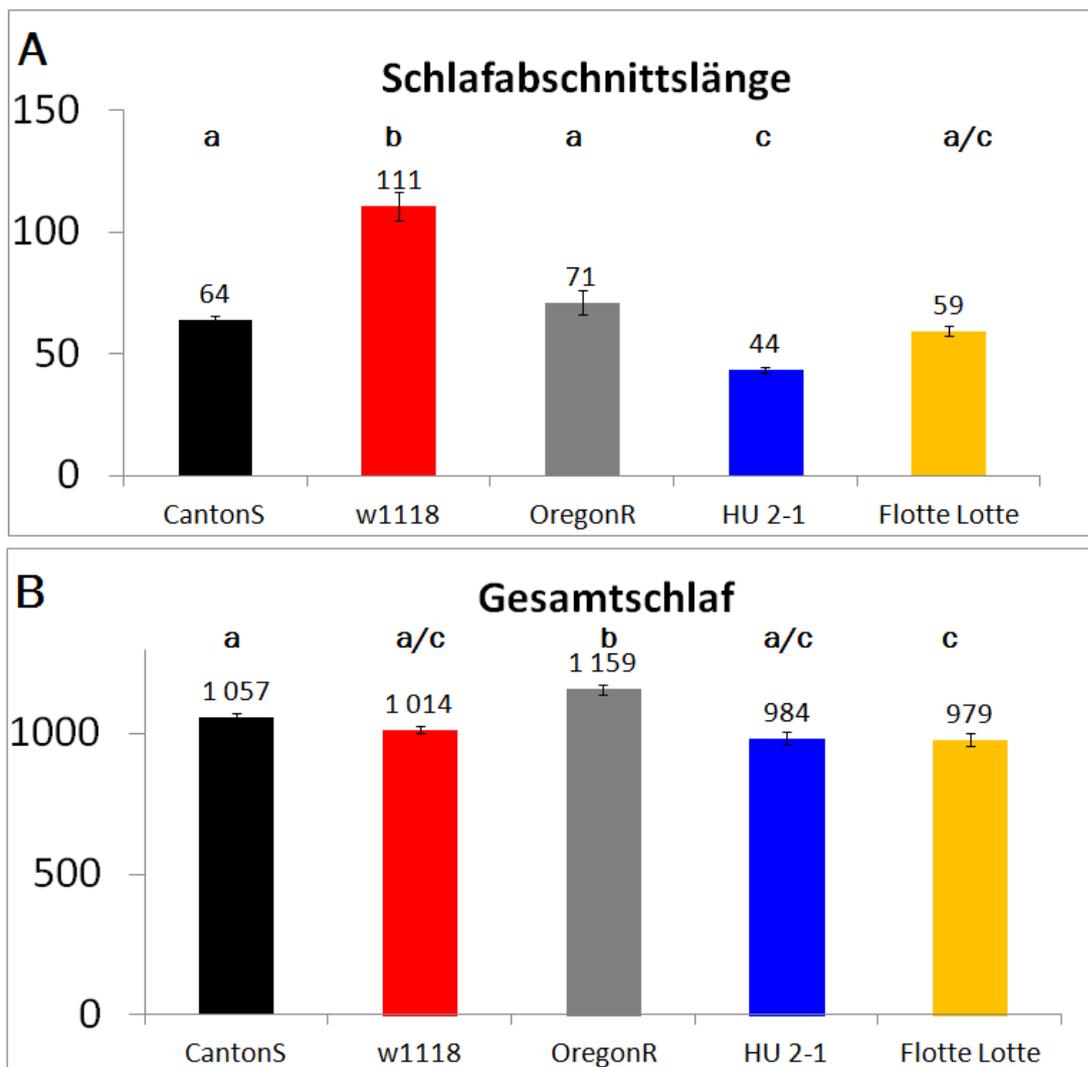


Abbildung 44 Übersicht Gesamtschlaf und durchschnittliche Schlafabschnittslänge verschiedener Wildtypen

A Durchschnittliche Schlafabschnittslänge

B Durchschnittlicher Gesamtschlaf von *CantonS* (n=31), *w1118* (n=31), *OregonR* (n=28), *HU 2-1* (n=30) und *Flotte Lotte* (n=32) im LD 12:12 (10 Zyklen) in 24h (=1440 min)

Die Indikatoren zeigen den Standardfehler an. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Balken zeigen die statistische Signifikanz an.

Gesamtschlafmenge von 19,3 Stunden (1159min) und *Flotte Lotte* eine signifikant niedrigere Schlafmenge von 16,3 Stunden (979min). Bei der Schlafabschnittslänge zeigt sich ein etwas anderes Bild. Die Schlafabschnittslänge erwies sich im Laufe dieser Arbeit als extrem variabel und nicht immer als zuverlässiger Parameter. Als Vergleich dazu die Messung des *w¹¹¹⁸* Stammes aus Kapitel 18.1 (S.33, Abbildung 10), der mit 16,5 Stunden (988,3min) zwar eine vergleichbare Menge Gesamtschlaf, mit 67,44min aber eine nur etwa halb so hohe Schlafabschnittsdauer aufweist, wie die Messung in dem hier gezeigten Experiment (Abbildung 44). Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit

weitestgehend auf die Darstellung der Ergebnisse für die Schlafabschnittsdauer verzichtet, da der Gesamtschlaf die verlässliche Komponente darstellt.

29.2. Videoanalyse der Schlafposition

Eine Videoaufnahme von *Drosophila melanogaster* Männchen sollte das Einnehmen der typischen Schlafposition aufzeichnen. Auf Grund des Winkels der Fliege zur Kamera und der Dauer der Absenkbewegung ist dies eine selten zu erkennendes Ereignis. Die Abbildung 45 zeigt die Absenkbewegung in einem Zeitfenster von 8 min 31 s, welche erst durch einen Zeitraffer entdeckt werden konnte. Diese entspricht in ihrer Position dem Stand der Literatur (Hendricks *et al.*, 2000), doch die dafür gebrauchte Zeitspanne übersteigt die 5 Minuten, welche als Definition für Schlaf verwendet werden und spricht für die in dieser Arbeit verwendete Definition von 10 Minuten.

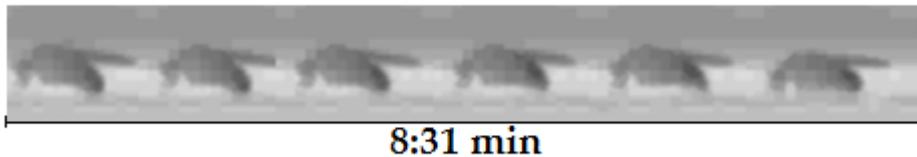


Abbildung 45 Schlafposition *Drosophila melanogaster*

Die Abbildung zeigt eine Folge von Screenshots einer Fliege in einem Trikinetiks Verhaltenröhrchen. Die zeitlichen Abstände der Screenshots sind variabel und erstrecken sich über einen Zeitraum von 8:31 Minuten. Es ist deutlich das Absinken der Fliege auf die Vorderbeine zu erkennen, das in Echtzeit auf Grund der Langsamkeit der Bewegung nicht wahrgenommen wird

IV Diskussion

30. Amintransporter und Schlaf

Die in Kapitel 18 gezeigten Daten belegen die dominante Rolle der Amine bei der Schlafregulation. Für die Mutante Dat^{fnn} konnte gezeigt werden, dass der Schlaf während des gesamten 24h-Zyklus deutlich reduziert ist. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutation des Serotonintransporters ($Sert^{16d}$) eine signifikante Erhöhung des Schlafes. Auf Grund der sehr hohen Schlafmenge während der Nacht ist diese Schlafzunahme vor allem in der Lichtphase des Zyklus zu beobachten. Dopamin und Serotonin stellen somit Gegenspieler in der Regulation der Gesamtschlafmenge dar. Auch die Periodenlänge wird von beiden Transportern gegenläufig beeinflusst. So ist im Falle der Serotonintransportermutante eine leichte Verlängerung der Periode feststellbar, im Falle der Dopamintransportermutante eine Verkürzung. Jedoch ist in beiden Fällen der Effekt nicht sehr stark. Die Rhythmik bleibt bei der Dat^{fnn} unverändert, die Mutation des Serotonintransporters führt zu einer erniedrigten Zahl von nur 70% rhythmischer Fliegen. Eine selektive Rettung der hypodermalen Form der Tyrosinhydroxylase, die zu neuronal dopamindefizienten Tieren führt, komplementiert das Bild. Auch hier ist erwartungsgemäß konträr zur Dat^{fnn} Mutante der Schlaf deutlich erhöht. Ein Effekt auf die Periode konnte allerdings nicht festgestellt werden, jedoch wird die Rhythmik vergleichbar zur Serotonintransportermutante auf 67% herabgesetzt. Somit sind die Phänotypen einer Serotoninsignalverlängerung auf Grund der Deletion des Wiederaufnahmetransporters parallel zu der Reduzierung des Dopaminsignals. Die zeigt deutlich, dass es bei der Schlafregulation auf die Homöostase beider Amine ankommt.

Diese Ergebnisse passen zu den bisherigen Erkenntnissen der Funktion von Dopamin und Serotonin bei Schlaf, aber auch anderen durch diese Amine gesteuerten Verhaltensweisen. Schon durch pharmakologische Beeinflussung des Dopaminsignals konnte dessen Bedeutung für das Schlafverhalten in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden. So konnte durch die Fütterung von Methamphetamin, welches die Dopaminausschüttung erhöht, der Schlaf in der Nacht beinahe vollständig unterdrückt werden. Im Gegenzug dazu führte 3IY, ein Inhibitor der Dopaminsynthese, zur Erhöhung des Schlafes (Andretic *et al.*, 2005). Die Etablierung einer genetischen Beeinflussung der Dopaminsignale durch die ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Mutante Dat^{fnn} , bestätigte die pharmakologischen Ergebnisse. Die Mutante Dat^{fnn} wurde als hyperaktiv mit verringerten

Ruhephasen aber normaler Lebenserwartung beschrieben (Kume *et al.*, 2005). Auch die dopamindefizienten Tiere (vgl. 18.2) wurden bereits in anderen Studien auf diverse Verhalten hin überprüft und es wurde unter anderem eine erhöhte Schlafmenge festgestellt (Hirsh *et al.*, 2010; Riemensperger *et al.*, 2011). Die Arbeiten von Kume *et al.* 2005 und Riemensperger *et al.* 2011 haben eine verschiedene Art der Datendarstellung gewählt. So wurde in Kume *et al.* 2005 der Gesamtschlaf während LD und DD ausgewertet, während in Riemensperger *et al.* 2011 der Prozentsatz der schlafenden Fliegen, als auch die Schlafkurve über den LD Zyklus dargestellt sind. Die in dieser Arbeit gemachten Versuche bestätigen die genannten Studien und ergänzen sie um eine direkt miteinander vergleichbare, da identische Darstellung der Daten. Sie ergänzen die bisherigen Erkenntnisse um den Einfluss von Dopamin auf die Periodenlänge. Ergänzend sei erwähnt, das in einem groß angelegten Screen mit 5297 Fliegenlinien nach Schlafmutanten ein neues Allel des Dopamintransporters DAT gefunden wurde, das ebenfalls eine verringerte Schlafmenge aufweist. Die verwendeten Fliegen Stammen alle aus der sogenannten "Zuckersammlung" (Wu *et al.*, 2008).

Die Mutante *Sert^{d16}*, die uns mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. H. Scholz zur Verfügung gestellt wurde, war zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht veröffentlicht. Dass die funktionale Deletion des Serotonintransporters zu einer Erhöhung der Gesamtschlafmenge führt, ist jedoch nicht überraschend, da bereits eine schlaffördernde Wirkung des Serotoninrezeptors 5HT-1B allein gezeigt werden konnte (Yuan *et al.*, 2006). Dennoch zeigen die Versuche die Rolle von Serotonin als Gegenspieler zu Dopamin, insbesondere, da auch der Effekt auf die Periodenlänge entgegengesetzt zu Dopamin ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Serotoninsignals durch die Deletion des Wiederaufnahmetransporters denselben Effekt auf die Anzahl der rhythmischen Tiere hat, wie eine genetische Deletion des neuronalen Dopamins. Dies zeigt deutlich, dass Serotonin und Dopamin als Gegenspieler bei der Regulation des Schlafes agieren. Da bereits für Serotoninrezeptoren 5HT1A und B und den Dopaminrezeptor D2R die Lokalisation auf den als Teil des Schlafzentrums diskutierten I-LNv gezeigt wurde (Yuan *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Shang *et al.*, 2011), spielen dabei möglicherweise Neuronen, welche für die Rhythmik verantwortlich sind, eine Rolle. Die histologische Lokalisation des Serotonintransporters wurde bereits untersucht, jedoch in Hinblick auf Kolo-kalisation mit den serotonergen Neuronen selbst, den Dopaminneuronen als auch den für viele Verhalten relevanten Pilzkörpern. Eine Untersuchung der Kolo-kalisation von Uhrneuronen und dem Serotonintransporter fehlt und könnte weiteren Aufschluss bezüglich der Interaktion von Serotonin, der Inneren Uhr und dem Schlafzentrum bringen (Giang *et al.*, 2011). Da jedoch nicht nur der bereits erwähnte 5HT-1B Rezeptor auf den I-LNv Neuronen exprimiert ist, sondern auch der 5HT-1A Rezeptor, dem eine Rolle beim Entrainment der Inneren Uhr zugeschrieben wird (Yuan *et al.*, 2005), wäre hierbei die Region der PDF-Neuronen von besonderem Interesse.

31. Dopaminrezeptoren und Schlaf

In den Kapiteln 18.3, 18.4 und 18.5 wurde untersucht, inwieweit eine Hinunterregulierung verschiedener Dopaminrezeptoren mittels RNAi zu einer Veränderung des Schlafverhaltens führt. Hierzu wurden die TRiP Linien von Bloomington für DopR, DopR2 und D2R mittels verschiedener Treiberlinien exprimiert: *PDF-Gal4*, welche in den PDF positiven I-LNV und s-LNV mit Ausnahme der 5ten s-LNV exprimiert, *tim-Gal4*, welche in allen Uhrgeweben inklusive aller Uhrneurone exprimiert und *clk4.1-Gal4*, welche in sechs bis acht *cry* positiven DN1 exprimiert. In allen Fällen wurde die Effizienz der RNAi Konstrukte durch die Koexpression von *dicer2* verstärkt. Im Falle von *PDF-Gal4* wurde für den Rezeptor D2R zudem eine RNAi-Linie aus dem *Wiener Drosophila RNAi Zentrum* (VDRC) verwendet. In keinem der Fälle konnte eine signifikante Veränderung der Gesamtschlafmenge bzw. eine andere Verteilung dieser über den Tagesverlauf festgestellt werden.

Für den Rezeptor DopR war dies nicht gänzlich überraschend. Für diesen wurden zwei unterschiedliche Rollen bei der Steuerung der Erregbarkeit festgestellt. In der dazu durchgeführten Arbeit wurde zwischen innerer Erregbarkeit und der Erregbarkeit durch exogene Störung unterschieden. Dazu wurde die durch wiederholte Luftstöße induzierte Hyperaktivität gemessen (Repetitive Startle induced Hyperactivity = ReSH). Hierbei konnte eine zentrale Rolle des DopR Rezeptors gezeigt werden. Jedoch konnte der ReSH Phänotyp in DopR Mutanten nicht durch Expression des Rezeptors mittels *PDF-Gal4* oder *tim-Gal4* gerettet werden (Lebestky *et al.*, 2009). Für den D2R Rezeptor hingegen wurde die Lokalisation auf den I-LNV indirekt durch cAMP Imaging nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass durch Expression der RNAi für D2R die cAMP Antwort auf Dopaminapplikation anstieg. Da D2R ein inhibitorischer Rezeptor ist, deutet dies auf seine Lokalisation auf den I-LNV Neuronen hin. Allerdings konnte auch ohne die RNAi eine deutliche cAMP Antwort gemessen werden, was darauf schließen lässt, dass zudem ein aktivierender Dopaminrezeptor vorhanden sein muss (Shang *et al.*, 2011). Da diese positive Reaktion auf Dopamin auch bei Koapplikation von Tetrodotoxin (TTX) stattfand, zeigt, dass diese Zellantwort unabhängig von der Kommunikation mit anderen Neuronen ist und die Rezeptoren direkt auf den I-LNV sitzen müssen und das Signal nicht indirekt weitergeleitet wird. Insofern wäre sowohl im Falle der RNAi Expression von D2R, als auch von einem der aktivieren Dopaminrezeptoren ein Effekt bezüglich des Schlafphänotyps wahrscheinlich gewesen. Trotz des nicht vorhandenen Phänotyps in den gezeigten Schlafmessungen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Dopaminrezeptoren auf den Uhrneuronen möglicherweise dennoch eine funktionale Bedeutung bei der Schlafregulation haben. Um diese Frage weiter zu klären, könnten in weiterführenden Versuchen sowohl die Effizienz der

RNAi mittels qPCR überprüft werden, als auch Mutanten für Dopaminrezeptoren spezifisch in den Uhrneuronen gerettet werden. Ersteres würde die Frage beantworten, ob die Expression der RNAi möglicherweise nur nicht ausreichend ist um einen Phänotyp zu bekommen, zweiteres könnte die spezifische Funktion der Dopaminrezeptoren auf den Uhrneuronen für die Schlafregulation klären. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass die dopaminerge Regulation von Schlaf doch in anderen Neuronen stattfindet. So haben zwei sehr aktuelle Arbeiten jeweils dopaminerge Neuronen identifiziert, die für die Schlafregulation relevant sind, die auf den Fächerförmigen Körper projizieren. In der einen Arbeit wurden Sub-Treiberlinien der Tyrosinhydroxylase etabliert und durch Ausschlussverfahren konnten zwei Neurone des PPL1 Cluster für die Erregbarkeit der Fliegen und damit den Schlaf verantwortlich gemacht werden (Liu *et al.*, 2012). Der andere Arbeitsansatz verwendete Mosaik Analyse mit einem unterdrückbaren Zellmarker (MARCM) und zeigte, dass es ein Teil des PPM3 Klusters ist, welches auf den Fächerförmigen Körper projiziert um Schlaf und Erregbarkeit zu regulieren (Ueno *et al.*, 2012). Somit ist eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Effekte bezüglich Schlaf durch die Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in Uhrneuronen, dass diese nicht den durch Dopamin gesteuerten Teil des Schlafzentrums bilden. Trotz der Bedeutung der I-LNV in der Schlafregulation ist möglicherweise der Fächerförmige Körper das Ziel der Dopaminsignale. Allerdings bleibt zu bedenken, dass bei solchen Einzelzellanalysen ein hohes Risiko für Artefakte auf Grund des Fehlens der Mehrheit der Dopaminsignale und damit des Fehlens vieler indirekter Effekte durch Zellkommunikation besteht. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Funktion des Fächerförmigen Körpers im natürlichen Zustand auf Grund der Verrechnung mit Dopaminsignalen in anderen Zellen womöglich eine andere ist, als durch die angesprochenen Einzelzellanalysen vorgeschlagen wird. Ein Bedenken, welches durch die Tatsache unterstützt wird, dass beide Studien zu einem voneinander abweichenden Ergebnis kommen.

32. GABA_B-Rezeptoren und Schlaf

Die in Kapitel 19 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass GABA_B-R2 Rezeptoren auf den PDF positiven Uhrneuronen (LNvs) exprimiert werden und dass ihre Hinunterregulierung in den I-LNV zu einem erhöhten Aktivitätslevel während des gesamten LD Zyklus führt und die Aufrechterhaltung des Schlafs in der zweiten Hälfte der Nacht reduziert wird. Weder die Einschlafphase (Latenzzeit) noch die circadianen Parameter wurden durch diese Hinunterregulierung beeinflusst. Daraus kann gefolgert werden, dass die Signalweiterleitung GABAerger Signale durch die metabotropen Rezeptoren der I-LNV essenziell ist, den Schlaf über die Dunkelphase hinweg aufrecht zu erhalten und während des gesamten LD Zyklus die Aktivität in einem moderaten Bereich zu halten, um Hyperaktivität zu verhindern.

Diese Ergebnisse sind mit früheren Studien vereinbar. Eine Arbeit hatte die Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* erstmals beschrieben (Hamasaka *et al.*, 2005). Desweiteren wurde der GABA_A-Rezeptor *Rdl* auf den I-LNV Neuronen identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass seine Hinunterregulierung die Einschlafzeit (Latenzzeit) verlängert, jedoch die Aufrechterhaltung des Schlafs nicht tangiert (Parisky *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu führte das Hinunterregulieren der GABAergen Signale dazu, dass sowohl die Latenzzeit, als auch die Aufrechterhaltung des Schlafes beeinflusst wurden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass GABA-Signale nicht nur durch den schnellen *Rdl* Rezeptor weitergeleitet werden, sondern zusätzlich eine Signalweg mit einer längeren temporalen Wirkung eine Rolle spielen muss. GABA_B-Rezeptoren sind ein idealer Kandidat, um lang anhaltende GABA Signale zu vermitteln. GABA_A und GABA_B-Rezeptoren arbeiten oft Hand in Hand, um sowohl schnelle als auch langsame Reaktionen auf ein Signal zu vermitteln, so zum Beispiel im olfaktorischen System. Dort vermitteln GABA_A-Rezeptoren die primären modulierenden Antworten auf Düfte, wohingegen GABA_B-Rezeptoren für die Langzeiteffekte verantwortlich sind (Wilson & Laurent, 2005).

Die GABA_B-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* bestehen aus zwei Untereinheiten, namentlich GABA_B-R1 und GABA_B-R2. Nur das Heterodimer aus beiden Untereinheiten kann die metabotrope GABAerge Signalkaskade aktivieren (Galvez *et al.*, 2001; Mezler *et al.*, 2001).

In den in Kapitel 19 gezeigten Versuchen wurde nur der GABA_BR2-Rezeptor hinunterreguliert. Dies führt jedoch dazu, dass die Zahl funktionaler Heterodimere aus GABA_B-R1 und GABA_B-R2 Untereinheiten ebenfalls hinunterreguliert wird und dadurch die GABA-Signalweiterleitung durch metabotrope Rezeptoren generell reduziert wird. Wenn man bedenkt, dass die Aufrechterhaltung

des Schlafs in der zweiten Hälfte der Nacht schon durch eine Reduktion der durch Immunfärbung detektierbaren GABA_B-R2-Rezeptoren in den I-LNv Neuronen signifikant beeinflusst werden konnte, ist die Schlussfolgerung, dass GABA_B-Rezeptoren eine noch darüber hinaus gehende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Schlafes spielen, als in den Experimenten gezeigt werden konnte. Demzufolge haben GABA_B-Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der Weiterleitung der GABAergen Signale in den I-LNv-Neuronen, welche Voraussetzung dafür ist, den Schlaf die gesamte Nacht hindurch aufrecht zu erhalten. Dies ist möglicherweise auf verlängerte Schlafabschnittsdauern in der zweiten Hälfte der Nacht zurückzuführen, da diese bei einer reduzierten Menge an GABA_B-Rezeptoren signifikant verkürzt sind und dadurch die verringerte Gesamtschlafmenge zustande kommt.

Des Weiteren bestätigen und erweitern die Ergebnisse, dass die I-LNv eine relevante Komponente der Schlafregulation sowie der Regulation der Erregbarkeit darstellen (Agosto *et al.*, 2008; Parisky *et al.*, 2008; Kula-Eversole *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu, scheinen die s-LNv nicht in die Regulation der Erregbarkeit involviert zu sein, sondern vor allem die Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik in konstanter Dunkelheit zu bewerkstelligen (Helfrich-Förster *et al.*, 2007b).

Ein Vorbehalt bezüglich der gezeigten Daten ist, dass nicht gänzlich zwischen den Zellklustern der s-LNv und der I-LNv unterschieden werden kann, da beide Neuronengruppen das Neuropeptid PDF exprimieren und somit der *PDF-Gal4* Treiber, der für die Versuche verwendet wurde, ebenfalls in beiden Neuronengruppen exprimiert wird. Allerdings hatte sich glücklicherweise gezeigt, dass unter Vorbehalt doch zwischen beiden Gruppen unterschieden werden kann, da die verwendete *RNAi* für den GABA_B-R2 Rezeptor dessen Expression nur in den I-LNv Neuronen nachweisbar beeinflusst hat, nicht jedoch in den s-LNv. Deshalb kann der beobachtete Effekt den I-LNv Neuronen zugesprochen werden.

Die Ergebnisse bezüglich der I-LNv schließen eine Rolle einer Funktion von GABA bezüglich der durch die Innere Uhr kontrollierten circadianen Aktivitätsrhythmen unter konstanten Dunkelbedingungen nicht aus. In Säugern ist GABA der am stärksten vertretene Neurotransmitter im circadianen Uhrzentrum des Gehirns - dem Suprachiasmatischen Nukleus (SCN) (van den Pol & Tsujimoto, 1985). GABA interagiert dort sowohl mit GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren, die primär, wenn auch nicht ausschließlich, inhibitorische Zellantworten mittels Membranhyperpolarisierung verursachen (Wagner *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2008). GABA-Signale sind für die Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik wichtig und beeinflussen die Amplitude molekularer Oszillationen und helfen möglicherweise bei der Synchronisation der Uhrneuronen innerhalb des SCN (Liu & Reppert, 2000; Albus *et al.*, 2005; Aton *et al.*, 2006; Ehlen *et al.*, 2006). Dasselbe scheint für die Taufliege *Drosophila melanogaster* zu gelten. Hypererregung der GABAergen Neurone stört die molekularen Rhythmen in

den s-LNV und resultiert in arrhythmischen Fliegen (Dahdal *et al.*, 2010). Somit beeinflussen GABA-Signale die Innere Uhr in den s-LNV. In den Experimenten in Kapitel 19 zeigte sich, dass Fliegen mit hinunterregulierten GABA_B-R2 Rezeptoren leicht verlängerte Freilaufperioden aufwiesen, jedoch lediglich im Vergleich zu einer von beiden Kontrollen. Dahdal *et al.*, 2010 konnte vergleichbare kleine Effekte auf die Periode nach Hinunterregulierung von GABA_B-R2 Rezeptoren nachweisen, fand jedoch eine signifikante Periodenverlängerung nach Hinunterregulierung von GABA_B-R3 Rezeptoren. Dies deutet darauf hin, dass GABA-Signale über die GABA_B-R3 Rezeptoren auf die s-LNV wirken. Dies konnte *in vitro* mittels Calciumimaging an Gehirnen von *Drosophila* Larven bestätigt werden (Dahdal *et al.*, 2010). Jedoch schließt die Studie von Dahdal *et al.*, 2010 nicht aus, dass GABA Signale mittel GABA_B-R3 als auch GABA_B-R2 Rezeptoren auf die adulten s-LNV wirken. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Expression der GABA_BR2 Rezeptoren in diesen Uhrneuronen vorgefunden und wir konnten diese nicht signifikant durch die verwendete RNAi hinunterregulieren, obwohl *Dicer2* zur Verstärkung des RNAi Effekts verwendet wurde. Dahdal *et al.*, 2010 verwendeten *Dicer2* nicht und haben die Hinunterregulation der GABA_BR2 Rezeptoren nicht durch immunhistochemische Färbungen in den s-LNV überprüft. Insofern steht es noch aus, die genauen GABA Rezeptoren, welche die Antwort auf GABA Signale in den s-LNV in adulten Tieren weiterleiten zu bestimmen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die l-LNV Untergruppe der PDF positiven Uhrneuronen ein Ziel für schlaffördernde und aktivitätsunterdrückende GABA-Signale darstellen. Damit stellen die l-LNV eine zentrale Neuronengruppe des Schlafregulationsnetzwerks in *Drosophila melanogaster* dar. Das Schlafnetzwerk der Fliege ist deutlich kleiner und einfacher als das von Säugern. Die GABAergen Neuronen von Säugern haben viele Ziele und scheinen hauptsächlich modulatorische und weniger direkte Effekte zu haben (Mistlberger, 2005). Das Schlafnetzwerk der Fliege stellt somit eine kondensierte Form des Erregungs- und Schlafsystems der Säuger (z.B. monaminerge, cholinerge, peptiderge und GABAerge System) dar. Dieses kondensierte Schlafnetzwerk scheint zum Großteil mit den 8 PDF positiven l-LNV Neuronen der Inneren Uhr von *Drosophila* zu überlappen.

33. Der WHITE-Transporter und Schlaf

Die Untersuchung einer spontanen *white* Mutation im Labor von Prof. Dr. Bernhard Possidente (Kapitel 20.1) ergab, dass diese eine drastische Reduktion der Gesamtschlafmenge um 44 % verursacht. Der Schlaf war sowohl in der Nacht, als auch am Tag deutlich reduziert. Die Untersuchung von BROWN und SCARLET, der beiden Dimerpartner von WHITE, ergab, dass nur BROWN zu einer Beeinträchtigung des Schlafes führt. Auch hier war der Effekt am Tag und in der Nacht zu beobachten. Der Stamm *bw*¹⁹, der den geringsten Gesamtschlaf aufweist, weist eine Punktmutation auf, die aus dem Codon für Glutamin 102 ein Nonsense-Codon macht und somit zum Abbruch des Proteins führt. Es wurde bereits gezeigt, dass *white* den Dopamin- und Serotoningehalt beeinflusst (Borycz *et al.*, 2008). Obwohl diese Annahme umstritten ist (Yarali *et al.*, 2009), besteht die Möglichkeit, dass WHITE als Amintransporter fungiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit würden darauf hinweisen, dass es bezüglich des Schlafverhaltens vor allem das WHITE/BROWN Dimer ist, welches bei der aminergen Schlafregulation eine Rolle spielt. In einer Studie über das phototaktische Verhalten von *Drosophila melanogaster* (Kain *et al.*, 2012) wurde in der Diskussion eingehend darauf hingewiesen, dass den beiden Dimeren WHITE/BROWN und WHITE/SCARLET eine unterschiedliche Bedeutung beim Transport von Aminen bzw. der Vorstufen der Synthese zukommt. Nach den dort aufgeführten Erläuterungen ist SCARLET/WHITE als Tryptophantransporter für den Serotoninspiegel relevant, BROWN/WHITE wäre Dopamin zuzuordnen (Kain *et al.*, 2012). Dies passt zu meinen Ergebnissen, da die *bw*¹⁹ Mutanten als auch die spontane *white* Mutation in der *roo*²² Linie zu verringertem Schlaf führen. Der Phänotyp der verringerten Schlafmenge entspricht dem Effekt der *Dat*^{fmn} Mutation. Allerdings ist der Gesamtschlaf sowohl von *w*; *roo*²² (10,6 h/635 min) als auch *bw*¹⁹ (10,5 h/627 min) deutlich über dem von *Dat*^{fmn} (5,2 h/313 min). Dies zeigt möglicherweise eine geringere Affinität des WHITE/BROWN Dimers für Dopamin, eine weniger starke Expression des Transporters in den schlafrelevanten Regionen des Gehirns im Vergleich zu DAT oder aber eine geringere Effizienz beim Transport. Dem WHITE/BROWN Transporter ist somit eine untergeordnete Rolle beim Dopamintransport bzw. beim Transport von Synthesevorstufen zuzuschreiben. Insgesamt ist diese Funktion noch als spekulativ zu betrachten. Zum einen ist die Mutation in der *w*; *roo*²² Linie nicht charakterisiert. Eine weitere Möglichkeit die Hypothese des WHITE/BROWN Dimers als Transporter mit Relevanz in Bezug auf Schlaf zu testen, stellt die Mutante *brownex* (*w*^{bw^x}) dar (Ewart *et al.*, 1994). Diese enthält ein *white*-Gen, das zwar noch mit BROWN dimerisieren kann und einen normalen Anteil an braunen Pigmenten enthält, allerdings nicht mehr mit *scarlet* und eine um 30% verringerte Intensität der roten Augenfarbe verursacht (Lloyd *et al.*, 2002). Zudem könnte durch den

Screen von unterschiedlich stark exprimierenden *miniwhite* Konstrukten im *white* Hintergrund überprüft werden, ob der Effekt auf Schlaf mit der Expressionsstärke von *miniwhite* korreliert.

34. Die Interaktion von WHITE und den Amintransportern DAT und SERT in Bezug auf Schlaf

Um die These weiterzuverfolgen, dass WHITE eventuell als zusätzlicher Amintransporter agiert und dadurch das Schlafverhalten beeinflusst, wurde das X-Chromosom und damit die w^{1118} Mutation der Dopamin- als auch Serotonintransportermutante gegen das X-Chromosom von *CantonS* ausgetauscht. Sowohl bei Dat^{fmn} , als auch $Sert^{16d}$ führt der Austausch des X-Chromosoms zu mehr Schlaf, wenn ein intaktes *white* Gen vorhanden ist (*CantonS* X-Chromosom). Diese Schlafzunahme resultiert vor allem aus einer Zunahme während der Lichtphase des L:D-Zyklus. Auch in der Kontrolle zur Serotonintransportermutante konnte diese Schlafzunahme beobachtet werden. Diese Schlafzunahme könnte dadurch erklärt werden, dass WHITE als zusätzlicher Dopaminwiederaufnahmetransporter agiert. Damit wäre der extreme Effekt der Dat^{fmn} Mutante eigentlich der addierte Effekt aus der Mutation beider für Dopamin verfügbaren Wiederaufnahmetransporter, die eine Verlängerung des Dopaminsignals bewirken. Den Hauptanteil am Dopamintransport bewirkt jedoch weiterhin der Dopamintransporter DAT, da auch der Gentoyp $w^+;Dat^{fmn}$ eine stark reduzierte Schlafmenge von 11,5h (693 Minuten) aufweist (vgl. w^{1118} 16,6h/ 988 Minuten Kapitel 18.1.). Auch im Fall der Serotonintransportermutante kann die Zunahme des Gesamtschlafs bei intaktem WHITE Transporter, von 16,8h (1006 Minuten) auf 20,2h (1214 Minuten), durch einen beschleunigten Abtransport des Gegenspielers Dopamin erklärt werden. Diese Hypothese beruht vornehmlich auf der Publikation von Borycz *et al.*, 2008, in der ein verringerter Dopamin- als auch Serotoninspiegel im Falle der Mutante w^{1118} beschrieben wird. Um zu überprüfen, inwieweit dies auch in den hier aufgeführten Stämmen die Ursache sein kann, wurden eigene UPLC-Messungen der im Schlafverhalten getesteten Stämme durchgeführt. Um den Vergleich mit den Daten von Borycz *et al.*, 2008 zu ermöglichen wurden *CantonS* und w^{1118} ebenfalls gemessen. Auch wenn die absoluten Mengen in Pikogramm pro Kopf in unserer Messung deutlich geringer sind als in der Publikation von Borycz *et al.*, 2008, so konnte für Dopamin und Serotonin derselbe relative Unterschied zwischen *CantonS* und w^{1118} ermittelt werden. Zusätzlich wurde der β -Alanyldopamin- und β -Alanylserotoningehalt ermittelt. Dies beruht auf dem Wissen, dass es nicht nur den direkten Weg der Wiederaufnahme in das aminerge Neuron gibt, sondern ebenfalls einen Recyclingweg über

Gliazellen, vornehmlich Astrocyten (Jackson & Haydon, 2008). In diesen wird das Protein EBONY exprimiert, welches als β -Alanyl-Biogen-Synthetase agiert und Dopamin in β -Alanyldopamin umwandelt (Richardt *et al.*, 2002; Suh & Jackson, 2007), das als solches von den Gliazellen in die Dopaminneuronen transportiert wird. In den dopaminergen Neuronen wird durch die Hydrolase TAN die Alanylgruppe abgespalten (True *et al.*, 2005). EBONY weist jedoch keine sehr hohe Substratspezifität auf und kann neben Dopamin auch Histamin, Serotonin, Octopamin und Tyramin alanylieren (Richardt *et al.*, 2003). Interessanterweise konnten wir in unseren UPLC Messungen kein β -Alanylserotonin nachweisen. Eine Möglichkeit wäre, dass die Mengen so gering sind, dass sie mit der angewandten Methode nicht nachgewiesen werden können. Da wir aber bei der Durchführung der Messung im Falle des Genotyps $w^-;Dat^{fmn},Sert^{16d}$, eine Einzelmessung mit einem Serotoningehalt von 0,37pg/Kopf noch durchführen konnten, halte ich diese Erklärung für unwahrscheinlich. In der Arbeit von Richardt *et al.*, 2003 wurde nicht *in vivo*, sondern durch Expression von *ebony* in Zellkultur (*Drosophila* S2 Zellen) bzw. in dem Bakterium *Escherichia coli* gearbeitet. Somit ist die wahrscheinlichere Möglichkeit, dass in adulten *Drosophila melanogaster* Serotonin nicht durch EBONY alanyliert wird. Dies wurde bisher noch nicht gezeigt, da entsprechende *in vivo* Messungen bisher in *Drosophila melanogaster* nicht durchgeführt wurden. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass sowohl für Dopamin, als auch für Serotonin kein Unterschied in Abhängigkeit von WHITE existiert. Allerdings war β -Alanyldopamin in Abhängigkeit von WHITE signifikant erhöht in jenen Stämmen mit dem *CantonS* X-Chromosom. Dies deutet darauf hin, dass WHITE als Aufnahmetransporter in die Gliazellen wirkt und bei intaktem Gen durch erhöhte Dopaminaufnahme in die Astrocyten in Folge auch mehr β -Alanyldopamin gebildet wird. In den Stämmen mit dem *CantonS* X-Chromosom konnte zudem auch ein erhöhter Schlaf gemessen werden. Dies passt zu anderen Studien in denen gezeigt wurde, dass umgekehrt, bei einer Mutation von *ebony*, der Dopamingehalt ansteigt (Hodgetts & Konopka, 1973; Ramadan *et al.*, 1993). Im Rahmen der UPLC Messungen wurden auch die in dieser Arbeit etablierte Rekombinanten $w^-;Dat^{fmn},Sert^{16d}$ sowie $w^+;Dat^{fmn},Sert^{16d}$ getestet. Auf Grund der verkürzten Lebensspanne der Dreifachmutante $w^-;Dat^{fmn},Sert^{16d}$ in den Trikinetiks Monitoren, konnten dazu vergleichend keine Verhaltensdaten erhoben werden.

35. Die Rolle von *ebony* bei der Schlafregulation

Da die durchgeführten UPLC Messungen der Amintransportermutanten einen signifikanten Effekt des β -Alanyldopamingehalts in Abhängigkeit von *white* gezeigt haben, wurden die Transportermutanten mit der Mutation *ebony*¹ kombiniert. EBONY ist das für die Bildung von β -Alanyldopamin relevante, gliazellspezifische Enzym (Richardt *et al.*, 2002; Suh & Jackson, 2007). Bei dem Vergleich der Gesamtschlafmenge zeigte sich, dass diese im Falle der *ebony*¹ Mutation nicht von *white* beeinflusst ist. Sowohl *w*⁺; *ebony*¹, als auch *w*⁻; *ebony*¹ zeigten einen Gesamtschlaf vergleichbar zu der Kontrolle *w*⁻; *Sert*^{4d} bzw. *w*¹¹¹⁸. Dies stützt die zuvor aufgestellte These, dass der Effekt von *white* aus der Transportfunktion von Dopamin in die Gliazellen zur Bildung von β -Alanyldopamin besteht. Da im Falle der Mutation *ebony*¹ kein β -Alanyldopamin gebildet werden kann, wirkt sich auch die Mutation von *white* nicht weiter auf den Gesamtschlaf aus. Dazu passen ebenso die Daten, dass die Zunahme an Gesamtschlaf der Serotonintransportermutante mit funktionsfähigem WHITE-Transporter bei einer Kombination mit der Mutation *ebony*¹, nicht mehr zu beobachten ist, da in diesem Fall ebenfalls der durch WHITE stattfindende Transport von Dopamin in die Gliazellen nicht zu einer Alanylierung durch EBONY führt. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass *white* und *ebony* im Dopaminrecycling zwei aufeinander folgende Komponenten des Rücktransports von Dopamin über die Gliazellen sind. Phänotypisch wirkt sich dies auf den Gesamtschlaf aus und hat seine biochemische Ursache in der Synthese von β -Alanyldopamin. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass *ebony*¹ eine schwach ausgeprägte Aktivitätsrhythmik, sowie eine leichte Hyperaktivität aufweist (Newby & Jackson, 1991). Für *w*⁻; *ebony*¹ konnte zwar auch in meinen Experimenten eine reduzierte Rhythmik von 67,86% festgestellt werden, allerdings war in meinen Experimenten weder für auch *w*⁻; *ebony*¹, noch für *w*⁺; *ebony*¹ ein Einfluss auf die Periode ersichtlich, die in beiden Fällen 23,8h betrug und entspricht damit exakt der im Rahmen meiner Versuche für *w*¹¹¹⁸ ermittelten Periode. Die Hyperaktivität spiegelt sich nicht in Form von reduziertem Schlaf wieder, beide *ebony* Stämme zeigen eine normale und nicht voneinander oder *w*¹¹¹⁸ signifikant abweichende Schlafmenge. Dennoch könnte diese Hyperaktivität ebenso auf den veränderten β -Alanyldopamingehalt zurückzuführen sein, da β -Alanyldipeptide bei Hühnern für Hyperaktivität sorgen (Tsuneyoshi *et al.*, 2007). Eine UPLC-Messung der mit *ebony*¹ Stämme sowie den mit *ebony*¹ kombinierten Amintransportern steht noch aus, ist jedoch zum Zeitpunkt des Schreiben bereits veranlasst und könnte je nach Ergebnis die aufgestellte These über den Einfluss von *white* und *ebony* auf β -Alanyldopamin weiter bestärken.

Einen Sonderfall stellt der Genotyp $w^+;Dat^{fmn};ebony^1$ dar. Hier sind zwei Effekte zu beobachten. Zum einen kommt es zu einer drastischen Reduktion der Schlafmenge auf 10,4 Stunden (624 Minuten) (vgl. 16,9 Stunden [1015 min] für $w^-;Dat^{fmn};ebony^1$) zum anderen findet diese Reduktion ausschließlich in der Dunkelphase statt, wodurch die Mehrheit des Gesamtschlafes am Tag stattfindet und die Tiere nachtaktiv erscheinen. Der erhöhte Aktivitätsspiegel, kann durch einen Überschuss von Dopamin im synaptischen Spalt erklärt werden. Weshalb dieser jedoch nur bei funktionalem WHITE Transporter auftritt und nicht im w^{1118} Hintergrund ist schwer zu erklären. Eine anatomische Lokalisierung des WHITE Transporters im Gehirn, die wie bereits erwähnt in früheren Arbeiten gescheitert ist (Fjose *et al.*, 1984; Mackenzie *et al.*, 2000), könnte dahingehend weiterhelfen. Ein anderer Ansatz wäre, eine *white-Gal4* Linie zu etablieren, die aber letztlich keinen gesicherten Aufschluss über die natürliche Expression erlaubt, solange sie nicht mit einer Antikörperfärbung verifiziert werden kann. Zudem muss bedacht werden, dass WHITE möglicherweise auch Serotonin transportieren kann und somit der Phänotyp von $w^+;Dat^{fmn};ebony^1$ auch auf eine recht komplexe Interaktion bezüglich der Homöostase der beiden Transmitter Serotonin und Dopamin zurückzuführen sein kann.

36. Die ektopische Expression von *white* bzw. Hinunterregulierung mittels RNAi

Um die gewonnenen Erkenntnisse, über die Rolle des WHITE Transporters und die dadurch entstandene These einer Lokalisierung in den Gliazellen auf Verhaltensebene zu untermauern, wurde ein *UAS-white* Konstrukt genutzt und sowohl in allen Gliazellen (*repo-Gal4*), als auch in der Untergruppe, der astrocytenartigen Gliazellen (*NP3233-Gal4*) und in einem Großteil der dopaminergen Neuronen (*TH-Gal4*) exprimiert. In keinen der Fälle wich die Experimentgruppe im Schlafverhalten von den Kontrollgruppen ab. Ein Fallstrick dieser Versuche ist jedoch, dass sowohl die GAL4 Treiberlinien, als auch das UAS-Konstrukt eine als Transporter funktionsfähige *Miniwhite-Sequenz* enthalten. Diese wird bei der Etablierung genetisch veränderter Fliegen routinemäßig als Selektionsmarker genutzt um den Einbau der gewünschten DNA in das Genom der w^{1118} Fliegen anhand der Augenfarbe überprüfen zu können. Demzufolge enthalten auch die Kontrolltiere bereits eine *Miniwhite-Sequenz*. Dies könnte dazu führen, dass der durch die Expression des WHITE Transporters entstehende Effekt bezüglich des Schlafverhaltens bereits durch das Vorhandensein der *Miniwhite-Sequenz* verursacht wird. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass der WHITE Transporter in den getesteten Gal4 Linien, nicht doch eine für Schlaf relevante Funktion hat. Um die Experimente in dieser Richtung sinnvoll weiterzuführen wäre ein erneutes Klonieren eines *UAS-white* als auch der *Gal4*-Linien die

getestet werden sollen nötig, bei dem anstelle des *miniwhite* ein anderer Selektionsmarker, wie z. B. *yellow* verwendet wird.

Auch die Expression von *white-RNAi* in dopaminergen Neuronen führte zu keiner Veränderung des Schlafverhaltens im Vergleich zu den Kontrollen. Auch hier besteht das Problem darin, dass die RNAi möglicherweise durch die Expression von *miniwhite* kompensiert wird. Um dies zu testen wurde die *UAS-white-RNAi* mit dem Treiber GMR-Gal4 gekreuzt, der auch in den Komplexaugen exprimiert. Hier war eine deutliche Reduktion der roten Augenfarbe durch die RNAi zu beobachten. Das heißt, dass prinzipiell die *UAS-white-RNAi* in der Lage ist sich stärker auszuwirken, als die *Miniwhite-Sequenz*. Dies würde dafür sprechen, dass auch im Falle der Expression mit TH-Gal4 es zu einer ausreichenden RNAi Expression kommt und der ausbleibende Effekt darauf beruht, dass der WHITE Transporter nicht in den dopaminergen Neuronen exprimiert wird und deshalb seine Hinunterregulierung in diesen Zellen keinen Effekt verursacht. Bleibt nur noch anzumerken, dass GMR-Gal4 ein sehr starker Treiber ist und nicht ausgeschlossen werden kann, dass in anderen Gal4 Linien, die RNAi möglicherweise weniger effektiv sein wird. Dennoch hat sich das *UAS-white-RNAi* Konstrukt in Abhängigkeit von der Treiberstärke als wirksame Methode zur Hinunterregulierung der *white* Expression erwiesen. Eine Ausweitung der Versuche auf weitere Treiberlinien kann somit eine anatomische Zuordnung des für das Schlafverhalten relevanten WHITE Transporter ermöglichen. Insbesondere wurde die *white-RNAi*-Linie noch nicht mit den Gliazelltreibern exprimiert.

Abbildung 46 fasst die diskutierten Ergebnisse des Einflusses der Transportermutanten auf Schlaf nochmals grafisch zusammen:

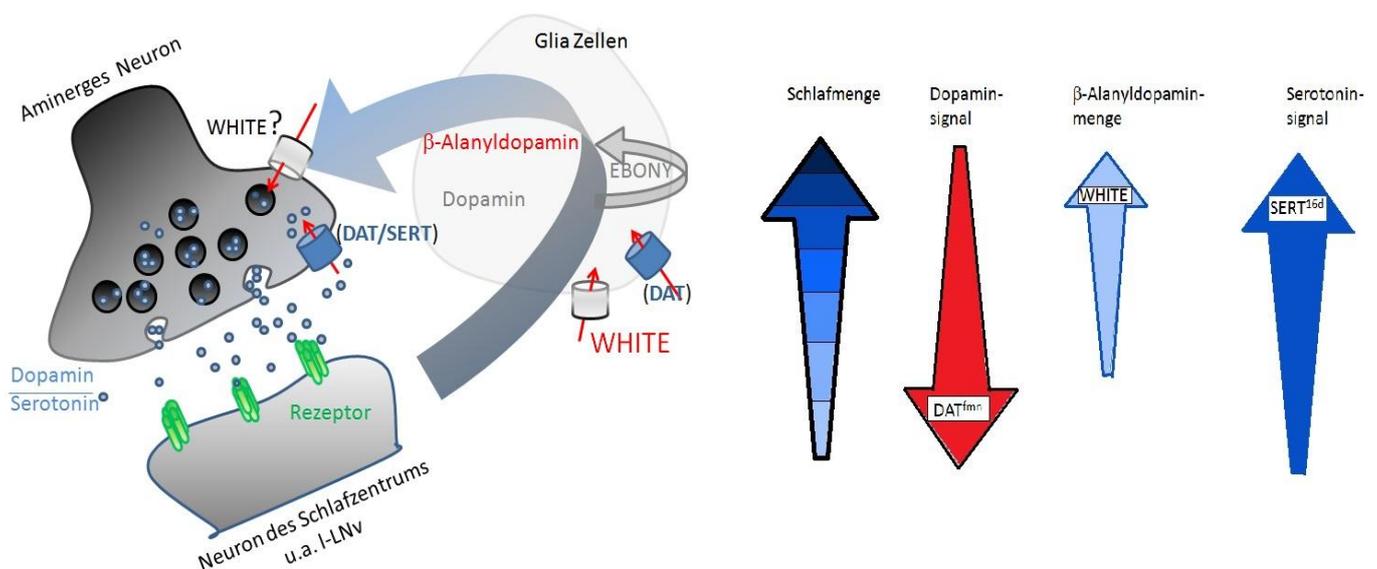


Abbildung 46 Modell der Regulation von Schlaf durch Dopamin und Serotonin

37. Circadiane Phänotypen der Transportermutanten

Die Experimente zu dem Aktivitätsverhalten der Transportermutanten von *Drosophila melanogaster* zeigten einen deutlichen Effekt in der Flexibilität der Maxima von Morgen- und Abendaktivität. Interessant ist, dass die Mutation von *white* alleine keinen Effekt hat, jedoch in Kombination mit der Serotonin- als auch Dopamintransportermutation einen signifikanten Unterschied bewirkt. So wandern die Maxima weniger stark mit den weiter auseinanderliegenden Zeitpunkten für *Licht An* und *Licht Aus* mit. Insbesondere das Morgenmaximum von $w^+;Dat^{fmn}$ bleibt bei L16:D8 noch in der Nacht, vor *Licht An*, wohingegen $w^-;Dat^{fmn}$ erst nach *Licht An* sein Maximum erreicht. Auch bei L20:D4 erreicht $w^+;Dat^{fmn}$ sein Maximum signifikant früher als $w^-;Dat^{fmn}$. Mit dem Abendmaximum verhält es sich konträr. Im Falle der Serotonintransportermutante hat die Mutation von *white* den selben Effekt wie bei Dat^{fmn} . Zusätzlich wird die Aktivität in beiden Transportermutanten durch die Mutation von *white* erhöht, vor allem am Tag. Eine Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF positiven Neuronen mit pdf-Gal4 zeigte keinen Einfluss auf die Lage der Aktivitätsmaxima in Kurz- und Langtag (L8:D16 bzw. L16:D8).

Die wenigen Publikationen, welche sich mit Lang- und Kurztag beschäftigen, fokussieren sich derzeit primär auf Wildtypstämme. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivitätsmaxima in Langtagbedingungen weiter auseinander rücken können (Rieger *et al.*, 2003). Dass dieses Auseinanderweichen der Maxima begrenzt ist, liegt vermutlich daran, dass unter Langtagbedingungen die Uhrproteine unterschiedlich reagieren und folglich PERIOD und TIMELESS nicht mehr synchronisiert sind (Shafer *et al.*, 2004; Menegazzi *et al.*, 2013). Zudem gibt es Unterschiede zwischen Wildtypstämmen bezüglich ihres Vorkommens auf der Nord-Süd-Achse der Erde. Nördlichere Stämme aus klimatisch kälteren Habitaten zeigen z. B. eine erhöhte Lichtempfindlichkeit (Rieger *et al.*, 2012). Auch beim Menschen ist bekannt, dass die Veränderung der Tageslänge dramatische Konsequenzen bezüglich der Inneren Uhr, als auch dem Transmitterhaushalt hat, insbesondere auf den Serotoninspiegel. Diese Erkenntnisse finden bereits in der Therapie von Saisonalen Depressionen Anwendung (Lader, 2007; McClung, 2007). In den hier gezeigten Experimenten ist zu beobachten, dass das *white*-Gen einen Effekt auf die Flexibilität der Maximaverschiebung in Langtagbedingungen hat. Da diese nur in Kombination mit Amintransportermutationen zu sehen ist, kann angenommen werden, dass das geringere Auseinanderweichen der Maxima bei defektem *white*-Gen auf den bereits in dieser Arbeit diskutierten Effekt des Dopamin-/Serotoningleichgewichts basiert. Somit könnten Dopamin und Serotonin eine modulierende Rolle bei der Anpassung an extreme Tageslängen haben und die Anpassungsfähigkeit der Inneren Uhr an solche beeinflussen. Derzeit gibt es noch keine Studien in

Drosophila melanogaster, die eine Beteiligung dieser beiden Transmitter unter Lang- und Kurztagbedingungen untersucht haben.

38. Etablierung eines Komponententests mittels des *period*-Luziferase-Reportersystems

Das *period*-Luziferase Konstrukt wurde verwendet um einen Komponententest durchzuführen (Stanewsky *et al.*, 1997). Erfolgreich konnte der bereits bekannte Effekt von Lithiumchlorid auf die Innere Uhr in Form einer Phasenverschiebung nachgewiesen werden. Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass diese Phasenverschiebung auf dem Einfluss von Lithium auf SHAGGY (*Drosophila melanogaster*) bzw. GSK3 β (Säuger) basiert (Iwahana *et al.*, 2004; Hirota *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2010). Auch in dem Vortest konnte dieser Effekt beobachtet werden. Demzufolge wurde das System genutzt, um im Rahmen dieser Arbeit die Komponenten der Lopac¹²⁸⁰ Bibliothek zu testen, welche nach der dazugehörigen Datenbank entweder Dopamin oder Serotonin zugeordnet werden (siehe Anhang). Nach dem ersten Testdurchgang wurden auffällige Komponenten notiert und unter ihnen jene ausgewählt, die in *Drosophila melanogaster* in anderem Zusammenhang bereits verwendet wurden, namentlich Quinpirole, Spiperone und SKF89626 (Andretic & Hirsh, 2000; Yuan & Lee, 2007; Titlow *et al.*, 2013), da die Angaben der Lopac¹²⁸⁰ Bibliothek sich auf Säuger beziehen und nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Substanzen in *Drosophila melanogaster* nicht zwangsweise dasselbe Wirkspektrum haben. Erste Testreihen mit diesen Komponenten zeigten, dass die Ergebnisse bezüglich der Phasenverschiebung durch diese Komponenten nicht reproduzierbar waren. Dem liegen methodische Ursachen zu Grunde. Da in den hier gezeigten Versuchen ganze Köpfe verwendet wurden, ist anzunehmen, dass die Cuticula ein freies Diffundieren der Komponenten erschwert. Möglicherweise war auf Grund der Vorverdünnung innerhalb der Lopac¹²⁸⁰ Bibliothek die Konzentration der Komponenten mit 100 μ M zu niedrig gewählt, da diese im Vergleich zu der genutzten Lithiumchlorid-Konzentration von 10mM um den Faktor 100 niedriger ist. Erste Versuche zur Kultivierung von frei präparierten Gehirnen meinerseits, um die Abschirmung durch die Cuticula zu verhindern, sind gescheitert. Die Gehirne starben innerhalb weniger Stunden, so dass kein Luziferasesignal gemessen werden konnte. Auch ist anzunehmen, dass bei Gehirnen in Kultur keine so hohe Konzentration der Komponenten mehr notwendig ist.

39. Schlaf bei verschiedenen Wildtypstämmen

Bei dem Test verschiedener Wildtypstämmen zeigte sich, dass sich die Gesamtschlafmenge zwischen 16,3 Stunden und 19,3 Stunden (979 Minuten und 1159 Minuten) unterschied. Dabei wick *OregonR* mit 19,3 Stunden (1159 Minuten) signifikant von allen anderen Stämmen ab und auch *Flotte Lotte*, welche die geringste Schlafmenge aufwies, unterschied sich zusätzlich noch signifikant von *CantonS* im Gesamtschlaf. Noch größer waren die Unterschiede in der Schlafabschnittsdauer, wobei hier zu beachten ist, dass *w¹¹¹⁸* zwar die in den vorigen Experimenten festgestellte Gesamtschlafmenge aufwies, jedoch mit einer Schlafabschnittslänge von 111 Minuten deutlich von früheren Experimente abwich (vgl. Kapitel 18.1: 67 Minuten). Dies zeigt, dass die Gesamtschlafmenge einen verlässlichen Messwert darstellt, die Schlafabschnittsdauer jedoch von Experiment zu Experiment stark abweichen kann. Deshalb wurde für die Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit auch primär der Gesamtschlaf, als auch die Schlafkurven, welche Auskunft über die Verteilung des Schlafes über den L:D-Zyklus geben, herangezogen. Auch was diese Verteilung angeht, gibt es deutlich Unterschiede zwischen den Wildtypstämmen. *HU 2-1* zeigt eine weniger stark ausgeprägte Mittagsschlafkurve während der Lichtphase und *Flotte Lotte* kann den Schlaf während der Nacht nicht aufrechterhalten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob *Flotte Lotte* eine im Vergleich zu anderen Wildtypstämmen abweichende Expression der GABA_B-Rezeptoren auf den I-LNV aufweist, die, wie in Kapitel 19 gezeigt, für die Aufrechterhaltung des Schlafes in der zweiten Nachthälfte relevant sind. Diese Varianz zeigt wie vielschichtig die Schlafregulation vom genetischen Hintergrund der Fliegen beeinflusst werden kann. Somit sind Experimente nur vergleichbar, wenn der genetische Hintergrund der Fliegen maximal vergleichbar gehalten wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Bezug auf die Kontrollen auf einen vergleichbaren genetischen Hintergrund geachtet. Um eine noch vergleichbarerern genetischen Hintergrund zu ermöglichen, muss im Einzelfall gegebenenfalls über mehrere Generation ausgekreuzt werden, wie das bei der Charakterisierung von neuen Schlafmutanten bereits gemacht worden ist (Koh *et al.*, 2008). Das *w¹¹¹⁸*, trotz der in dieser Arbeit aufgezeigten Effekte der *white*-Mutation, auf den Schlaf nur eine geringe Tendenz zu reduziertem Gesamtschlaf im Vergleich zu *CantonS* aufweist ist möglicherweise auf eine Anpassung über viele Generationen zurückzuführen. Interessant wäre ob das Auskreuzen von *w¹¹¹⁸* in den *CantonS* Hintergrund zu einer Fliege mit reduziertem Gesamtschlaf führen würde.

Bei der Videoaufnahme wurde versucht die Schlafposition festzuhalten. Erst bei beschleunigter Ansicht fielen gelegentlich Absenkbewegungen der Fliegen auf. Diese Ereignisse waren sehr selten, da bei den meisten Winkeln der Fliege zur Kamera die Bewegung nicht aufgenommen werden kann.

Unter den wenigen gefundenen Einzelfällen stellte die gezeigte Aufnahme von 8 Minuten 31 Sekunden die längste Zeitspanne dar, die gebraucht wurde, um die Schlafposition einzunehmen. Die in der Literatur verwendete Definition für Schlaf bei *Drosophila melanogaster* geht davon aus, dass eine Fliege nach 5 Minuten Bewegungslosigkeit schläft (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Die Absenkbewegung nach über 8 Minuten zeigt, dass diese Definition als im Grauzonenbereich angesiedelt betrachtet werden kann und eventuell auch Ruhephasen als Schlaf misst. In dieser Arbeit wurde eine strengere Definition für Schlaf angewandt, bei der erst ab 10 Minuten Ruhe das Verhalten als Schlaf gewertet wurde.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Dopamin, Serotonin und GABA auf das Schlafverhalten von *Drosophila melanogaster* genauer untersucht. Mit Hilfe von Mutanten in Wiederaufnahmetransportern für Dopamin und Serotonin konnte gezeigt werden, dass Dopamin und Serotonin entgegengesetzte Wirkungen auf die Schlafmenge der Fliegen haben. Dopamin hat eine schlafhemmende, Serotonin eine schlaffördernde Wirkung. Die Nutzung eines neuronal dopamindefizienten Fliegenstammes erweitert diese Erkenntnisse. Die Nutzung von RNAi zur Hinunterregulierung der Rezeptoren für Dopamin brachte keine weiteren Erkenntnisse, da sie zu keinem messbaren Effekt führen. Jedoch ergab eine parallel dazu durchgeführte Hinunterregulierung des GABA_BR2 Rezeptors, dass dieser maßgeblich für die Aufrechterhaltung des Schlafes in der zweiten Hälfte der Nacht verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass für diese Aufgabe vor allem ihre Expression in den I-LNv Neuronen relevant ist. Dabei ist für die GABA_BR2 Rezeptoren kein Effekt, für Dopamin und Serotonin nur in geringen Ausmaß ein Effekt auf die Innere Uhr in Form von gering veränderter Periode zu beobachten.

Durch eine Kombination der Transportermutanten für Dopamin und Serotonin mit dem intakten, als auch mutierten WHITE Transporter zeigte sich eine interessante Interaktion dieser drei Transporter bei der Regulation der Gesamtschlafmenge, wobei die *white* Mutation zu einer Reduzierung der Gesamtschlafmenge führt. UPLC Messungen der Stämme ergaben, dass der Effekt von *white* vermutlich auf dessen Einfluss auf den β -Alanyldopamingehalt der Fliegen basiert. β -Alanyldopamin wird bei dem Transport von Dopamin über die Gliazellen durch das Enzym EBONY gebildet, dessen Mutation in der Kombination mit intaktem WHITE und mutiertem Dopamintransporter zu einer drastischen Reduktion des Schlafes während der Nacht führt. Im Rahmen der Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass entgegen des bisherigen Wissens aus Zellkulturstudien in *Drosophila melanogaster* kein β -Alanylserotonin gebildet wird. Möglicherweise wird nur Dopamin, nicht jedoch Serotonin über die Gliazellen recycelt. Dies ist ein interessanter Unterschied, der sowohl eine zeitliche, als auch lokale Feinregulation der Gegenspieler Dopamin und Serotonin ermöglicht.

Die Untersuchung der Dimerpartner BROWN und SCARLET zeigte, dass lediglich BROWN zu einer Reduktion des Schlafes führt. Ein Effekt, der auch in einer Fliegenlinie mit spontaner *white* Mutation beobachtet werden konnte. Die genaue Funktion dieses Heterodimertransporters und seine neuronale Lokalisation wurden im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt. Dennoch liegt eine

Funktion als Dopamin- oder β -Alanyldopamintransporter in Gliazellen auf Grund der ermittelten Ergebnisse nahe.

Zusätzlich konnte zum ersten Mal in *Drosophila melanogaster* eine Funktion der Amintransporter bei der Anpassung der Inneren Uhr an extreme kurze bzw. lange Photoperioden gezeigt werden.

Eine anatomische Lokalisierung des WHITE Transporters im Gehirn von *Drosophila melanogaster*, die weitere Charakterisierung der Rolle des WHITE/BROWN Dimers und die Zuordnung bestimmter dopaminergischer und serotonergischer Neurone bei der Modulation der Aktivitätsmaxima stellen spannende Fragen für zukünftige Arbeiten dar.

Summary (in english)

The main focus in the present work, was the observation of the influence of dopamine, serotonin and GABA on the sleep behaviour of *Drosophila melanogaster*. By utilizing mutants for the dopamine transporter as well as the serotonin transporter, it was possible to show, that dopamine and serotonin have opposing effects on the total sleep amount of flies. Dopamine has a sleep inhibiting, serotonin a sleep promoting function. A neuronal dopamine deficient stock complemented those findings. Usage of RNAi to downregulate dopamine receptors did not enhance the information, since no measurable effect could be detected. But in parallel performed experiments with RNAi mediated knockdown of GABA_BR2 receptors could show its role in the maintenance of sleep during the second half of the night. I could show that especially the expression in the I-LN_v is needed for that. In case of the GABA_BR2 receptors no effect on the period was observed, for dopamine and serotonin only a minor effect on the clock in form of a mild period change accompanied those drastic sleep phenotypes.

Combining the amine transporter mutants with functional as well as mutated *white* led to some interesting observations regarding the interaction of those transporters in regulating total sleep, in which *white* reduces the total sleep amount. Following up those experiments with UPLC measurements, it was shown that presumably WHITE causes its effect due to its relevance for the amount of β -alanyldopamine in adult flies. When dopamine is transported into the glia cells, β -alanyldopamine is synthesized by the enzyme EBONY. The *ebony* mutant revealed a drastic sleep phenotype when combined with an intact WHITE transporter and a mutated dopamine transporter. This leads to a dramatic decrease of sleep during the night phase. When doing the UPLC measurements it was furthermore revealed, that unexpectedly regarding the knowledge from cell culture experiments, β -alanylserotonin cannot be detected. Presumably, only dopamine, but not serotonin is recycled by the glia cells. This interesting difference gives space for a temporal as well as for a local fine regulation of the dopamine and serotonin signals.

Investigating the dimer partners of WHITE, BROWN and SCARLET, I found that BROWN just as a spontaneous *white* mutation that I observed, led to a decrease of total sleep. The function of this heterodimer and its neuronal localisation in the brain remains unknown. Regarding the data presented in this work, it is likely that this dimer transports either dopamine or β -alanyldopamine in glia cells. Furthermore, I could observe that dopamine and serotonin change the ability of the circadian clock to adapt to different photoperiods, a so far unstudied phenotype.

An anatomical approach to localize the WHITE transporter in the brain of *Drosophila melanogaster* and a further characterization of the function of the WHITE/BROWN dimer, with regard to sleep and eventually the mapping of serotonergic and dopaminergic neurons, which modulate the activity peak responses, are questions for future work.

Anhang

Literaturverzeichnis

- Aeschbach, D. & Borbely, A.A. (1993) All-night dynamics of the human sleep EEG. *J Sleep Res*, **2**, 70-81.
- Agosto, J., Choi, J.C., Parisky, K.M., Stilwell, G., Rosbash, M. & Griffith, L.C. (2008) Modulation of GABAA receptor desensitization uncouples sleep onset and maintenance in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, **11**, 354-359.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D. & Meijer, J.H. (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol*, **15**, 886-893.
- Alekseyenko, O.V., Lee, C. & Kravitz, E.A. (2010) Targeted manipulation of serotonergic neurotransmission affects the escalation of aggression in adult male *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, **5**, e10806.
- Allada, R. & Siegel, J.M. (2008) Unearthing the phylogenetic roots of sleep. *Curr Biol*, **18**, R670-R679.
- Andreatic, R. & Hirsh, J. (2000) Circadian modulation of dopamine receptor responsiveness in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1873-1878.
- Andreatic, R., van Swinderen, B. & Greenspan, R.J. (2005) Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol*, **15**, 1165-1175.
- Aton, S.J., Huettnner, J.E., Straume, M. & Herzog, E.D. (2006) GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19188-19193.
- Awasaki, T., Lai, S.L., Ito, K. & Lee, T. (2008) Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *J Neurosci*, **28**, 13742-13753.
- Bingham, P.M., Levis, R. & Rubin, G.M. (1981) Cloning of DNA sequences from the white locus of *D. melanogaster* by a novel and general method. *Cell*, **25**, 693-704.
- Borbely, A.A. (1982) A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol*, **1**, 195-204.

- Borycz, J., Borycz, J.A., Kubow, A., Lloyd, V. & Meinertzhagen, I.A. (2008) *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J Exp Biol*, **211**, 3454-3466.
- Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Budnik, V. & White, K. (1987) Genetic dissection of dopamine and serotonin synthesis in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, **4**, 309-314.
- Campbell, S.S. & Tobler, I. (1984) Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev*, **8**, 269-300.
- Choi, H.J., Lee, C.J., Schroeder, A., Kim, Y.S., Jung, S.H., Kim, J.S., Kim do, Y., Son, E.J., Han, H.C., Hong, S.K., Colwell, C.S. & Kim, Y.I. (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, **28**, 5450-5459.
- Chung, B.Y., Kilman, V.L., Keath, J.R., Pitman, J.L. & Allada, R. (2009) The GABA(A) receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in *Drosophila*. *Curr Biol*, **19**, 386-390.
- Crocker, A., Shahidullah, M., Levitan, I.B. & Sehgal, A. (2010) Identification of a neural circuit that underlies the effects of octopamine on sleep:wake behavior. *Neuron*, **65**, 670-681.
- Dahdal, D., Reeves, D.C., Ruben, M., Akabas, M.H. & Blau, J. (2010) *Drosophila* pacemaker neurons require g protein signaling and GABAergic inputs to generate twenty-four hour behavioral rhythms. *Neuron*, **68**, 964-977.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. & Dickson, B.J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, **448**, 151-156.
- Dreesen, T.D., Johnson, D.H. & Henikoff, S. (1988) The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. *Mol Cell Biol*, **8**, 5206-5215.
- Dumermuth, G., Lange, B., Lehmann, D., Meier, C.A., Dinkelmann, R. & Molinari, L. (1983) Spectral analysis of all-night sleep EEG in healthy adults. *Eur Neurol*, **22**, 322-339.
- Ehlen, J.C., Novak, C.M., Karom, M.C., Gamble, K.L., Paul, K.N. & Albers, H.E. (2006) GABAA receptor activation suppresses Period 1 mRNA and Period 2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus during the mid-subjective day. *Eur J Neurosci*, **23**, 3328-3336.

- Enell, L., Hamasaka, Y., Kolodziejczyk, A. & Nassel, D.R. (2007) gamma-Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: immunocytochemical localization of GABA(B) receptors in relation to the GABA(A) receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J Comp Neurol*, **505**, 18-31.
- Ewart, G.D., Cannell, D., Cox, G.B. & Howells, A.J. (1994) Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J Biol Chem*, **269**, 10370-10377.
- Ewer, J., Frisch, B., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M. & Hall, J.C. (1992) Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci*, **12**, 3321-3349.
- Featherstone, D.E. & Broadie, K. (2000) Surprises from *Drosophila*: genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Res Bull*, **53**, 501-511.
- Fjose, A., Polito, L.C., Weber, U. & Gehring, W.J. (1984) Developmental expression of the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Embo J*, **3**, 2087-2094.
- Fogle, K.J., Parson, K.G., Dahm, N.A. & Holmes, T.C. (2011) CRYPTOCHROME is a blue-light sensor that regulates neuronal firing rate. *Science*, **331**, 1409-1413.
- Foltenyi, K., Greenspan, R.J. & Newport, J.W. (2007) Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, **10**, 1160-1167.
- Fragoulis, E.G. & Sekeris, C.E. (1975) Purification and characteristics of DOPA-decarboxylase from the integument of *Calliphora vicina* larvae. *Arch Biochem Biophys*, **168**, 15-25.
- Friggi-Grelin, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J. & Birman, S. (2003) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol*, **54**, 618-627.
- Frisch, B., Hardin, P.E., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M. & Hall, J.C. (1994) A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron*, **12**, 555-570.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L. & Pin, J.P. (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *Embo J*, **20**, 2152-2159.
- Giang, T., Ritze, Y., Rauchfuss, S., Ogueta, M. & Scholz, H. (2011) The serotonin transporter expression in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, **25**, 17-26.

- Glaser, W. (1978) *Varianzanalyse. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.*
- Gloor, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M. & Engels, W.R. (1993) Type I repressors of P element mobility. *Genetics*, **135**, 81-95.
- Gmeiner, F., Kolodziejczyk, A., Yoshii, T., Rieger, D., Nassel, D.R. & Helfrich-Förster, C. (2013) GABAB receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, **216**, 3837-3843.
- Gotzes, F., Balfanz, S. & Baumann, A. (1994) Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels*, **2**, 131-141.
- Grima, B., Chelot, E., Xia, R. & Rouyer, F. (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, **431**, 869-873.
- Hamasaka, Y. & Nassel, D.R. (2006) Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*. *J Comp Neurol*, **494**, 314-330.
- Hamasaka, Y., Wegener, C. & Nassel, D.R. (2005) GABA modulates *Drosophila* circadian clock neurons via GABAB receptors and decreases in calcium. *J Neurobiol*, **65**, 225-240.
- Han, K.A., Millar, N.S., Grotewiel, M.S. & Davis, R.L. (1996) DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*, **16**, 1127-1135.
- Hearn, M.G., Ren, Y., McBride, E.W., Reveillaud, I., Beinborn, M. & Kopin, A.S. (2002) A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14554-14559.
- Helfrich-Förster, C. (1995) The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 612-616.
- Helfrich-Förster, C. (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav*, **4**, 65-76.
- Helfrich-Förster, C., Shafer, O.T., Wulbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D. & Taghert, P. (2007a) Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*, **500**, 47-70.
- Helfrich-Förster, C., Yoshii, T., Wulbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Bachleitner, W., Cusamano, P. & Rouyer, F. (2007b) The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **72**, 517-525.

- Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A. & Pack, A.I. (2000) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, **25**, 129-138.
- Hirota, T., Lewis, W.G., Liu, A.C., Lee, J.W., Schultz, P.G. & Kay, S.A. (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20746-20751.
- Hirsh, J., Riemensperger, T., Coulom, H., Iche, M., Coupar, J. & Birman, S. (2010) Roles of dopamine in circadian rhythmicity and extreme light sensitivity of circadian entrainment. *Curr Biol*, **20**, 209-214.
- Hodgetts, R.B. & Konopka, R.J. (1973) Tyrosine and catecholamine metabolism in wild-type *Drosophila melanogaster* and a mutant, ebony. *J Insect Physiol*, **19**, 1211-1220.
- Iwahana, E., Akiyama, M., Miyakawa, K., Uchida, A., Kasahara, J., Fukunaga, K., Hamada, T. & Shibata, S. (2004) Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci*, **19**, 2281-2287.
- Jackson, F.R. & Haydon, P.G. (2008) Glial cell regulation of neurotransmission and behavior in *Drosophila*. *Neuron Glia Biol*, **4**, 11-17.
- Jackson, F.R., Newby, L.M. & Kulkarni, S.J. (1990) *Drosophila* GABAergic systems: sequence and expression of glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem*, **54**, 1068-1078.
- Joiner, W.J., Crocker, A., White, B.H. & Sehgal, A. (2006) Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature*, **441**, 757-760.
- Kain, J.S., Stokes, C. & de Bivort, B.L. (2012) Phototactic personality in fruit flies and its suppression by serotonin and white. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 19834-19839.
- Kaiser, A. (2009) Der Einfluss von veränderter dSERT Funktion auf Alkohol-induziertes -verhalten bei *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit Universität Würzburg*.
- Kaneko, M. (1998) Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 652-658.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. & Bettler, B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, **396**, 683-687.

- Kim, K., Lee, Y.S., Harris, D., Nakahara, K. & Carthew, R.W. (2006) The RNAi pathway initiated by Dicer-2 in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 39-44.
- Klein, B.A., Olzowy, K.M., Klein, A., Saunders, K.M. & Seeley, T.D. (2008) Caste-dependent sleep of worker honey bees. *J Exp Biol*, **211**, 3028-3040.
- Ko, H.W., Kim, E.Y., Chiu, J., Vanselow, J.T., Kramer, A. & Edery, I. (2010) A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of PERIOD nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3 β /SGG in circadian clocks. *J Neurosci*, **30**, 12664-12675.
- Koh, K., Joiner, W.J., Wu, M.N., Yue, Z., Smith, C.J. & Sehgal, A. (2008) Identification of SLEEPLESS, a sleep-promoting factor. *Science*, **321**, 372-376.
- Kondrashov, A., Houle, D., Kondrashov, T. & Dean, M. (2006) flies are on the way - descriptions.
- Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2112-2116.
- Konopka, R.J., Pittendrigh, C. & Orr, D. (1989) Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J Neurogenet*, **6**, 1-10.
- Kula-Eversole, E., Nagoshi, E., Shang, Y., Rodriguez, J., Allada, R. & Rosbash, M. (2010) Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 13497-13502.
- Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J. & Jackson, F.R. (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci*, **25**, 7377-7384.
- Lader, M. (2007) Limitations of current medical treatments for depression: disturbed circadian rhythms as a possible therapeutic target. *Eur Neuropsychopharmacol*, **17**, 743-755.
- Lebestky, T., Chang, J.S., Dankert, H., Zelnik, L., Kim, Y.C., Han, K.A., Wolf, F.W., Perona, P. & Anderson, D.J. (2009) Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron*, **64**, 522-536.
- Lee, D., Su, H. & O'Dowd, D.K. (2003) GABA receptors containing Rdl subunits mediate fast inhibitory synaptic transmission in *Drosophila* neurons. *J Neurosci*, **23**, 4625-4634.
- Lindsley, D.L. & Grell, E.H. (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Institution of Washington Publication*, 469pp.

- Liu, C. & Reppert, S.M. (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, **25**, 123-128.
- Liu, Q., Liu, S., Kodama, L., Driscoll, M.R. & Wu, M.N. (2012) Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in *Drosophila*. *Curr Biol*, **22**, 2114-2123.
- Livingstone, M.S. & Tempel, B.L. (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature*, **303**, 67-70.
- Lloyd, V.K., Sinclair, D.A., Alperyn, M. & Grigliatti, T.A. (2002) Enhancer of garnet/deltaAP-3 is a cryptic allele of the white gene and identifies the intracellular transport system for the white protein. *Genome*, **45**, 296-312.
- Mackenzie, S.M., Howells, A.J., Cox, G.B. & Ewart, G.D. (2000) Sub-cellular localisation of the white/scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, **108**, 239-252.
- Mao, Z. & Davis, R.L. (2009) Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits*, **3**, 5.
- McCarthy, E.V., Wu, Y., Decarvalho, T., Brandt, C., Cao, G. & Nitabach, M.N. (2011) Synchronized bilateral synaptic inputs to *Drosophila melanogaster* neuropeptidergic rest/arousal neurons. *J Neurosci*, **31**, 8181-8193.
- McClung, C.A. (2007) Clock genes and bipolar disorder: implications for therapy. *Pharmacogenomics*, **8**, 1097-1100.
- Menegazzi, P., Vanin, S., Yoshii, T., Rieger, D., Hermann, C., Dusik, V., Kyriacou, C.P., Helfrich-Förster, C. & Costa, R. (2013) *Drosophila* clock neurons under natural conditions. *J Biol Rhythms*, **28**, 3-14.
- Mezler, M., Muller, T. & Raming, K. (2001) Cloning and functional expression of GABA(B) receptors from *Drosophila*. *Eur J Neurosci*, **13**, 477-486.
- Mistlberger, R.E. (2005) Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Brain Res Rev*, **49**, 429-454.
- Monastirioti, M. (1999) Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech*, **45**, 106-121.
- Morgan, T.H. (1910) Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, **32**, 120-122.

- Moruzzi, G. & Magoun, H.W. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **1**, 455-473.
- Nassel, D.R. & Elekes, K. (1992) Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res*, **267**, 147-167.
- Newby, L.M. & Jackson, F.R. (1991) *Drosophila ebony* mutants have altered circadian activity rhythms but normal eclosion rhythms. *J Neurogenet*, **7**, 85-101.
- Ni, J.Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L.P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L. & Perrimon, N. (2008) Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*, **5**, 49-51.
- Nitz, D.A., van Swinderen, B., Tononi, G. & Greenspan, R.J. (2002) Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, **12**, 1934-1940.
- Okada, R., Awasaki, T. & Ito, K. (2009) Gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated neural connections in the *Drosophila* antennal lobe. *J Comp Neurol*, **514**, 74-91.
- Parisky, K.M., Agosto, J., Pulver, S.R., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J.J., Kang, K., Liu, X., Garrity, P.A., Rosbash, M. & Griffith, L.C. (2008) PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron*, **60**, 672-682.
- Park, J.H., Helfrich-Förster, C., Lee, G., Liu, L., Rosbash, M. & Hall, J.C. (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3608-3613.
- Peschel, N. & Helfrich-Förster, C. (2011) Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **585**, 1435-1442.
- Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P. & Allada, R. (2006) A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature*, **441**, 753-756.
- Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C. & Kay, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, **278**, 1632-1635.
- Raizen, D.M., Zimmerman, J.E., Maycock, M.H., Ta, U.D., You, Y.J., Sundaram, M.V. & Pack, A.I. (2008) Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, **451**, 569-572.
- Ramadan, H., Alawi, A.A. & Alawi, M.A. (1993) Catecholamines in *Drosophila melanogaster* (wild type and ebony mutant) decuticularized retinas and brains. *Cell Biol Int*, **17**, 765-771.

- Renn, S.C., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C. & Taghert, P.H. (1999) A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, **99**, 791-802.
- Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. & Hovemann, B.T. (2003) Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J Biol Chem*, **278**, 41160-41166.
- Richardt, A., Rybak, J., Stortkuhl, K.F., Meinertzhagen, I.A. & Hovemann, B.T. (2002) Ebony protein in the *Drosophila* nervous system: optic neuropile expression in glial cells. *J Comp Neurol*, **452**, 93-102.
- Rieger, D., Peschel, N., Dusik, V., Glotz, S. & Helfrich-Förster, C. (2012) The ability to entrain to long photoperiods differs between 3 *Drosophila melanogaster* wild-type strains and is modified by twilight simulation. *J Biol Rhythms*, **27**, 37-47.
- Rieger, D., Shafer, O.T., Tomioka, K. & Helfrich-Förster, C. (2006) Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, **26**, 2531-2543.
- Rieger, D., Stanewsky, R. & Helfrich-Förster, C. (2003) Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*, **18**, 377-391.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., Hirsh, J. & Birman, S. (2011) Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 834-839.
- Root, C.M., Masuyama, K., Green, D.S., Enell, L.E., Nassel, D.R., Lee, C.H. & Wang, J.W. (2008) A presynaptic gain control mechanism fine-tunes olfactory behavior. *Neuron*, **59**, 311-321.
- Sauer, S., Herrmann, E. & Kaiser, W. (2004) Sleep deprivation in honey bees. *J Sleep Res*, **13**, 145-152.
- Schmid, B., Helfrich-Förster, C. & Yoshii, T. (2011) A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *J Biol Rhythms*, **26**, 464-467.
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B. & Young, M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, **263**, 1603-1606.
- Sepp, K.J., Schulte, J. & Auld, V.J. (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol*, **238**, 47-63.

- Shafer, O.T., Levine, J.D., Truman, J.W. & Hall, J.C. (2004) Flies by night: Effects of changing day length on *Drosophila*'s circadian clock. *Curr Biol*, **14**, 424-432.
- Shang, Y., Griffith, L.C. & Rosbash, M. (2008) Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 19587-19594.
- Shang, Y., Haynes, P., Pirez, N., Harrington, K.I., Guo, F., Pollack, J., Hong, P., Griffith, L.C. & Rosbash, M. (2011) Imaging analysis of clock neurons reveals light buffers the wake-promoting effect of dopamine. *Nat Neurosci*, **14**, 889-895.
- Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J. & Tononi, G. (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 1834-1837.
- Sheeba, V., Fogle, K.J., Kaneko, M., Rashid, S., Chou, Y.T., Sharma, V.K. & Holmes, T.C. (2008) Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Curr Biol*, **18**, 1537-1545.
- Sokolove, P.G. & Bushnell, W.N. (1978) The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol*, **72**, 131-160.
- Srivastava, D.P., Yu, E.J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T. & Evans, P.D. (2005) Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J Neurosci*, **25**, 6145-6155.
- Stanewsky, R., Frisch, B., Brandes, C., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M. & 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.
- Suh, J. & Jackson, F.R. (2007) *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron*, **55**, 435-447.
- Sullivan, D.T., Bell, L.A., Paton, D.R. & Sullivan, M.C. (1980) Genetic and functional analysis of tryptophan transport in Malpighian tubules of *Drosophila*. *Biochem Genet*, **18**, 1109-1130.
- Sullivan, D.T. & Sullivan, M.C. (1975) Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet*, **13**, 603-613.
- Tearle, R.G., Belote, J.M., McKeown, M., Baker, B.S. & Howells, A.J. (1989) Cloning and characterization of the scarlet gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **122**, 595-606.
- Titlow, J.S., Rufer, J.M., King, K.E. & Cooper, R.L. (2013) Pharmacological analysis of dopamine modulation in the *Drosophila melanogaster* larval heart. *Physiol Rep*, **1**, e00020.

- True, J.R., Yeh, S.D., Hovemann, B.T., Kemme, T., Meinertzhagen, I.A., Edwards, T.N., Liou, S.R., Han, Q. & Li, J. (2005) *Drosophila tan* encodes a novel hydrolase required in pigmentation and vision. *PLoS Genet*, **1**, e63.
- Tsuneoyoshi, Y., Tomonaga, S., Asechi, M., Morishita, K., Denbow, D.M. & Furuse, M. (2007) Central administration of dipeptides, beta-alanyl-BCAAs, induces hyperactivity in chicks. *BMC Neurosci*, **8**, 37.
- Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S. & Kume, K. (2012) Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, **15**, 1516-1523.
- Valles, A.M. & White, K. (1988) Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. *J Comp Neurol*, **268**, 414-428.
- van den Pol, A.N. & Tsujimoto, K.L. (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*, **15**, 1049-1086.
- Vanin, S., Bhutani, S., Montelli, S., Menegazzi, P., Green, E.W., Pegoraro, M., Sandrelli, F., Costa, R. & Kyriacou, C.P. (2012) Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature*, **484**, 371-375.
- Wagner, S., Castel, M., Gainer, H. & Yarom, Y. (1997) GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, **387**, 598-603.
- Wilson, R.I. & Laurent, G. (2005) Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *J Neurosci*, **25**, 9069-9079.
- Wu, M.N., Koh, K., Yue, Z., Joiner, W.J. & Sehgal, A. (2008) A genetic screen for sleep and circadian mutants reveals mechanisms underlying regulation of sleep in *Drosophila*. *Sleep*, **31**, 465-472.
- Yarali, A., Krischke, M., Michels, B., Saumweber, T., Mueller, M.J. & Gerber, B. (2009) Genetic distortion of the balance between punishment and relief learning in *Drosophila*. *J Neurogenet*, **23**, 235-247.
- Yuan, N. & Lee, D. (2007) Suppression of excitatory cholinergic synaptic transmission by *Drosophila* dopamine D1-like receptors. *Eur J Neurosci*, **26**, 2417-2427.
- Yuan, Q., Joiner, W.J. & Sehgal, A. (2006) A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Curr Biol*, **16**, 1051-1062.

Yuan, Q., Lin, F., Zheng, X. & Sehgal, A. (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron*, **47**, 115-127.

Zhdanova, I.V., Wang, S.Y., Leclair, O.U. & Danilova, N.P. (2001) Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res*, **903**, 263-268.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 <i>Drosophila melanogaster</i> Männchen.....	9
Abbildung 2 Schematische Übersicht der neuronalen Schlafzentren in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Abbildung 3 Die Uhrneuronen von <i>Drosophila melanogaster</i> aus (Helfrich-Förster et al., 2007a).....	12
Abbildung 4 Strukturformel Dopamin	13
Abbildung 5 Strukturformel Serotonin	15
Abbildung 6 Strukturformel GABA	16
Abbildung 7 Schema der geklebten Objektträger	20
Abbildung 8 Beispiel eines Mikrosporidienbefalls	31
Abbildung 9 Aktivität von Dat^{fmn} und w^{1118}	32
Abbildung 11 Aktogramme von w^{1118} und Dat^{fmn}	33
Abbildung 10 Gesamtschlaf und Schlafabschnittslänge von $w^-;Dat^{fmn}$ und w^{1118}	33
Abbildung 12 Schlaf pro Stunde von Dat^{fmn} und w^{1118}	34
Abbildung 13 Schlaf pro Stunde von neuronal dopamindefizienten Fliegen und Kontrolle	35
Abbildung 14 Aktivität von $dTHg;ple$ und $dTHg^{FS+/-};ple$	36
Abbildung 15 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen.....	37
Abbildung 16 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in allen Uhrgeweben.....	39
Abbildung 17 Schlaf pro Stunde bei Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in sechs bis acht DN1 Neuronen.....	40
Abbildung 18 Aktivitätsprofile von $w^-;Sert^{4d}$ und $w^-;Sert^{16d}$	41
Abbildung 19 Schlaf pro Stunde der Serotonintransportermutante und Kontrolle	42
Abbildung 20 Die Hinunterregulierung der $GABA_B$ -R2 Rezeptoren in den PDF Neuronen verringert den Schlaf in der zweiten Hälfte der Nacht	45
Abbildung 21 Hinunterregulierung der $GABA_B$ R2 Rezeptoren in den l-LNV erhöht den Aktivitätslevel.....	46
Abbildung 22 Die PDF positiven lateralen Neurone (l-LNV und s-LNV) exprimieren den $GABA_B$ R2 Rezeptor	47
Abbildung 23 Schlaf pro Stunde des roo^{22} Stammes und der spontanen white Mutation in selbigem	49
Abbildung 24 Schlaf pro Stunde von brown und scarlet Mutanten.....	50
Abbildung 25 Vergleich der Gesamtschlafmenge der brown und scarlet als auch roo Stämme.....	51
Abbildung 26 Schlaf pro Stunde von $w^-;Dat^{fmn}$ und $w^+;Dat^{fmn}$	52
Abbildung 27 Schlaf pro Stunde von $w^-;Sert^{16d} / w^+;Sert^{16d} / w^-;Sert^{4d}$ und $w^+;Sert^{4d}$	53
Abbildung 28 PCR Nachweis der erfolgreichen Rekombination von Dat^{fmn} und $Sert^{16d}$	54
Abbildung 29 UPLC Messung Dopamin, β -Alanyldopamin und Serotonin in Köpfen	57
Abbildung 30 Übersicht Gesamtschlaf der Kombinationen aus $white/Dat^{fmn}/Sert^{16d}/Sert^{4d}$ und $ebony^1$	58
Abbildung 32 Schlafkurven von $w^-;Dat^{fmn};e^1$ und $w^+;Dat^{fmn};e^1$	59
Abbildung 31 Aktogramme von $w^-;Dat^{fmn};e^1$ und $w^+;Dat^{fmn};e^1$	59
Abbildung 33 Schlafkurven von der Expression von UAS-white in Gliazellen	60

<i>Abbildung 34 Schlafkurven von der Expression von UAS-white und UAS-white-RNAi in dopaminergen Neuronen</i>	62
<i>Abbildung 35 Expression der UAS-white-RNAi mit GMR-Gal4</i>	63
<i>Abbildung 36 Durchschnittstage der Kombinationen aus Transportermutanten in unterschiedlichen Tageslängen</i>	64
<i>Abbildung 37 Lage der Aktivitätsmaxima von Transportermutanten bei unterschiedlichen Tageslängen</i>	65
<i>Abbildung 38 Gesamtaktivität für die Licht- bzw. Dunkelphase der Transportermutanten</i>	67
<i>Abbildung 39 Durchschnittstage der Hinunterregulierung der Dopaminrezeptoren in den PDF-Neuronen in Lang- und Kurztagbedingungen</i>	68
<i>Abbildung 40 Der Effekt von LiCl auf XLG-luc</i>	69
<i>Abbildung 41 Beispiel gemittelter Kurven der Lumineszenz von je 10 gemessenen Köpfen</i>	71
<i>Abbildung 42 Phasenverschiebung in zwei unabhängigen Experimenten</i>	72
<i>Abbildung 43 Schlaf pro Stunde diverser Wildtypstämme</i>	73
<i>Abbildung 44 Übersicht Gesamtschlaf und durchschnittliche Schlafabschnittslänge verschiedener Wildtypen</i>	74
<i>Abbildung 45 Schlafposition Drosophila melanogaster</i>	75
<i>Abbildung 46 Modell der Regulation von Schlaf durch Dopamin und Serotonin</i>	88

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Primer</i>	23
<i>Tabelle 2 Fliegenstämme</i>	26
<i>Tabelle 3 Übersicht der Ergebnisse der Hinunterregulierung von Dopaminrezeptoren in PDF Neuronen</i>	38
<i>Tabelle 4 Auffällige Komponenten aus erstem Screen</i>	70
<i>Tabelle 5 Verwendete Komponenten der Lopac Bibliothek</i>	114

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μW	Mikrowatt
aME	Akkzessorische Medulla
cm ²	Quadratcentimeter
cyr	Cryptochrom
D	Dunkelphase
DD	Dauerdunkel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dorsale Neuronen
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EEG	Elektroencephalogramm
et al.	„ <i>et altera</i> “ = und andere
GABA	γ-Aminobuttersäure
gDNS	Genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H-B	Hofbauer-Buchner
HF-Buffer	High Fidelity Puffer
L	Lichtphase
LD	Licht Dunkel Zyklus
I-LNv	Große (large) Lateralneurone ventral
LPN	Lateral posteriore Neuronen
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl der Versuchstiere
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum = Ziegen Serum
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
NTP	Nukleotidtriphosphat
p	p-Wert Statistik
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpufferlösung
<i>per</i> ⁰	Period zero Mutation
<i>per</i> ^L	Period long Mutation
<i>per</i> ^S	Period short Mutation
PFA	Paraformaldehyd
R1-7	Photorezeptorzelle R1-7
REM	Rapid eye movement = schnelle Augenbewegung
ReSH	Repetitive Startle induced Hyperaktivität
s	Sekunde

S2	Schneider Zellen Drosophila
SCN	Suprachiasmatischer Nukleus
s-LNv	Kleine (small) Lateralneurone ventral
TTX	Tetrodotoxin
u.a.	unter anderem
usw	Und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDRC	Vienna Drosophila RNAi Centre
vgl	vergleiche
z.B.	Zum Beispiel

LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek

Tabelle 5 Verwendete Komponenten der Lopac Bibliothek

Name	Klasse	Selectivität
Amantadine hydrochloride	Dopamine	
Amperozide hydrochloride	Serotonin	
Tryptamine hydrochloride	Serotonin	
GR 46611	Serotonin	5-HT1D
Reserpine	Serotonin	Uptake
(+)-Butaclamol hydrochloride	Dopamine	
Apomorphine hydrochloride hemihydrate	Dopamine	
Paroxetine hydrochloride hemihydrate (MW = 374.83)	Serotonin	Reuptake
SKF-89145 hydrobromide	Dopamine	D1
Alaproclate hydrochloride	Serotonin	Reuptake
A-77636 hydrochloride	Dopamine	D1
SB 200646 hydrochloride	Serotonin	5-HT2C/2B
BP 897	Dopamine	D3
Bupropion hydrochloride	Dopamine	Reuptake
Chlorprothixene hydrochloride	Dopamine	D2
(+)-Bromocriptine methanesulfonate	Dopamine	D2
BRL 15572	Serotonin	5-HT1D
(±)-Butaclamol hydrochloride	Dopamine	D2>D1
BMY 7378 dihydrochloride	Serotonin	5-HT1A
BRL 54443 maleate	Serotonin	5-HT1E/1F
R(+)-6-Bromo-APB hydrobromide	Dopamine	D1/D5
Bupirone hydrochloride	Serotonin	5-HT1A
BTCP hydrochloride	Dopamine	Reuptake
Cyproheptadine hydrochloride	Serotonin	5-HT2
Chlorpromazine hydrochloride	Dopamine	
SB 204741	Serotonin	5-HT2B
Citalopram hydrobromide	Serotonin	Reuptake
Clozapine	Dopamine	D4 > D2,D3
GR 113808	Serotonin	5-HT4
N-(2-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl)-3-methoxybenzamide	Dopamine	D4
Cyclobenzaprine hydrochloride	Serotonin	5-HT2
Clomipramine hydrochloride	Serotonin	Reuptake
CGS-12066A maleate	Serotonin	5-HT1B
1-(m-Chlorophenyl)-biguanide hydrochloride	Serotonin	5-HT3
Droperidol	Dopamine	D1/D2
5-Carboxamidotryptamine maleate	Serotonin	5-HT7
L-3,4-Dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride	Dopamine	
Dihydroergotamine methanesulfonate	Serotonin	
N-Methyldopamine hydrochloride	Dopamine	
(±)-Chloro-APB hydrobromide	Dopamine	D1
R(-)-N-Allylnorapomorphine hydrobromide	Dopamine	
N,N-Dipropyl-5-carboxamidotryptamine maleate	Serotonin	5-HT1A
Dihydroergocristine methanesulfonate	Dopamine	
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	Dopamine	

6,7-ADTN hydrobromide	Dopamine	
R(-)-Apocodeine hydrochloride	Dopamine	
Domperidone	Dopamine	D2
R(-)-Propylnorapomorphine hydrochloride	Dopamine	D2
(±)-SKF-38393 hydrochloride	Dopamine	D1
R(-)-2,10,11-Trihydroxyaporphine hydrobromide	Dopamine	D2
GBR-12909 dihydrochloride	Dopamine	Reuptake
Venlafaxine hydrochloride	Serotonin	5-HT and NE
L-3,4-Dihydroxyphenylalanine	Dopamine	
R(-)-2,10,11-Trihydroxy-N-propylnoraporphine hydrobromide	Dopamine	D2
R(+)-SCH-23390 hydrochloride	Dopamine	D1
Dipropyldopamine hydrobromide	Dopamine	
(±)-DOI hydrochloride	Serotonin	5-HT ₂ /5-HT _{1C}
S(-)-Eticlopride hydrochloride	Dopamine	D2
Fluvoxamine maleate	Serotonin	Reuptake
Fluspirilene	Dopamine	D2/D1
Fusaric acid	Dopamine	Dopamine beta-hydroxylase
cis-(Z)-Flupenthixol dihydrochloride	Dopamine	
S-(+)-Fluoxetine hydrochloride	Serotonin	Reuptake
Fluphenazine dihydrochloride	Dopamine	D1/D2
Fenoldopam bromide	Dopamine	D1
Fluoxetine hydrochloride	Serotonin	Reuptake
GBR-12935 dihydrochloride	Dopamine	Reuptake
R-(+)-7-Hydroxy-DPAT hydrobromide	Dopamine	D3
(±)-8-Hydroxy-DPAT hydrobromide	Serotonin	5-HT _{1A}
Haloperidol	Dopamine	D2/D1
1-(4-Hydroxybenzyl)imidazole-2-thiol	Dopamine	Dopamine beta-hydroxylase
Dopamine hydrochloride	Dopamine	
Serotonin hydrochloride	Serotonin	
(±)-7-Hydroxy-DPAT hydrobromide	Dopamine	D3
GR 55562 dihydrobromide	Serotonin	5-HT _{1B} /1D
5-Hydroxy-L-tryptophan	Serotonin	
4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid	Dopamine	
5-Hydroxyindolacetic acid	Serotonin	
R-(+)-8-Hydroxy-DPAT hydrobromide	Serotonin	5-HT _{1A}
JL-18	Dopamine	D4>D2
LY-367,265	Serotonin	Reuptake
LY-310,762 hydrochloride	Serotonin	5-HT _{1D}
VER-3323 hemifumarate salt	Serotonin	5-HT _{2C} /5-HT _{2B}
Molindone hydrochloride	Dopamine	D2
Indatraline hydrochloride	Dopamine	Reuptake
LE 300	Dopamine	D1
Imipramine hydrochloride	Serotonin	Reuptake
Loxapine succinate	Dopamine	
L-750,667 trihydrochloride	Dopamine	D4
p-MPPI hydrochloride	Serotonin	5-HT _{1A}
Metergoline	Serotonin	5-HT ₂ /5-HT _{1D}
L-741,626	Dopamine	D2
N-omega-Methyl-5-hydroxytryptamine oxalate salt	Serotonin	
Mianserin hydrochloride	Serotonin	
cis(+/-)-8-OH-PBZI hydrobromide	Dopamine	D3
BW 723C86	Serotonin	5-HT _{2B}
Metoclopramide hydrochloride	Dopamine	D2

O-Methylserotonin hydrochloride	Serotonin	
GR 127935 hydrochloride hydrate	Serotonin	5-HT1B/1D
L-745,870 hydrochloride	Dopamine	D4
Methylergonovine maleate	Dopamine	
ML 10302	Serotonin	5-HT4
Methiothepin mesylate	Serotonin	5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT6
2-Methyl-5-hydroxytryptamine maleate	Serotonin	5-HT3
SB-215505	Serotonin	5-HT2B
alpha-Methyl-5-hydroxytryptamine maleate	Serotonin	5-HT2
p-MPPF dihydrochloride	Serotonin	5-HT1A
Methysergide maleate	Serotonin	
Sertraline hydrochloride	Serotonin	Reuptake
S15535	Serotonin	5-HT1A
Nomifensine maleate	Dopamine	Reuptake
NAN-190 hydrobromide	Serotonin	5-HT1A
(±)-Octoclotheptin maleate	Dopamine	D2
1-Phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea	Dopamine	beta-Hydroxylase
SB 242084 dihydrochloride hydrate	Serotonin	5-HT2c
LP44	Serotonin	5-HT7
Perphenazine	Dopamine	D2
Parthenolide	Serotonin	
Pimozide	Dopamine	D2
Promazine hydrochloride	Dopamine	D2
Piribedil maleate	Dopamine	D3
PD 168,077 maleate	Dopamine	D4
Pergolide methanesulfonate	Dopamine	D2/D1
R(+)-3PPP hydrochloride	Dopamine	D2
1-Phenylbiguanide	Serotonin	5-HT3
S(+)-PD 128,907 hydrochloride	Dopamine	D3
(-)-Quinpirole hydrochloride	Dopamine	D2/D3
Propionylpromazine hydrochloride	Dopamine	D2
S(-)-3PPP hydrochloride	Dopamine	D2
LP 12 hydrochloride hydrate	Serotonin	5-HT7
(±)-PPHT hydrochloride	Dopamine	D2
Pirenperone	Serotonin	5-HT2
Quipazine, 6-nitro-, maleate	Serotonin	Reuptake
Quinelorane dihydrochloride	Dopamine	D2
(±)-Quinpirole dihydrochloride	Dopamine	D2 > D3
Prochlorperazine dimaleate	Dopamine	
(±)-PD 128,907 hydrochloride	Dopamine	D3
Ro 04-6790 dihydrochloride	Serotonin	5-HT6
ST-148	Dopamine	D2
(±)-Sulpiride	Dopamine	D2
SB 269970 hydrochloride	Serotonin	5-HT7
SR 57227A	Serotonin	5-HT3
SKF 83959 hydrobromide	Dopamine	D1
Spiperone hydrochloride	Dopamine	D2
Ritanserin	Serotonin	5-HT2/5-HT1C
S(+)-Raclopride L-tartrate	Dopamine	D2
SKF 75670 hydrobromide	Dopamine	D1
(-)-Sulpiride	Dopamine	D2
Ropinirole hydrochloride	Dopamine	D3
SKF 89626	Dopamine	D1
1-(2-Methoxyphenyl)piperazine hydrochloride	Serotonin	5-HT1 > 5-HT2

Tiapride hydrochloride	Dopamine	D2/D3
PAPP	Serotonin	5-HT1A
Amisulpride	Dopamine	D2/D3
4-Hydroxyphenethylamine hydrochloride	Dopamine	
Spiroxatrine	Serotonin	5-HT1A
(±)-SKF 38393, N-allyl-, hydrobromide	Dopamine	D1
FAUC 213	Dopamine	D4
Triflupromazine hydrochloride	Dopamine	D2
SDZ-205,557 hydrochloride	Serotonin	5-HT4
Trimipramine maleate	Serotonin	Reuptake
Trazodone hydrochloride	Serotonin	Reuptake
(±)-6-Chloro-PB hydrobromide	Dopamine	D1
SB 206553 hydrochloride	Serotonin	5-HT2C/5-HT2B
Granisetron hydrochloride	Serotonin	5-HT3
1-(1-Naphthyl)piperazine hydrochloride	Serotonin	5-HT2
L-Tryptophan	Serotonin	
Ketanserin tartrate	Serotonin	5-HT2
U-99194A maleate	Dopamine	D3
3-Tropanyl-3,5-dichlorobenzoate	Serotonin	5-HT3
WAY-100635 maleate	Serotonin	5-HT1A
Trifluoperazine dihydrochloride	Dopamine	D1/D2
A-68930 hydrochloride	Dopamine	D1
S(-)-UH-301 hydrochloride	Serotonin	5-HT1A
Trifluoperidol hydrochloride	Dopamine	D1/D2
(+)-Norfenfluramine hydrochloride	Serotonin	
Thioridazine hydrochloride	Dopamine	D1/D2
3-Tropanyl-indole-3-carboxylate hydrochloride	Serotonin	5-HT3
3-Tropanylindole-3-carboxylate methiodide	Serotonin	5-HT3
U-101958 maleate	Dopamine	D4
Zimelidine dihydrochloride	Serotonin	Reuptake

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei:

Prof. Dr. Förster, die meine Arbeit ermöglicht hat.

Prof. Dr. Schneuwly, der sich bereit erklärt hat, die Zweitkorrektur zu übernehmen.

Prof. Dr. Wegener, der mir vorgelebt hat, mit wie viel Freude man Wissenschaftler sein kann.

Bei **Dr. Nicolai Peschel**, **Dr. Pamela Menegazzi** und **Irina**, weil ihr toll seid und ich mich an anstrengenden Tagen immer auf euch freuen konnte.

Bei meinen Mitdoktoranden, insbesondere die "alte Garde" der "Regensburger-Im-Exil", **Christiane**, **Matthias**, **Rudi**, **Verena**, aber auch die "Neuen", besonders **Marie** und **Robin** für das kollegiale Zusammensein, das ich sehr genossen habe. Ich kann mir nur wünschen auch in Zukunft Arbeitskollegen wie euch zu haben.

Dr. Dennis Pauls und **Dr. Mareike Pauls-Selcho**, weil ihr einfach ein tolles Paar seid, wissenschaftlich wie menschlich.

Andreas Eckart, der so manches Rechnerproblem beseitigt hat, solange er noch konnte.

Dr. Koustubh Vaze und **Enrico Bertolini**, weil ich euch gerade noch kennenlernen durfte.

Den TAs, insbesondere **Babara**, die mir im letzten Jahr so manches mal ausgeholfen hat, als die Zeit knapp wurde und **Susanne** für die Hilfe beim Lehramtskurs als auch bei der ein oder anderen weiteren Gelegenheit.

Und all den **Studenten**, mit denen man bei einem Kaffee über Gott und die Welt plaudern konnte.

Natürlich gebührt der Dank nicht nur den Kollegen, sondern auch den Freunden und Verwandten, die für einen da sind, an Tagen an denen die Experimente einfach nicht klappen wollen, man die Art und Weise in der einem Ratschläge erteilt werden nicht gut wegstecken kann, man die Geduld verliert oder sich einfach nur wünscht Zimmermann geworden zu sein.

Allen voran gilt hier mein herzlichster Dank meiner **Frau Regina**, welche die gesamte Achterbahn der Gefühle miterleben musste.

Natürlich meinen **Eltern und Geschwistern**, weil es für sie wichtiger ist, ob man Weihnachten nach Hause kommt, als ob man "*schon was rausgefunden*" hat.

Und meinen **Freunden**, deren Ohren am Telefon heiß gelaufen sind, wenn mich das Fernweh packte. Da ich annehme, dass ihr diese Arbeit nie lesen werdet, verzichte ich hier auf eine Auflistung. Solltet ihr es doch lesen, glaubt mir, ich hab euch nicht vergessen. Ihr werdet es sehen, wenn euer Telefon klingelt und mein Name am Display erscheint.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Florian Gmeiner, diese Dissertation selbstständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet.

Die hier vorliegende Dissertation wurde keiner anderen Fakultät vorgelegt, auch nicht auszugsweise.

Ort, Datum,

Unterschrift (Florian Gmeiner)