

Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung
der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 in der
inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Verena Dusik

Frankfurt am Main

Würzburg 2015

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.11.2015

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Tag des Promotionskolloquiums: 11.12.2015

Doktorurkunde ausgehändigt am:

ERKLÄRUNG

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999, zuletzt geändert durch Satzung vom 12. August 2009.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*“ selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Weiden, den 30.10.2015

Verena Dusik

Teile dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Dusik V, Senthilan PR, Mentzel B, Hartlieb H, Wülbeck C, Yoshii T, Raabe T, Helfrich-Förster C (2014) The MAP Kinase p38 is part of *Drosophila melanogaster*'s circadian clock. *PLoS Genet* 10: e1004565

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	1
1.1.1 MAPKs und ihre Bedeutung für den Organismus	1
1.1.2 MAPK Signalwege – Wege intrazellulärer Kommunikation	2
1.1.3 MAPK p38 in <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2 Die innere Uhr von <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.2.1 Neuronale Organisation.....	6
1.2.2 Molekularer Mechanismus.....	8
1.2.3 Proteinphosphorylierung als Regulationsmechanismus im molekularen Uhrwerk.....	10
1.3 Stress, innere Uhr und MAP-Kinasen	13
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	15
2 Material	17
2.1 Fliegenstämme.....	17
2.2 Bakterienstämme	18
2.3 Medien	19
2.4 Vektor.....	19
2.5 Oligonukleotide	20
2.6 Antikörper und Seren	21
2.7 Kitsysteme	23
2.8 Puffer und Lösungen	23
2.9 Größenstandards, Enzyme und Proteine.....	25
2.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
3 Methoden	27
3.1 Verhalten.....	27
3.1.1 Entrainment und Aufzeichnung der Laufaktivität.....	27
3.1.2 Auswertung der Aktivitätsdatendaten	28
3.2 Methoden auf DNA-Ebene	30

3.2.1	DNA-Extraktion und Reinigung	30
3.2.1.1	Extraktion von Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation)	30
3.2.1.2	Bestimmung von Konzentration und Reinheit.....	31
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	33
3.2.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	34
3.2.5	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung.....	34
3.2.6	Ligation.....	35
3.2.7	Hitzeschocktransformation von E.coli	35
3.2.8	DNA-Sequenzierung.....	36
3.3	Methoden auf RNA-Ebene.....	36
3.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA	36
3.3.2	Reverse Transkription der mRNA	36
3.3.3	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	36
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.4.1	Expression rekombinanter Proteine in E.coli.....	38
3.4.1.1	Kultivierung und Induktion der Proteinexpression.....	38
3.4.1.2	Herstellung von Bakterienlysat	38
3.4.1.3	Proteinaufreinigung mittels Ni-Chelat Affinitätschromatographie.....	39
3.4.1.4	Pufferaustausch und Konzentrierung gereinigter Proteine mittel Ultrafiltration	40
3.4.1.5	Proteinmengenbestimmung mittels Spotttest	40
3.4.2	Proteinisolierung aus adulten Fliegenköpfen.....	40
3.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	41
3.4.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.4.3.2	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Harnstoff-PAGE)	42
3.4.4	Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung	43
3.4.5	Proteinnachweis durch Western-Blot	43
3.4.5.1	Proteintransfer mittels Wet-Blot.....	44
3.4.5.2	Proteintransfer mittels Semi-Dry-Blot	44
3.4.5.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	45
3.4.6	<i>In vitro</i> Kinasenassays	45

3.5	Immunhistochemische Methoden	46
3.5.1	Immunfluoreszenzfärbung	46
3.5.1.1	Färbung adulter <i>Drosophila</i> Gehirne	46
3.5.1.2	Färbung adulter <i>Drosophila</i> Retinas.....	48
3.5.2	Visualisierung und Auswertung der Färbeergergebnisse	48
3.6	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Lokalisation und Expression von p38 MAPK in Gehirn und Retina von <i>Drosophila melanogaster</i>	50
4.1.1	Untersuchung der p38 Expression mittels Reporterlinien	50
4.1.2	p38-Antikörperfärbung an wildtypischen Fliegen	56
4.1.3	Endogene Expression von p38 im Tagesverlauf.....	64
4.2	Aktivierung von p38 im circadianen Systems.....	66
4.3	Einfluss des p38 Expressionslevels auf das rhythmische Laufverhalten.....	70
4.3.1	Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit herunterreguliertem p38b Signalweg.....	70
4.3.2	Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit überexprimierten p38b Signalweg	77
4.3.3	Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit herunterreguliertem p38a Signalweg.....	79
4.3.4	Aktivitätsrhythmik von <i>p38a</i> ^{Δ1} und <i>p38b</i> ^{Δ45} Single-Knockoutmutanten ...	81
4.3.5	Aktivitätsrhythmik von <i>p38b</i> ^{Δ45} ; <i>p38a</i> ^{Δ1} Doppel-Knockoutmutanten	83
4.4	Funktion und Bedeutung von p38 für den molekularen Mechanismus.....	87
4.4.1	Nukleäre Translokation der Uhrproteine PER und TIM in Fliegen mit manipulierten p38b Spiegel	87
4.4.2	Auswirkungen reduzierter p38b Spiegel auf das circadiane Phosphorylierungsmuster von PER	92
4.4.3	Nicht-radioaktive <i>in vitro</i> Kinasen Assays zur Identifizierung möglicher p38-Phosphorylierungsstellen in PER	94
5	Diskussion	98
5.1	Retinale Expression von p38 gibt keine Aufschlüsse über eine mögliche Rolle im peripheren Oszillator im Komplexauge	98
5.2	Antikörperfärbungen und Reporterlinien offenbaren p38-Expression in Uhrneuronen von <i>Drosophila</i>	100

5.3	Phosphorylierung von p38 im circadianen System unterliegt einer licht- und uhrgesteuerten Regulation.....	103
5.4	Modifizierte p38 Spiegel in Uhrneuronen führen zu Veränderungen in der rhythmischen Laufaktivität	105
5.5	Funktionelle Redundanz als möglicher Grund fehlender Verhaltensphänotypen in p38a und p38b Single-Knockoutmutanten	106
5.6	p38 phosphoryliert PER und steuert dessen Wanderung in den Zellkern.....	108
6	Anhang	112
7	Zusammenfassung	120
8	Summary	122
9	Literaturverzeichnis.....	124
10	Danksagung	138

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: MAPK-Signalweg	3
Abbildung 2: Lokalisation der Uhrneurone und ihre mutmaßlichen Projektionsbereiche im Gehirn von <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Abbildung 3: Molekulare Rückkopplungsschleife sowie relative PER und TIM Proteinlevel im Tagesverlauf.	9
Abbildung 4: Phosphorylierungsdomänen im Uhrprotein Period.....	12
Abbildung 5: Expressionsvektor pH6HTN His ₆ Halo Tag T7.....	20
Abbildung 6: Lichtbox und <i>Drosophila</i> Activity Monitoring (DAM) System	28
Abbildung 7: Aktogramm und Durchschnittstag des Wildtypstamm <i>Canton S</i>	29
Abbildung 8: Aufbau von Wet-Bot und Semi-Dry-Blot	45
Abbildung 9: Antikörperfärbung von ektopisch exprimierten lacZ in Gehirnen von <i>w</i> ; <i>p38b-lacZ</i> und <i>w</i> ¹¹¹⁸	51
Abbildung 10: lacZ-Expression und Antikörperfärbung in Gehirnen von <i>UAS-</i> <i>nuclacZ</i> ³⁶⁰ / <i>p38b-Gal4</i> und <i>UAS-nuclacZ</i> ³⁶⁰	53
Abbildung 11: GFP-Expression und Antikörperfärbung in Gehirnen von <i>p38b-Gal4</i> ; <i>UAS-GFP</i> ^{S65T} und <i>UAS-GFP</i> ^{S65T}	54
Abbildung 12: GFP-Expression und Antikörperfärbung in Retinas von <i>p38b-Gal4</i> ; <i>UAS-GFP</i> ^{S65T}	56
Abbildung 13: Antikörperfärbungen mit anti-p38 in <i>Canton S</i> und <i>p38b</i> ^{Δ25} ; <i>p38a</i> ^{Δ1}	58
Abbildung 14: Antikörperfärbungen mit anti-p38b in <i>Canton S</i>	60
Abbildung 15: Antikörperfärbungen mit anti-p-p38 in <i>Canton S</i>	62
Abbildung 16: p-p38-Antikörperfärbung und normalisierter Spiegel aktiver p38 MAPK zu ZT21 in den DN _{1a} von <i>CS</i> , <i>w</i> ; ; <i>p38a</i> ^{Δ1} und <i>w</i> ; <i>p38b</i> ^{Δ45}	63
Abbildung 17: Retinafärbung mit anti-p-p38 in <i>w</i> ¹¹¹⁸ und <i>p38b</i> ^{Δ25} ; <i>p38a</i> ^{Δ1} zu ZT21.....	64
Abbildung 18: Relative <i>p38a</i> und <i>p38b</i> mRNA Level in Kopffextrakten von <i>CS</i>	65
Abbildung 19: Westernblot aktivierter p38 MAPK aus Kopffextrakten von <i>CS</i> im Tagesverlauf.	66
Abbildung 20: Phosphorylierte p38 MAPK und Anzahl p-p38-positiver DN _{1a} in <i>CS</i> Wildtyp in LD 12:12.	68
Abbildung 21: Uhr- und lichtgesteuerte Aktivierung von p38 MAPK in den DN _{1a}	69
Abbildung 22: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38b</i> ^{RNAi} -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.	72

Abbildung 23: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38b^{KD}</i> -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.....	75
Abbildung 24: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38b^{DN-S}</i> -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.....	76
Abbildung 25: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38b⁺</i> -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.....	78
Abbildung 26: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38a^{RNAi}</i> -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.....	80
Abbildung 27: Laufaktivitätsrhythmen der Knockoutfliegen <i>p38b^{Δ45}</i> und <i>p38a^{Δ1}</i> im Vergleich mit dazugehöriger Kontrolle.....	82
Abbildung 28: Relativer <i>p38a</i> und <i>p38b</i> mRNA Level in Kopffextrakten von <i>p38a^{Δ1}</i> , <i>p38b^{Δ45}</i> und <i>CS</i>	83
Abbildung 29: Laufaktivitätsrhythmen der heterozygoter Doppel-Knockoutfliegen im Vergleich mit <i>w¹¹¹⁸</i>	84
Abbildung 30: Relativer <i>p38a</i> und <i>p38b</i> mRNA Level in Kopffextrakten von heterozygoten Doppel-Knockoutfliegen und <i>w¹¹¹⁸</i>	85
Abbildung 31: Laufaktivitätsrhythmen von <i>p38b^{Δ25}</i> , <i>p38a^{Δ1}</i> und <i>dicer2</i> ; <i>UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4</i> ; <i>UAS-p38a^{RNAi}/+</i> mit entsprechender Kontrolle.	86
Abbildung 32: Nukleäre PER und TIM Proteinspiegel in s-LN _v und l-LN _v von <i>dicer2</i> ; <i>UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4</i> ; + sowie zugehöriger UAS-Kontrolle in DD.	89
Abbildung 33: Relative nukleäre PER Proteinspiegel in den s-LN _v und l-LN _v von <i>UAS-p38b^{DN-S}</i> ; <i>Pdf-Gal4/+</i> ; + sowie zugehöriger UAS-Kontrolle in LD12:12.	91
Abbildung 34: Westernblots mit Kopffextrakten von <i>UAS-p38b^{DN-S}</i> , <i>cry-Gal4/+</i> ; + und <i>UAS-p38b^{DN-S}</i> , +; + in LD 12:12.....	93
Abbildung 35: Potentielle p38 Konsensus-Phosphorylierungssequenzen in Period.	95
Abbildung 36: In vitro Phosphorylierung von GST-PER ¹⁻⁷⁰⁰ und GST-PER ⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ durch His ₆ -p38b.	96
Abbildung 37: Nachweis <i>in vitro</i> phosphorylierter mutanter GST-PER ⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Konstrukte mittels radioaktiven Kinasenassays und Autoradiographie.	110

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Fliegenstämme.....	17
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.....	19
Tabelle 3: Verwendete Medien.....	19
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.....	20
Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.....	21
Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme.....	23
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.	23
Tabelle 8: Verwendete Größenstandards, Enzyme und Fusionsproteine.	25
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	26

ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent	GFP	grün fluoreszierendes Protein
°C	Grad Celsius	GST	Glutathion-S-Transferase
µl	Mikroliter	h	Stunde
µm	Mikrometer	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Abb.	Abbildung	His	Histidin
ACTH	Adrenocorticotrope Hormon	H ₂ O	Wasser
Amp	Ampicillin	IgG	Immunglobulin G
APS	Ammoniumpersulfat	IHC	Immunhistochemie
AS	Aminosäure	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
bp, kb	Basenpaar(e), 1000bp	JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
BSA	Serum-Albumin des Rindes	K	Kristallkegel
cDNA	complementary DNA	KCl	Kaliumchlorid
CK2	Caseinkinase 2	kDa	Kilo-Dalton
cm ²	Quadratzentimeter	l	Liter
CO	Cornea	lacZ	β-Galactosidase-Gen
CO ₂	Kohlendioxid	LB	lysogeny broth
CS	<i>Canton S</i>	LD	Licht-Dunkel
CT	Circadian Time	LN	laterale Neurone
DAM	Drosophila Activity Monitoring	LNd	dorsolaterale Neurone
Dd	doppelt destilliert	(l/s-)LNv	(große/kleine) ventrolaterale Neurone
DD	Dauerdunkel	LPN	laterale posteriore Neurone
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	molar
DN	Dorsale Neuronen	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
DNS	Desoxyribonucleinsäure	MBP	Maltose-bindendes Protein
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank	MCS	Multiple Cloning Site
DTT	Dithiothreitol	min	Minuten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ml	Milliliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rpm	Umdrehungen pro Minute
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase		
G	Gramm		
Gal	Galactosidase		
mM	millimolar		

mm	Millimeter	RT	Raumtemperatur
mRNA	<i>messenger RNA</i>	SAPK	Stress Activated Protein
n	Anzahl	SCN	Nucleus suprachiasmaticus
NaCl	Natriumchlorid	SDS	Natriumdodecylsulfat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat	Ss	Schnittstelle
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	SOG	Sub-Oesophageal Ganglion
NaN ₃	Natriumazid	SZ	Semperzelle
NDS	Normal Donkey Serum	Tab.	Tabelle
ng	Nanogramm	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
NGS	Normal Goat Serum	TBS(T)	Tris-gepufferte Saline (mit Tween-20)
Ni ²⁺	Nickel	TEMED	Tetramethylethyldiamin
nm	Nanometer	TEV	Protease aus <i>Tobacco Etch Virus</i>
n.s.	nicht signifikant	TIM	Timeless
NTA	Nitriлотriessigsäure	UAS	Upstream Activating Sequence
OD ₆₀₀	optische Dichte (bei 600nm)	VDRC	<i>Vienna Drosophila RNAi Center</i>
OL	optischer Lobus	vs	versus
p	p-Wert (Statistik)	vgl.	vergleiche (mit)
PAGE	Polyacrylamidgel	VRI	Vrille
PBS(T)	Phosphat-gepufferte Saline (mit Triton-X)	W	Watt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	WB	Westernblot
PDF	Pigment-dispersing-Factor	WT	Wildtyp
PER	Period	ZH	Zentralhirn
PFA	Paraformaldehyd	ZT	Zeitgeber Time
Pha	Phalloidin		
PI	Pars intercerebralis		
Pi	Pilzkörper		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid		
POT	Posterior Optic Tract		
PZ (p/s/t)	Pigmentzelle (primäre/sekundäre/tertiäre)		
qPCR	quantitative PCR		
R1-8	Photorezeptorzelle 1-8		
Rha	Rhabdomer		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA Interferenz		

1 Einleitung

Unsere Umwelt ist durch stete Veränderungen geprägt. Periodisch wiederkehrende Ereignisse wie der Jahreszeitenwandel oder der 24-Stunden-Rhythmus von Tag und Nacht, aber auch plötzlich auftretende Änderungen der Temperatur, der Nahrungsverfügbarkeit oder der UV-Einstrahlung stellen uns immer wieder vor große Herausforderungen. Um in beiden Situationen angemessen reagieren zu können, haben Lebewesen im Laufe der Evolution zwei unterschiedliche Mechanismen entwickelt: sogenannte innere Uhren und das Stress-System. Während erstere unseren Organismus auf sich regelmäßig wiederholende Anforderungen unseres Alltag vorbereiten, ermöglicht uns das Stress-System auf unvorhersehbare und plötzlich auftretende Ereignisse schnell und angemessen zu reagieren.

Ein in vergangenen Jahren häufig erforschter Stress-Signalweg stellt die durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 vermittelte Antwort des Organismus auf Stress dar. Neben der Rolle im Stresssystem postulieren neuere Studien eine Beteiligung von p38 an der Signalweiterleitung zur inneren Uhr in Säugern (Hayashi et al., 2003), sowie eine Uhr-regulierte rhythmische Aktivierung von p38 (Vitalini et al., 2007; Lamb et al., 2011) und belegen zugleich eine Interaktion von innerer Uhr und Stress-System. Eindeutige Belege, dass mit p38 eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase als möglicher Verknüpfungspunkt beider Systeme fungiert, fehlen jedoch bis heute.

1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

1.1.1 MAPKs und ihre Bedeutung für den Organismus

Proteinkinasen zählen zu den wahren Alleskönnern in der Zelle. Der Stellenwert, den sie im Organismus einnehmen, wird bei Betrachtung der eukaryotischen Genome und Proteome deutlich. So werden nach neueren Schätzungen 30-50 % aller Proteine einer eukaryotischen Zelle durch Proteinkinasen mittels Phosphorylierung reguliert (Ptacek und Synder, 2006; Sefton und Shenolikar, 2001). Zusätzlich machen Proteinkinasen mit 575 Genen etwa 2% des gesamten humanen Genoms aus (Lander, 2001; Manning et al., 2002). Eine bedeutende Gruppe innerhalb der Kinasen stellt hierbei die Superfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK oder auch MAP-Kinasen) dar, welche basierend auf ihren strukturellen und biochemischen Eigenschaften in drei

Untergruppen unterteilt werden kann (Kyriakis und Avruch, 1996; Robinson und Cobb 1997; Ip und Davis, 1998): die Extrazellulär-Signal regulierten Kinasen (ERK), die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Wenn auch in unterschiedlichen Signalwegen agierend, so haben doch alle drei MAPK-Typen eins gemein. Mit ihrer Rolle im Zellzyklus, bei der Apoptose, der intrazellulären Kommunikation, der Genexpression sowie der Stress- und Immunantwort verfügen sie nicht nur über ein breites Wirkungsspektrum sondern fungieren darüber hinaus in Pro- und Eukaryoten als bedeutender Regulator zahlreicher physiologischer Prozesse. Im Mittelpunkt eines jeden Prozesses steht eine durch eine Proteinkinase vermittelte Phosphorylierungsreaktion. In dieser übertragen als Proteintransferase agierende Kinasen den γ -Phosphatrest eines Adenosintriphosphats (ATP), in seltenen Fällen auch eines Guanosintriphosphats (GTP), auf Serin-, Threonin- und Tyrosin-Aminosäurereste eines Targetproteins (Lindberg et al.1992). Sie führen auf diese Weise zu einer Konformationsänderung in dessen Polypeptidkette und final zu einer Änderung der Proteineigenschaften (Johnson, 1994; Johnson & Richard, 2001; Cohen, 2002a). So wird neben einer Erhöhung oder Verminderung der enzymatischen Aktivität des Proteins (Johnson & Barford, 1991; Johnson et al., 1996) mitunter dessen zelluläre Lokalisation (Beals et al., 1997) sowie Lebensdauer und Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Bindepartnern, wie DNA und Proteinen (Faux & Scott, 1996; Hubbard & Cohen, 1993; Brunet et al., 1999), beeinflusst. In Anbetracht der grundlegenden Bedeutung der Phosphorylierungsreaktionen für Targetprotein und Zelle, aber auch für den gesamten Organismus, ist es nicht verwunderlich, dass Störungen dieses Regulationsmechanismus, wie z.B. durch konstitutive Aktivierung von Proteinkinasen, mitunter schwerwiegende Erkrankungen wie Krebs, Diabetes oder Immunschwäche zur Folge haben oder deren Entwicklung negativ beeinflussen können (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Cohen, 2002b). Ein besseres Verständnis des Phosphorylierungsnetzwerkes mit seinem weitreichenden Einfluss auf unterschiedlichste biologische Prozesse ist daher von großer Bedeutung.

1.1.2 MAPK Signalwege – Wege intrazellulärer Kommunikation

MAP-Kinasen agieren in der Zelle nicht autonom, vielmehr sind sie Teil eines intrazellulären Kommunikationssystems. Für die Funktion eines mehrzelligen Organismus ist die Kommunikation seiner Zellen untereinander, ebenso wie mit seiner Umwelt, von essentieller Bedeutung. Um Änderungen ihrer extrazellulären Umgebung

wahrnehmen und in Folge entsprechend darauf reagieren zu können, haben Zellen unterschiedliche, phylogenetisch hochkonservierte MAPK-Signalwege entwickelt (Garrington & Johnson, 1999).

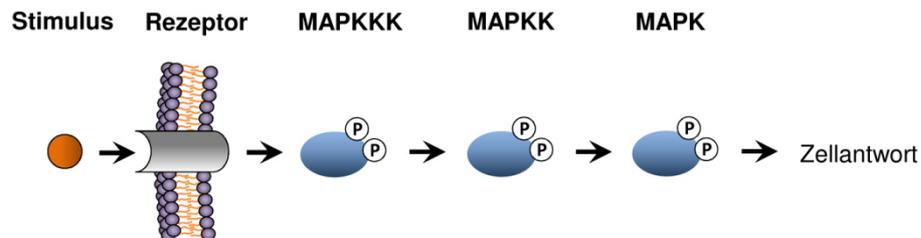


Abbildung 1: MAPK-Signalweg

Am Anfang einer jeden Signaltransduktionskaskade (Abb. 1) stehen extrazelluläre Signalmoleküle, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone oder Stressoren, welche an membranständige Rezeptoren binden, deren Konformationsänderung induzieren und damit das Signal an die intrazelluläre Domäne weiterleiten (Schäfer und Williams, 2000). Die anschließende Signalübertragung zum Zellkern erfolgt typischerweise über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade (Su und Karin, 1996; Widmann et al., 1999). In dieser spielen Mitogen-aktivierte Proteinkinase eine entscheidende Rolle. Im Zellinneren aufeinanderfolgend geschaltet, phosphorylieren und aktivieren sich MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und MAP-Kinase (MAPK) nach dem „Domino-Prinzip“ und transportieren auf diese Weise das Signal weiter ins Zellinnere. Ist dabei eine Kinase innerhalb der Signalkette in größerer Menge vorhanden als ihr vorausgeschalteter Regulator, kommt es zusätzlich zu einer Verstärkung des Signals (Pearson et al., 2001). Eine Aktivierung der MAP-Kinase erfolgt darüber hinaus nur wenn sowohl Threonin als auch Tyrosin in der Konsensussequenz Thr-Xaa-Tyr durch die vorgeschaltete MAPKK phosphoryliert wird (Keyse, 2000; Cobb und Goldsmith, 1995). Der letzte Schritt der intrazellulären Signalweiterleitung mündet schließlich, neben der Phosphorylierung von Targetproteinen, meist in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese binden an spezifische DNA-Sequenzen, induzieren die Transkription bestimmter Gene und leiten damit die Zellantwort auf äußere Veränderungen der Umwelt ein (Johnson und Lapadat, 2002).

Obwohl ERK, JNK und p38, in getrennt ablaufenden MAPK-Signalwegen agieren, ist dennoch ein gewisses Maß an „cross-talk“ innerhalb des Kommunikationssystems zu beobachten (Cowan und Storey, 2003). So setzen nicht nur dieselben Signalmoleküle unterschiedliche MAPK-Signalwege in Gang, sondern können auch Signalkomponenten eines Weges oftmals gleichzeitig Komponente und Regulator einer weiteren Phosphorylierungskaskade sein (Abb. A1 im Anhang). Der Zelle wird so die vielfache Möglichkeit der Modulation und des „Feintunings“ der Zellantwort auf unterschiedliche Signale gegeben. Durch diese Regulierbarkeit des Signalweges auf jeder Stufe sowie der Vernetzung miteinander, entsteht ein sehr flexibles und komplexes Kommunikationssystem zur Weiterleitung intrazellulärer Information (Robinson und Cobb, 1997).

1.1.3 MAPK p38 in *Drosophila melanogaster*

Die Klasse der p38 MAP-Kinasen umfasst 42kDa große Serin/Threonin-Kinasen, die in *Drosophila melanogaster* durch drei Gene codiert werden (Han ZS et al., 1998): *p38a*, *p38b* und *p38c*. Die Tatsache dass der gesamte kodierende Bereiche hierbei in nur einem Exon vorliegt, schließt die Möglichkeit alternativer Splicevarianten aus und lässt das p38 Modul in der Fliege, im Vergleich zu vier p38-Isoformen im Säuger, ein Stück weit übersichtlicher erscheinen (Belozarov et al., 2012). Darüber hinaus existieren widersprüchliche Aussagen zu einer möglichen Funktion von *p38c*. So messen bisherige Publikationen lediglich *p38a* und *p38b* eine Bedeutung bei der Stressantwort und der antimikrobiellen Immunität (Craig et al, 2004; Chen et al., 2010) bei und weisen auf eine möglichen Funktion beider Isoformen bei der Regulation von Zellgröße (Cully et al., 2010), Lebensdauer (Vrailas-Mortimer et al., 2011) sowie epigenetischer Vererbung (Seong et al., 2011) hin. Ebenso gibt es Berichte über ein Mitwirken beider Isoformen in der Decapentaplegic (*dpp*)-regulierten Flügelgestaltung (Adachi-Yamada et al., 1999) und bei der Erzeugung axialer Polarität während der Oogenese (Inoue et al., 2001). Die Tatsache das *p38a* und *p38b* Nullmutanten unter normalen Bedingungen lebensfähig sind, während Doppelmutanten bereits im Laufe ihrer larvalen Entwicklung sterben, lässt zudem eine mögliche funktionellen Redundanz beider Isoformen vermuten (Adachi-Yamada et al., 1999; Vrailas-Mortimer et al., 2011). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei *p38c* nach weit verbreiteter Meinung lediglich um ein Pseudogen. So beinhaltet die genomische Sequenz Mutationen in essentiellen Motivregionen, die eine Codierung einer funktionellen Kinase nach Caillie Craig (siehe persönl. Korrespondenz mit FlyBase

unter <http://flybase.org/reports/FBgn0267339.html>) unmöglich machen: dabei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch im hochkonservierten Phosphorylierungsmotiv der eine Änderung von TGY zu TDH bewirkt, sowie einen zweifachen Aminosäureaustausch im katalytischen Zentrum von p38c. Kürzlich veröffentlichte Studien weisen zwar auf eine Rolle von p38c im Fettstoffwechsel (Chakrabarti et al., 2014) sowie bei der Kontrolle der weiblichen Fruchtbarkeit und der Expression der Decarboxylase DOPA in Fliegen (Davis et al., 2008) hin, ob p38c jedoch tatsächlich eine funktionelle Kinase repräsentiert bleibt in Forschungskreisen weiterhin umstritten. Aus diesen Grund, aber auch weil anatomische mRNA-Studien für p38c im Vergleich zu p38a und p38b insbesondere im Gehirn der Fliege extrem geringe mRNA Expressionslevel offenbaren (Abb. A2-A4), wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine Funktion von p38c für die innere Uhr von vornherein nicht in Betracht gezogen und die Isoform von jeglichen experimentellen Ansätzen ausgeschlossen.

Die Signalkaskade von p38 in *Drosophila* setzt sich, wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, aus einer dreistufigen Phosphorylierungskaskade mit 3 Proteinkinasetypen zusammen – MAPKKK, MAPKK und MAPK. Während der p38-Signalweg im Säuger bereits gut erforscht ist, sind Signalwegskomponenten der Fliege kaum bekannt. So konnten in *Drosophila* mit D-MEKK1 und D-TAK1 bisher nur zwei MAPKKKs identifiziert werden. *D-TAK1* Fliegenmutanten offenbaren große Defizite in ihrer Immunreaktion (Vidal et al, 2001), während Tiere mit mutierten *D-MEKK1* Gen im Vergleich zum Kontrollstamm auf extreme Hitze und osmotischen Stress verändert reagieren (Inoue et al, 2001). Die Tatsache, dass in *D-MEKK1* Nullmutanten die Aktivierung von p38 als Folge von Hitzeschock und osmotischen Stress reduziert, aber nicht vollständig unterbunden ist, lässt weitere MAPKKKs im p38-Signalweg vermuten. D-MKK3, auch Licorne genannt, repräsentiert eine MAPKK auf zweiter Phosphorylierungsebene und stellt somit einen direkten Regulator und Aktivator der p38 Isoformen dar (Han SJ et al, 1998; Han ZS et al, 1998). Für vollständige enzymatische Kinaseaktivität ist auch hier eine Phosphorylierung sowohl des Threonin¹⁸⁴ (Thr¹⁸⁴) als auch Tyrosin¹⁸⁶ (Tyr¹⁸⁶) im „Thr-Gly-Tyr-Motiv“ der Aktivierungsdomäne von p38 zwingend notwendig (Su und Karin, 1996). Liegt hingegen anstelle einer dualen nur eine einfache Phosphorylierung vor, besitzt p38 keinerlei enzymatische Funktion. In Übereinstimmung mit der vielfältigen Funktion von p38 konnte in den vergangenen Jahren von Transkriptionsfaktoren wie Mef2 (Vrailas-Mortimer et al., 2011) und D-ATF2 (Sano et al., 2005; Adachi-Yamada et al., 1999) über Wachstumsfaktoren und

Zellzyklusregulatoren (Cully et al., 2010; Shi et al., 2005) bis hin zu untergeordneten Kinasen wie MK2 (Seisenbacher et al., 2011; Belozarov et al., 2012), ein breites Spektrum an nukleären und zytoplasmatischen Targetproteinen identifiziert werden. Hinweise auf potentielle p38-Targetproteine im circadianen System der Fliege gibt es aktuell jedoch noch keine.

1.2 Die innere Uhr von *Drosophila melanogaster*

1.2.1 Neuronale Organisation

Im Gegensatz zum Nucleus suprachiasmaticus (SCN), dem Sitz des circadianen Systems im Säuger, umfasst die innere Uhr der Fliege keinen kompakten Komplex sondern setzt sich vielmehr aus rund 150 rhythmisch oszillierenden Uhrneuronen zusammen (Ewer et al., 1992; Taghert und Shafer, 2006; Helfrich-Förster et al., 2007). Über beide Hemisphären verteilt, bilden sie ein circadianes Uhrneuronennetzwerk aus und lassen sich, basierend auf Lage und Größe, in 7 Untergruppen einteilen (Abb. 2): die im dorsalen Bereich lokalisierten dorsalen Neurone, DN₁, DN₂ und DN₃, sowie die seitlich gelegenen lateralen Neurone, LN_d, I-LN_v, s-LN_v und LPN (zusammengefasst in Helfrich-Förster 2003 und 2004; Kaneko und Hall, 2000; Helfrich-Förster et al. 2007).

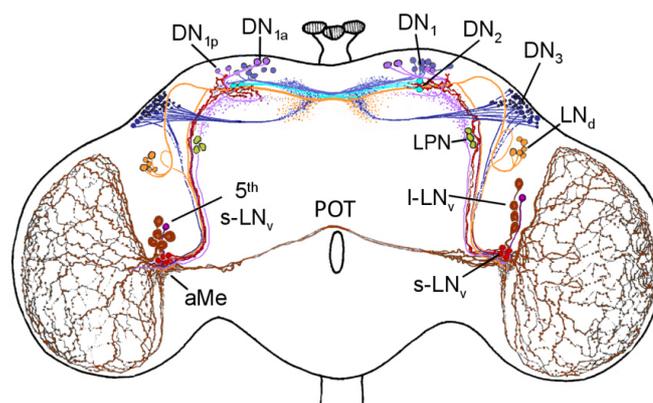


Abbildung 2: Lokalisation der Uhrneurone und ihre mutmaßlichen Projektionsbereiche im Gehirn von *Drosophila melanogaster*.

Laterale (s-LN_v, I-LN_v, LN_d und LPN) und dorsale Schrittmachneurone (DN₁, DN₂ und DN₃) sind zusammen mit ihren Fortsätzen in verschiedenen Farben gekennzeichnet: dorsolaterale Neurone: LN_d (orange); große ventrolaterale Neurone: I-LN_v (dunkelrot); kleine ventrolaterale Neurone: s-LN_v (hellrot); fünfte kleine ventrolaterale Neuron: 5th s-LN_v (violett); laterale posteriore Neurone: LPN (grün); dorsale Neurone: DN₁ (lila und hellblau), DN₂ (türkis) und DN₃ (dunkelblau); akzessorische Medulla: aMe; posteriorer optischer Trakt: POT (nach Helfrich-Förster et al., 2007)

Alle Uhrneurone zeichnen sich durch eine zyklische Expression von sogenannten Uhrproteinen aus, ein molekularer Mechanismus auf welchen im Detail im anschließenden Abschnitt eingegangen wird (siehe Abschnitt 1.2.2). Verhaltensanalysen und morphologische Studien der vergangenen Jahren machten es sich vor allem zum Ziel, die Funktion der einzelnen Uhrneurongruppen zu identifizieren. Demnach exprimieren die I-LN_v und s-LN_v zur Synchronisation der Uhrproteinoszillation innerhalb des circadianen Systems (Helfrich-Förster, 2005), aber auch zur Weiterleitung circadianer Signale an nachgeschaltete Neurone, den circadianen Neurotransmitter PDF (Pigment Dispersing Factor) (Helfrich-Förster, 1995; Park & Hall, 1998; Renn et al.; 1999). Einzige Ausnahme bildet das auf Höhe der I-LN_v liegende fünfte s-LN_v, das keine Expression des Signalpeptids zeigt (Kaneko et al., 1997). Die Hauptaufgabe der PDF-exprimierenden I-LN_v liegt vermutlich in der Kopplung der Oszillationen beider Hemisphären. Mit ihren Nervenfortsätzen projizieren sie nicht nur in die ipsilaterale akzessorische Medulla sondern ziehen über den posterioren optischen Trakt (POT) auch auf die contralaterale Seite, wo sie ein weit verzweigtes Netzwerk über der Medulla ausbilden (Helfrich-Förster et al., 2007). Zusammen mit der Tatsache, dass unter konstanten Bedingungen das Uhrproteincycling in den I-LN_v nach einigen Tagen verschwindet (Shafer et al., 2002; Yang und Sehgal, 2001), spricht dies, neben der Kopplungsfunktion, eher für eine Vermittlung rhythmischer Signale an die optischen Ganglien und Augen als für ein Mitwirken an der Entstehung circadianer Verhaltensrhythmen (Helfrich-Förster et al., 2007). Diese Aufgabe scheinen hingegen die s-LN_v und LN_d, die mutmaßlichen Hauptschrittmacherzellen der inneren Uhr, innezuhaben. So reicht ein circadianes Uhrproteincycling in diesen Uhrneuronengruppen aus, um auch in Abwesenheit von Zeitgebern rhythmisches Laufverhalten zu erzeugen (Ewer et al., 1992, Frisch et al., 1994). Darüber hinaus senden die s-LN_v, neben ihren Projektionen in die akzessorische Medulla, zusammen mit den LN_d auch Nervenfortsätze ins dorsale Protocerebrum des Fliegenhirns (Helfrich-Förster et al., 2007). Dieser Teil des Gehirns enthält neben vielen neurosekretorischen Zellen auch zahlreiche neuronale Verbindungen zu anderen Bereichen im Gehirn und bietet der inneren Uhr so die Möglichkeit circadiane Signale sowohl über den elektrischen als auch über den hormonellen Output-Weg an Zielorgane weiterzuleiten (Engelmann, 2004). Im Gegensatz dazu ist die Funktion der dorsalen Neurone im circadianen System, ebenso wie die Rolle der LPN, abgesehen von deren Beitrag zum Temperaturentrainement (Shafer et al., 2006; Yoshii et al., 2005), noch weitgehend

ungeklärt (Helfrich-Förster 2005). Die DN₂ tragen zwar unter LD-Bedingungen zur rhythmischen Abendaktivität der Fliegen bei (Veleri et al., 2003), sind dafür jedoch nicht zwingend notwendig (Ewer et al., 1992, Frisch et al., 1994). Nicht anders verhält sich der Einfluss der größten Gruppe der dorsalen Neurone, der DN₃ (ca. 40 Zellen pro Hemisphäre) auf das circadiane System. Die schließlich letzte Gruppe der dorsalen Neurone, die DN₁ (bis zu 15 Zellen), lässt sich aufgrund ihrer Lage und ihres Auftretens während der Entwicklung in 2 Untergruppen aufteilen: DN_{1a} (anterior) und DN_{1p} (posterior). Die DN_{1a} treten bereits im Larvenstadium auf und exprimieren das Neuropeptid IPNamid (Shafer et al., 2006). Aufgrund ihrer Projektionen in die akzessorische Medulla adulter Fliegen stehen sie in engem Kontakt mit den LN_v, was die Hypothese einer noch unbekanntenen Funktion in der inneren Uhr verstärkt.

1.2.2 Molekularer Mechanismus

Das circadiane Cycling der Uhrproteine beruht auf einem komplexen molekularen Mechanismus. Herzstück und eigentlicher Motor der rhythmischen Uhrproteinexpression ist eine sich selbst erhaltende Rückkopplungsschleife (Abb. 3). In ihr unterliegen die Uhrproteine Period (PER) und Timeless (TIM) einer rhythmischen Expression da sie in Folge von cytoplasmatischer Ansammlung und anschließender nukleärer Translokation schließlich mit einer zeitlichen Verzögerung ihre eigene Transkription hemmen (Hardin et al., 1990; Glossop et al., 1999). PER und TIM sind jedoch nicht die einzigen Komponenten dieses regulatorischen Kreislaufs. So konnten wissenschaftliche Studien der letzten 30 Jahren neben PER (Konopka and Benzer, 1971) und TIM (Seghal et al., 1994) mit Clock (CLK) (Allada et al., 1998), Cycle (CYC) (Rutila et al., 1998), Doubletime (DBT) (Price et al., 1998), Vrille (VRI) (Blau und Young, 1999), Shaggy (SGG) (Martinek et al., 2001), Pdp1 (Cyrán et al., 2003), CK2 (Akten et al., 2003; Blau et al., 2003; Lin et al., 2002) und PP2A (Sathyanarayanan et al., 2004) zahlreiche weitere Uhrproteine identifizieren. Bei CLK und CYC handelt es sich hierbei um zwei basische Helix-Loop-Helix-PAS Transkriptionsfaktoren.

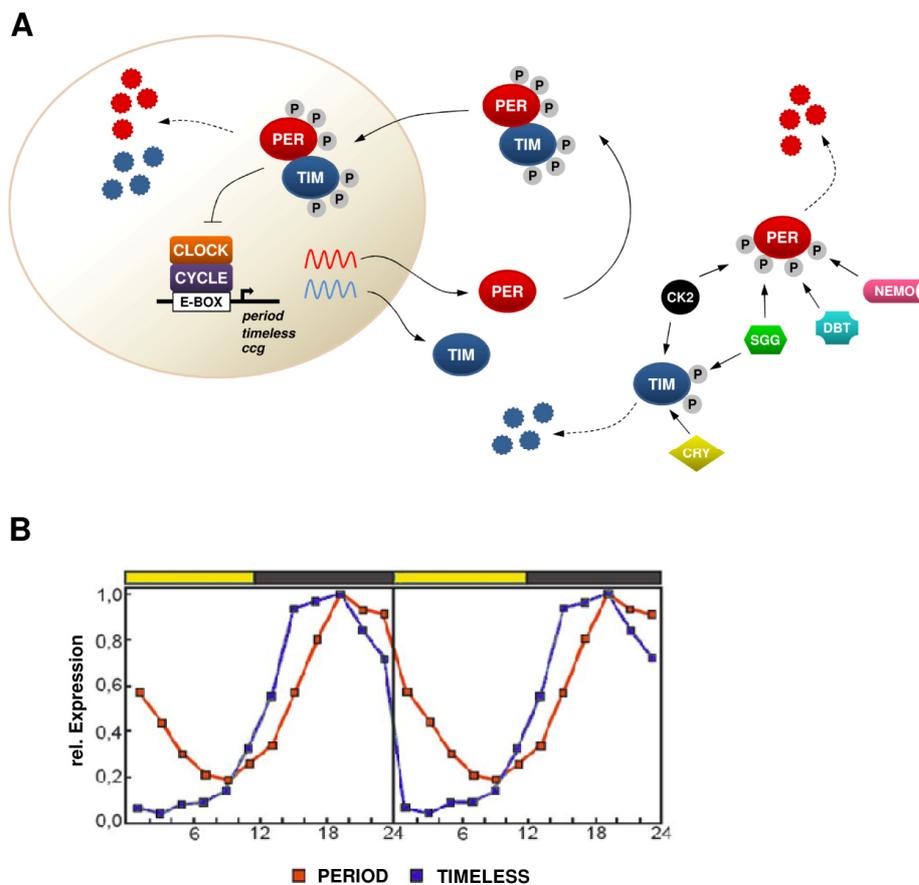


Abbildung 3: Molekulare Rückkopplungsschleife sowie relative PER und TIM Proteinlevel im Tagesverlauf.

A zeigt eine vereinfachte Darstellung der molekularen PER/TIM-Rückkopplungsschleife (für eine detaillierter Beschreibung siehe Fließtext), B repräsentiert rhythmische Schwankungen relativer PER (rot) und TIM (blau) Proteinlevel in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* im Tagesverlauf (modifiziert nach Helfrich-Förster, 2002).

Am Beginn der Rückkopplungsschleife stehend dimerisieren CLK und CYC in der Mitte des Tages, binden an E-Box Elemente in den Promotorregionen von *period* und *timeless* sowie weiterer *cgc* (*clock controlled genes*) und fungieren auf diese Weise als Aktivatoren der Uhrgenexpression (Darlington et al., 1998; Hao et al., 1997). Nach anschließender Translation im Cytoplasma, sammeln sich PER und TIM im Tagesverlauf an, bevor sie nach Erreichen ihres Proteinmaximums gegen Mitte der Nacht in den Zellkern wandern (Hardin et al., 1990; So und Rosbash, 1997; Zerr et al., 1990; Edery et al., 1994) und dort durch Binden von PER an CLK ihre eigene Transkription unterbinden (Lee et al., 1999). An dieser Stelle kommen die Proteinkinasen SGG, CK2, DBT und NEMO sowie die Proteinphosphatase PP2A ins Spiel. Über ein Wechselspiel aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung sorgen sie für eine dynamische

Regulation des Phosphorylierungsgrades von PER und TIM und steuern so deren cytoplasmatische Akkumulation, nukleäre Translokation und gezielte Degradation (Kloss et al., 1998; Lin et al., 2002; Cryan et al., 2005; Sathyanarayanan et al., 2004; für detaillierte Angaben siehe Abschnitt 1.2.3). Auf diese Weise wird nicht nur die Menge und Lokalisation der Uhrproteine kontrolliert, sondern zeitgleich der molekularen Zustand der Zelle auf die aktuelle Tageszeit abgestimmt (Hardin, 2005).

Die Synchronisation des molekularen Uhrwerks an den Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistet der Blaulichtrezeptor Cryptochrom (CRY; Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). Im Großteil aller wichtigen Uhrneurone zugegen (Yoshii et al., 2008), bindet CRY in Folge seiner Aktivierung durch Licht an TIM, induziert dessen Degradation (Helfrich-Förster, 2002; Busza et al., 2004) und stellt somit neben posttranslationalen Modifikationsmechanismen einen weiteren, licht-abhängigen Weg zur Steuerung der molekularen Rückkopplungsschleife dar.

1.2.3 Proteinphosphorylierung als Regulationsmechanismus im molekularen Uhrwerk

Die inhibitorische Wirkung der Uhrproteine PER und TIM auf ihre eigene Transkription ist ein grundlegender Mechanismus der circadianen Rückkopplungsschleife der inneren Uhr, kann jedoch nicht allein verantwortlich für die Entstehung eines 24 Stunden Rhythmus sein. Biochemische Reaktionen laufen meist in Sekunden oder Minuten ab. Um die enorme zeitliche Verzögerung von Transkription und Autoinhibition zu gewährleisten und zeitgleich eine Anpassung des Rhythmus an 24 Stunden zu ermöglichen, sind neben der transkriptionellen Regulation (Cheng und Obrietan, 2007; Cheng et al., 2007) weitere Regulationsmechanismen von großer Bedeutung: posttranslationale Modifikationen (Vanselow und Kramer, 2007; Gallego und Virshup, 2007; Bae und Edery, 2006). Diese steuern die subzelluläre Lokalisation, Stabilität, Aktivität sowie Komplexbildung der Uhrproteine und gewährleisten auf diese Weise die circadiane Dynamik des Systems. So führt die konstitutive Expression von *per* in arrhythmischen *per⁰¹* Fliegen zur Wiederherstellung circadianer Rhythmen auf Verhaltens- sowie molekularer Ebene. Zeitgleich zeigen Tiere rhythmische PER Proteinlevel sowie eine rhythmische nukleäre Akkumulation des Uhrproteins (Yang und Sehgal, 2001). Neben Acetylierung (Choudhary et al., 2009), Glykosylierung (Spiro, 2002) und Ubiquitinierung (Grima et al., 2002; Ko et al., 2002) wurde insbesondere die Proteinphosphorylierung (Lee et al., 2001) als posttranslationaler Prozeß in der inneren

Uhr beschrieben. Mit 25-35 identifizierten Phosphorylierungsstellen bietet PER eine der Hauptansatzstellen für Phosphorylierungsreaktionen (Vanselow et al., 2006; Chiu et al., 2008; Garbe et al., 2013) im circadianen System und fungiert darüber hinaus als eine Art „Phospho-Timer“ (Gallego und Virshup, 2007; Bae und Edery, 2006). Am Ende des Tages noch wenig phosphoryliert, durchläuft neu synthetisiertes PER im Laufe der Nacht mehrere Phosphorylierungsprozesse bevor es schließlich kurz vor seinem Abbau, gegen Ende der Nacht in seiner hyperphosphorylierten Variante vorliegt (Edery et al. 1994). Ging man in der Vergangenheit noch davon aus dass allein die Anzahl der Phosphatreste diesen Abbau und folglich die Geschwindigkeit der inneren Uhr reguliert, weiß man heute dass vielmehr der Ort und nicht das Ausmaß der Phosphorylierung über die Funktion, Stabilität und nukleäre Translokation der Uhrproteine entscheidet (Chiu et al., 2008; Ko et al., 2010; Chiu et al., 2011; Garbe et al., 2013). So existieren in den Uhrproteinen mehrere Phosphorylierungsdomänen, welche, selbst wenn durch dieselbe Kinase aktiviert, unterschiedliche Wirkungsweisen besitzen. Das beste Beispiel hierfür liefert das Uhrprotein Period (Abb. 4). Während DBT durch Phosphorylierung von Serin 47 (Ser47) die Bindung des F-Box Proteins SLIMB an PER begünstigt und damit den proteasomalen Abbau des Uhrproteins induziert (Ko et al., 2002; Grima et al., 2002), führen DBT-vermittelte Phosphorylierungen von Ser585, Ser589 und möglicherweise auch Threonin 583 (Thr583) in der „PER-Short“ Domäne stattdessen zu einem gegenteiligen Effekt, der Hemmung des Ser47-vermittelten Abbaus von PER (Chiu et al., 2011). Vielmehr noch, Chiu und Kollegen (2011) sehen in der „PER-Short“ Domäne sogar eine Art Hauptkontrollzentrum des PER-Phosphorylierungsprogramms, welches Phosphorylierungsreaktionen der Kinase DBT an weit entfernteren Regionen zeitlich hinauszögert. So hat der Austausch von Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen mit Alanin in der „PER-Short“ Domäne eine Zunahme der DBT-vermittelten Phosphorylierungen im N- und C-Terminus von PER sowie einen schnelleren Wechsel von der hypophosphorylierten zur hyperphosphorylierten Form und folglich einen beschleunigten DBT-vermittelten Abbau von PER zur Folge. Auch treten bei Fliegenmutanten mit „missense“-Mutationen in dieser Region, Phänotypen mit kurzer Freilaufperiode auf (Baylies et al., 1992; Rothenfluh et al., 2000). Neben den bereits genannten Thr583, Ser585 und Ser589 existiert in der „PER-Short“ Domäne noch eine weitere Phosphorylierungsstelle, Ser596. Durch die Prolin-gerichtete Kinase NEMO phosphoryliert, fördert diese die DBT-vermittelte Phosphorylierung der übrigen Phosphorylierungsstelle der „PER-Short“

Domäne (Chiu et al., 2011). Darüber hinaus mehren sich Hinweise auf eine Interaktion von Ser596 mit einer weiteren Phosphorylierungsdomäne in PER, der „PER-SD (PER Short Downstream)“ Domäne (Garbe et al., 2013).

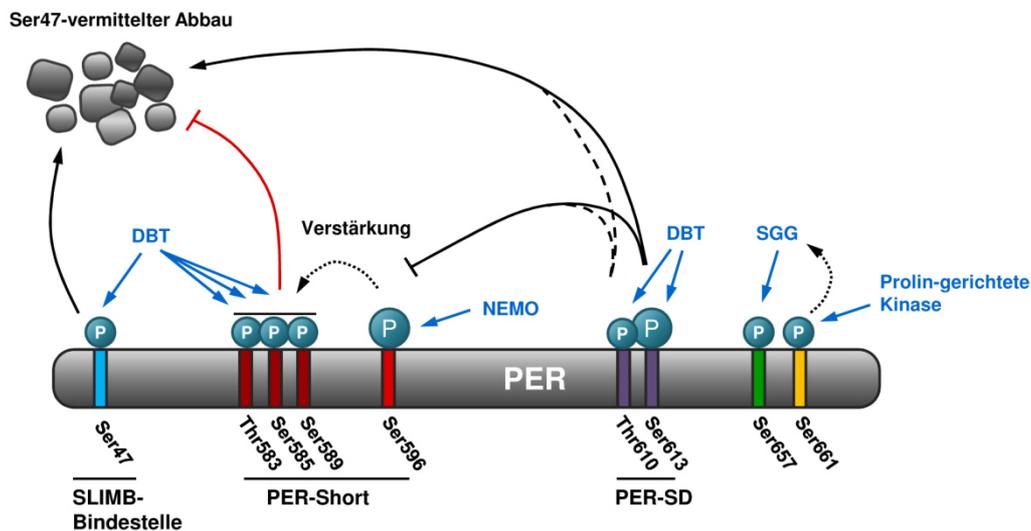


Abbildung 4: Phosphorylierungsdomänen im Uhrprotein Period

Gezeigtes Modell repräsentiert eine schematische Darstellung der Peptidsequenz des *Drosophila* Uhrproteins Period (PER) samt bereits charakterisierter Phosphorylierungsstellen und dazugehöriger Kinasen (blau). Für detaillierte Beschreibung siehe Fließtext. (modifiziert nach Garbe et al., 2013)

Diese umfasst einen Bereich von 26 Aminosäuren und beinhaltet mit Ser604, Ser607, Thr610, Ser613 und Ser629 fünf potentielle Phosphorylierungsstellen (Kivimäe et al., 2008). Thr610 und Ser613 stellen hierbei die am besten charakterisiertesten dar. Durch DBT phosphoryliert, kontrollieren sie das Timing der Phosphorylierung wie die Stabilität von PER und regulieren auf diese Weise die Taktgeschwindigkeit der inneren Uhr. Dies geschieht entweder über Hemmung der Phosphorylierung der „PER-Short“ Domäne, oder über einen noch unbekanntem Mechanismus parallel zu „PER-Short“. Unabhängig davon, weisen Fliegen mit Alanin anstelle von Thr610 und/oder Ser613 neben einem verzögertem PER-Abbau um bis zu 4 Stunden länger hyperphosphoryliertes CLK sowie eine verspätete CLK-vermittelte Transkription von PER auf und zeigen darüber hinaus lange Freilaufperioden unter konstanten Bedingungen (Garbe et al., 2013). Ähnlich lange Freilaufperioden, jedoch aufgrund eines verzögerten Kerneintritts von PER, zeigen Fliegenmutanten mit modifizierter Ser661 Phosphorylierungsstelle (Ko et al., 2010). Eine verminderte Hyperphosphorylierung von PER in Ser661 Mutanten lässt zudem in der Phosphorylierungsstelle ein Schlüsselsignal für weitere

Phosphorylierungsreaktionen in PER vermuten. Diese Hypothese konnten Ko et al. (2010) bestätigen und mit Ser657 eine Phosphorylierungsstelle von SGG identifizieren, einer Kinase die für ihre Phosphorylierungsreaktion einen Phosphatrest 4 Aminosäuren entfernt von ihrer eigentlichen Phosphorylierungsstelle benötigt (Cohen und Frame, 2001). Als mögliche Vermittler der Phosphorylierung von Ser661 und damit „Vorreiter-Kinase“ für SGG kommt laut Ergebnissen von *in vitro* Kinasenassays die Prolin-gerichtete MAP-Kinase ERK in Frage (Ko et al. 2010). Entsprechende Nachweise *in vivo* fehlen jedoch bis heute und lassen die Möglichkeit einer Phosphorylierung von Ser661 durch eine andere Prolin-gerichtete MAP-Kinase, wie beispielsweise die Stress-aktivierte Kinase p38, weiter offen.

1.3 Stress, innere Uhr und MAP-Kinasen

Die innere Uhr beeinflusst nahezu alle physiologischen und psychologischen Systeme. Störungen des circadianen Systems haben daher oft weitreichende Auswirkungen auf das Wohlbefinden und den Gesundheitszustand des Organismus. So weisen depressive Menschen nicht nur einen veränderten Plasma-Cortisolrhythmus auf, sondern zeigen zugleich gestörte Schlaf-Wach-Rhythmen (Deuschle et al., 1997). In Übereinstimmung hiermit postulieren zahlreiche Studien ein erhöhtes Risiko für Depressionen, Krebs- und Stoffwechselerkrankungen infolge von gestörten Tag-Nacht-Rhythmen (Winkler et al., 2005; Blume-Jensen and Hunter, 2001; Lee, 2006; Rudic et al., 2004). Ebenso kann Stress auch Auslöser und aufrechterhaltender Faktor gestörter circadianer Biorhythmen sein. So ist in Mäusen und Ratten die chronischen Stress ausgesetzt wurden, eine reduzierte Amplitude im circadianen PER2 Proteincycling im SCN zu beobachten (Jiang et al., 2011; Kinoshita et al., 2012). Darüber hinaus mehren sich Berichte über Auswirkungen von wiederholtem nicht-psychozialem Stress auf die Laufaktivität (Gorka et al., 1996), den Schlaf (Moreau et al., 1995), die Körpertemperatur (Ushijima et al., 2006) sowie den Plasma-Glukokortikoidspiegel (Ottenweller et al., 1994). Dass dabei die Antwort des Organismus auf den Stressfaktor in Abhängigkeit von der Tageszeit variieren kann, zeigen erst kürzlich durchgeführte Stress-Studien an Mäusen. So fanden Bartlang et al. (2012) einen deutlichen Effekt auf physiologische Parameter (ACTH-Empfindlichkeit und Nebennierengewicht) wenn Mäuse „social defeat“ Stress während des Tages ausgesetzt wurden. Immunologische Parameter (IFN γ Sekretion und Schweregrad einer Dextran-Natrium-Sulfat induzierten Kolitis) und

Verhaltensweisen (Heimkäfing- und Sozialverhalten) hingegen wurden am stärksten von psychosozialem Stress während der Nacht beeinflusst. Angesichts dieser vielseitigen und auch zeitabhängigen Wechselwirkungen von innerer Uhr und Stresssystem, wird die Frage nach einem Zusammenhang sowie den möglichen Kommunikationswegen beider Systeme immer drängender.

Als mögliches Bindeglied zwischen Stress- und circadianen System könnten MAP-Kinasen fungieren. Neben ihrer Funktion bei der Stressantwort, deuten neuere Studien auch auf eine entscheidende Rolle im circadianen System hin. Im SCN von Säugern exprimiert, unterliegen ERK und p38 einer circadian und einer lichtregulierten Aktivierung und stehen darüber hinaus im Verdacht den Licht-input an die innere Uhr zu koppeln und auf diese Weise das Licht-Entrainment zu steuern (Obrietan et al., 1998; Butcher et al., 2002; Butcher et al., 2003; Pizzio et al., 2003; Nakaya et al., 2003). So führt eine Hemmung des ERK-Signalwegs im SCN von Säugern zu einer Abschwächung der lichtinduzierten Phasenverschiebung (Butcher et al. 2002; Coogan and Piggins 2003), sowie zu einer Dämpfung der Expression früherer Gene (Butcher et al. 2002; Dziema et al. 2003; Akashi und Nishida 2000). Letztere besitzen eine *cAMP response element* (CRE) Konsensussequenz in ihrer Promotorregion - so auch *mPer1*, einen Säuger-Homolog des *Drosophila* Uhrgens *period*. Durch Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktor CREB (CRE Bindeprotein) an diese Sequenz, wird die Transkription von *mPer1* und somit der lichtinduzierte „Reset“ der inneren Uhr eingeleitet (Gau et al., 2002; Tischkau et al., 2003). Initiator und Ausgangspunkt dieses lichtinduzierten Reset-Vorgangs ist die MAP-Kinase ERK. Der CREB-Aktivierung vorausgeschaltet, phosphoryliert und aktiviert ERK die p90 ribosomale S6 Kinase (p90 RSK), den eigentlichen Aktivator der CREB-Phosphorylierung (Roberson et al., 1999). In diesem Zusammenhang bietet sich für p90 RSK und somit indirekt auch für ERK, eine weitere Möglichkeit Einfluss auf das circadiane System zu nehmen. So ist die ERK-Bindestelle in S6KII, ein Homolog von p90 RSK in *Drosophila*, nicht nur für die Aktivierung von S6KII, sondern mitunter auch für die Interaktion von S6KII mit der „Uhrkinase“ CK2 und die Modulation des circadianen Verhaltens von großer Bedeutung (Akten et al., 2009; Tangredi et al., 2012).

Zusätzlich zu ERK kann auch p38 die circadiane Rhythmen entscheidend beeinflussen. So konnten Hayashi et al. (2003) nach chronischer Applikation eines reversiblen und selektiven p38-Inhibitors auf kultivierte Zirbeldrüsenzellen, deutlich verlängerte Melatonin-Freisetzungsrhythmen beobachten. Zudem führte ausschließlich eine

kurzzeitige Inhibitorapplikation während des subjektiven Tages zu einer Phasenverschiebung des Rhythmus und lässt damit einen Tageszeit-spezifischen Effekt von p38 auf die innere Uhr vermuten. Weitere unabhängige Studien wiederum sehen im p38-Signalweg einen „Outputweg“ der inneren Uhr, der zum Beispiel die Anpassung und Vorbereitung des Organismus auf hyperosmotischen Stress in *Neurospora crassa* steuert (Vitalini et al. 2007; Lamb et al., 2011; zusammengefasst in de Paula et al., 2008). Neben der Reaktion auf osmotischen Stress scheint jedoch auch die oxidative Stressantwort uhrgesteuert zu sein. So treten im Vergleich zu Wildtypfliegen in Uhrmutanten keine tageszeitlichen Schwankungen in der Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid, einem Auslöser von oxidativen Stress, auf (Krishnan et al., 2008). Stattdessen scheinen *per⁰¹* Nullmutanten sensibler auf oxidativen Stress zu reagieren, ein Effekt der sich in einer erhöhten Sterberate äußert und erst durch eine zusätzliche Expression von PER im *per⁰¹*-Hintergrund „gerettet“ werden kann. In diesem Zusammenhang deuten Daten von Zheng et al. (2007) auf eine Regulation der Empfindlichkeit der inneren Uhr gegenüber oxidativem Stress durch FOXO hin, ein Protein welches durch p38 und ERK phosphoryliert und aktiviert wird (Asada et al., 2006) und liefern somit einen weiteren Hinweis für p38 als mögliche Schnittstelle zwischen circadianem und Stress-System.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Basierend auf Hinweisen zu einer Interaktion von p38 MAPK mit Komponenten des circadianen Systems von Vertebraten und Pilzen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage geklärt werden ob p38 in Uhrneuronen von *Drosophila melanogaster* exprimiert wird und wenn ja, welche Rolle die Stress-aktivierte Kinase gegebenenfalls im circadianen System der Fliege einnimmt.

Hierzu wurden zunächst Reporterlinienstudien durchgeführt, um das Expressionsmuster von p38 MAPK im Gehirn und Auge der Fliege im Generellen, sowie im Uhrneuronennetzwerk im Speziellen, zu untersuchen. Anschließende p38-Antikörperfärbungen von *Canton S* Wildtyp- und Kontrollfliegen sollten diese Expressionsdaten bestätigen und in Kombination mit quantitativen RT-PCRs und Westernblots zugleich Aufschluss über mögliche rhythmische Schwankungen im Proteinlevel sowie im Aktivierungsprofil von p38 geben. Um einer möglichen Rolle von p38 im circadianen System der Fliege nachzugehen, wurde darüber hinaus ein

verhaltensorientierter Ansatz gewählt. So sollte mittels Aufzeichnung der Laufaktivität von Fliegen mit modifiziertem p38a bzw. p38b Level in den Uhrneuronen die Bedeutung und Notwendigkeit von p38 MAPK für die Aufrechterhaltung und Entstehung circadianer Verhaltensrhythmen untersucht werden. Zugleich sollten Verhaltensdaten erste Hinweise auf mögliche Ansatzpunkte von p38 im circadianen System liefern. Nicht-radioaktive *in vitro* Kinasenassays sowie immunhistochemische Untersuchungen zur Phosphorylierung und nukleären Translokation des Uhrproteins PER in *p38* Mutanten sollten abschließend der Frage nach einer Uhr-spezifischen Funktion von p38 nachgehen und mögliche Interaktionspartner wie potentielle *in vitro* Phosphorylierungsstellen von p38 identifizieren.

2 Material

2.1 Fliegenstämme

Tabelle 1: Verwendete Fliegenstämme.

Wildtyp, Balancer und Mutanten			
Genotyp	Details	Herkunft	Referenz
<i>Canton S (CS)</i>	Wildtypstamm <i>Canton Special</i>	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>white</i> -Mutante, ABC-Transporter	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
<i>w¹¹¹⁸; ; p38a^{Δ1}</i>	<i>p38a</i> -Nullmutante im <i>w</i> -Hintergrund, generiert über p-Element-Mutagenese	R. Cagan	Craig et al., 2004
<i>y¹ w^{67c23}; p38b^{Δ45}</i>	<i>p38b</i> -Nullmutante im <i>y w</i> -Hintergrund, generiert über p-Element-Mutagenese	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011
<i>y¹ w^{67c23}; p38b^{pex41}</i>	Kontrollstamm für <i>p38b^{Δ45}</i> mit exakter p-Element-Transposition	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011
<i>y¹ w^{67c23}; p38b^{Δ45}/CyO-GFPw⁺; p38a^{Δ1}</i>	Doppelknockoutmutante I (DKO I), hypomorphes <i>p38b</i> Allel im <i>p38a^{Δ1}</i> -Hintergrund, homozygot nur 5% lebensfähig	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011
<i>y¹ w^{67c23}; p38b^{Δ45}/CyO-GFPw⁺; p38a^{Δ1}/TM3 Ser-GFP</i>	Doppelknockoutmutante II (DKO II), Nullmutante für <i>p38a</i> und <i>p38b</i> , homozygot nicht lebensfähig	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011
<i>w⁻; ScO/CyO; MKRS/TM6B</i>	Doppelbalancer-Stamm für II. und III. Chromosom im <i>w</i> -Hintergrund	Stammsammlung	
GAL4-Treiberlinien, UAS-Responderlinien und weitere Stämme			
Genotyp	Details	Herkunft	Referenz
<i>w¹¹¹⁸; UAS-p38b^{RNAi}</i>	Responderlinie, <i>p38b</i> RNA unter UAS-Kontrolle	VDRC (#108099)	
<i>w¹¹¹⁸; ; UAS-p38a^{RNAi}</i>	Responderlinie, <i>p38a</i> RNA unter UAS-Kontrolle	VDRC (#52277)	
<i>w¹¹¹⁸; UAS-p38b^{RNAi}; UAS-p38a^{RNAi}</i>	Kombination aus VDRC #108099 und #52277	vorliegende Arbeit	
<i>UAS-p38b⁺</i>	Responderlinie, <i>p38b</i> cDNA unter UAS-Kontrolle	T. Adachi-Yamada	Adachi-Yamada et al., 1999
<i>UAS-p38b^{DN-S}/FM7C</i>	Responderlinie, Expression eines dominant negativen <i>p38b</i> Allels unter UAS-Kontrolle, generiert durch Austausch des Thr-183 im TGY-Motiv mit Ala	T. Adachi-Yamada	Adachi-Yamada et al., 1999
<i>UAS-p38b^{KD3}/CyO-GFP; UAS-p38b^{KD8}/TM3, Sb</i>	Responderlinie, Expression zwei unterschiedlich starker <i>p38b^{Kinase Dead}</i> Allele unter UAS-Kontrolle, generiert durch Austausch des Lys-53 der katalytischen Domäne mit Arg,	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011

	Substratbindung noch möglich aber Kinasenaktivität geblockt (persönliche Mitteilung A. Vrailas-Mortimer)		
$w^{[1]}$; ; $P\{w^{[+mC]}\}$ =UAS- GFP^{S65T} ; $ieg^{[T10]}$	Responderlinie, zytoplasmatische Expression von GFP unter UAS-Kontrolle	Stammsammlung (BL, #1522)	
w ; UAS- $nuclacZ^{360}$	Responderlinie, nukleäre Expression von lacZ unter UAS-Kontrolle	Stammsammlung	
$p38b$ -GAL4/CyO	Enhancer trap-Linie zur p38b spezifischen Expression von Gal4	A. Vrailas-Mortimer	Vrailas-Mortimer et al., 2011
$w^{[1]}$; $P\{w^{[+mC]}\}$ =cry- GAL4-39} (w ; cry-GAL4-39)	Treiberlinie zur CRY spezifischen Expression von GAL4 (u.a. im Auge und CRY ⁺ -Uhrneuronen)	Stammsammlung F. Rouyer	Klarsfeld et al., 2004
$y^{[1]}$ $w^{[1]}$; $P\{w^{[+mC]}\}$ =pdf-GAL4} (y w ; Pdf-GAL4)	Treiberlinie zur PDF spezifischen Expression von GAL4 (in s-LN _v s und l-LN _v s)	Stammsammlung J. C. Hall	Renn et al., 1999
UAS- $dicer2$; Pdf-GAL4	Pdf-Treiberlinie in Kombination mit UAS- $dicer2$ zur Verstärkung der RNA Interferenz	Stammsammlung T. Yoshii	
$w^{[1]}$; $P\{w^{[+mC]}\}$ =tim-UAS-GAL4} (w ; tim(UAS)-GAL4)	Treiberlinie zur TIM spezifischen Expression von GAL4 (u.a. im Auge, Uhrneuronen und Gliazellen)	Stammsammlung M. Young	Blau and Young, 1999
UAS- $dicer2$; tim(UAS)-GAL4	tim-Treiberlinie in Kombination mit UAS- $dicer2$ zur Verstärkung der RNA Interferenz	Stammsammlung T. Yoshii	Hermann et al., 2011
$w^{[1]}$; ; $daughterless$ - GAL4 (w ; ; da-GAL4)	Treiberlinie zur Expression in allen Geweben	Stammsammlung	Smith und Cronmiller, 2001
w ; $p38b$ -lacZ	an lacZ gekoppeltes 1184bp großes Fragment inklusive p38b-Promotorregion (-901 bis +208)	M. Yoo	Park et al. (2003)

VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center; BL: Bloomington Stock Center

Fliegenaufzucht und -haltung erfolgte in Gläsern mit Drosophila-Standardmedium (0,8% Agar, 2,2% Zuckerrübensirup, 8,0% Maismehl, 1,0% Sojamehl, 8,0% Malzextrakt, 1,8% Hefe und 0,3% Methyl-4-hydrobenzoat) in einem 12 stündigen Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12) bei 18°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65%. Alternativ wurden Kreuzungen bei 25°C durchgeführt. Das Entrainment und die Aufzeichnung der Laufaktivität der Fliegen erfolgte bei 20°C.

2.2 Bakterienstämme

Für die Klonierung und Expression der Konstrukte His₆-p38a und His₆-p38b kamen zwei unterschiedliche Bakterienstämme zum Einsatz: *One Shot TOP10*, ein Stamm mit hoher

Transformationsrate für die anfänglichen Transformation in *E.coli*, sowie der Expressionsstamm *BL21(DE3)pLysS*. Letzterer wurde ausschließlich zur heterologen Proteinexpression verwendet und besitzt ein T7 Expressionssystem. Hier befindet sich das zu exprimierende Zielgen unter Kontrolle eines T7-Promotors. Zusätzlich erlaubt eine T7 RNA Polymerase unter Kontrolle eines *lac* UV5 Promotors eine IPTG-induzierte Expression des Zielgens während ein *pLysS* Plasmid mit T7-Lysozym, einem T7 RNA Polymerase Inhibitor, einer mögliche Hintergrundexpression entgegenwirkt. Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte in der Regel für 14 bis 16 Stunden bei 37°C auf Agarplatten oder in Flüssigkultur auf einem Rundschüttler bei 220 rpm. Zur langfristigen Verwahrung wurden 500 µl Bakteriensuspension 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

Art, Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> , One Shot TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (#C4040-10)
<i>Escherichia coli</i> , BL21(DE3) <i>pLysS</i>	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm gal</i> (DE3) <i>pLysS Cm^r</i>	Promega (#L1191)

2.3 Medien

Tabelle 3: Verwendete Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB ₀ -Medium	10 g/l BactoTryptone; 10 g/l NaCl; 5 g/l Bacto Yeast Extract; 3 ml/l 1 M NaOH; pH 7 (Kulturmedium)
LB _{Amp} -Medium	LB ₀ -Medium mit 50-100 µg/ml Ampicillin (Selektivmedium)
LB _{Amp} -Platten	LB _{Amp} -Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 8 g/l Bacto-Agar (Selektivplatten)
Trikinetics-Medium	4% Sucrose; 2% Agar-Agar

LB: Lysogenybroth

2.4 Vektor

Zur Herstellung von Fusionsproteinen mit amino-terminalem Hexahistidin Tag wurde der Expressionsvektor pH6HTN His₆Halo Tag T7 (Abb. 5; Promega; #G797A) verwendet.

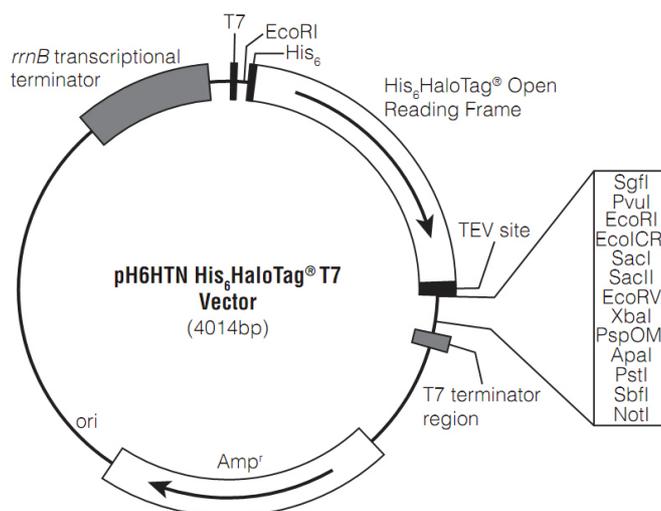


Abbildung 5: Expressionsvektor pH6HTN His₆Halo Tag T7

Der verwendete Expressionsvektor pH6HTN His₆Halo Tag T7 umfasst 4014bp und besitzt neben einer *multiple cloning site* (MCS), ein Ampicilin-Resistenz-Gen sowie einen T7 Promotor zur *in vivo* Expression in *E.coli* mit T7 RNA Polymerase. Eine der MCS benachbarte Tag-Sequenz erlaubt darüber hinaus die gezielte Expression N-terminal markierter Fusionsproteine mit His₆Halo Tag. Zusätzlich ermöglicht eine der MCS und Tag-Sequenz zwischengeschaltete TEV Sequenz ein späteres Entfernen des Proteintags vom Fusionsprotein unter Verwendung einer Halo TEV Protease. (<https://www.promega.de/resources/protocols/product-information-sheets/g/ph6htn-his6halotag-t7-vector-protocol/>)

2.5 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurde im Reinheitsgrad „entsalzt“ von der Firma Sigma bezogen und sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Annealing -Temp.	Verwendung
α-tub CG1913-control-5'	tctgcgattcgatggtgcccttaa	60°C	interne qPCR Kontrolle (Haushaltsgen)
α-tub CG1913-control-3'	ggatgcgacttgaccatctggtggc	60°C	interne qPCR Kontrolle (Haushaltsgen)
p38a wue S	gcccgtagacaaatggaagga	53°C	qPCR <i>p38a</i>
p38a wue AS	aacctgagcatacgatggtgg	52°C	qPCR <i>p38a</i>
p38b wue S	gagatggtcttcagcgaggt	53°C	qPCR <i>p38b</i>
p38b wue AS	agcatcattgaacggagaggg	53°C	qPCR <i>p38b</i>

p38b forward2	gaaaaggtg tag gcgcagcggaatag	61°C	qPCR <i>p38b</i>
p38b reverse2	ttgatggccaccttcgtgctggtt c	60°C	qPCR <i>p38b</i>
p38a Mpk2-RA-PvuI-Bac-5'	tcgatcgg caataccatgctcagtgt ccatt ac		5' Primer für <i>p38a</i> mit PvuI Ss; Klonierung <i>p38a</i> in pH6HTN His ₆ HaloTag® T7
p38a Mpk2-RA-ApaI-Bac-3'	tgggccct gttc act tta cat cctttagaacct gag		3' Primer für <i>p38a</i> mit ApaI Ss; Klonierung <i>p38a</i> in pH6HTN His ₆ HaloTag® T7
p38b-RA-PvuI-Bac-5'	ccgatcgg aaatgctgcgcaaaat ggccaaattc		5' Primer für <i>p38b</i> mit PvuI Ss; Klonierung <i>p38b</i> in pH6HTN His ₆ HaloTag® T7
p38b-RA-NotI-Bac-3'	ggcggccg cgattactgctctttg ggcaggagctca		3' Primer für <i>p38b</i> mit NotI Ss; Klonierung <i>p38b</i> in pH6HTN His ₆ HaloTag® T7
pH6HTN His ₆ Halo Seq-5'	gca aga aga caa ccc gga cct gat c		Sequenzierung der Konstrukte im pH6HTN His ₆ Halo Vektor
p38a_455 Seq-5'	gga tcg ctg gag aac ttc caa cag g		Sequenzierung <i>p38a</i>
p38a_1075 Seq-5'	gga ggc tct ttc cca tcc ata tct gg		Sequenzierung <i>p38a</i>
p38b_460 Seq-5'	ttg gtc tgc tgg atg tct ttc atc c		Sequenzierung <i>p38b</i>
p38b_1061 Seq-5'	cat cga ttt gct gga gaa gat gct g		Sequenzierung <i>p38b</i>

Enzymschnittstellen sind hervorgehoben. Ss: Schnittstelle

2.6 Antikörper und Seren

Alle Antikörper (Tab. 5) wurden nach Herstellerangaben gelöst und gelagert. Um häufige Tau-Gefrier-Zyklen bei sekundären, fluoreszenz-markierten Antikörpern zu vermeiden, wurden diese zusätzlich 1:1 mit Glycerol versetzt.

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Primäre Antikörper (Wirt)	Anwendung (Verdünnung)	Eigenschaften/Verwendung	Herkunft/Referenz
anit-lacZ (40-1a) (Maus)	IHC (1:100)	anti-β-Galaktosidase; monoklonal	Santa Cruz (#65670)
anti-TIM (Ratte)	IHC (1:1000)	anti-timeless; polyclonal; generiert gegen Polyhistidin markiertes Timeless (AS 222–577)	I. Ederly
anti-PER (Kaninchen)	IHC(1:1000) WB(1:5000)	anti-period;	Stanewsky et al., 1997
anti-PDF(c7)	IHC (1:1000)	anti-Pigment DispersingFactor	DSHB

(Maus)		(PDF);generiert gegen amidiertes <i>Drosophila</i> PDF (NSELINSLLSLPKNMNDA-NH2)	
anti-p-p38 (Kaninchen)	IHC (1:100)	anti-phospho-p38; monoklonal; generiert gegen menschliches phosphoryliertes p38; detektiert auch zweifach phosphorylierte <i>Drosophila</i> p38 Isoformen	Invitrogen (#4631)
anti-p38 (dN-20) (Ziege)	IHC (1:50) WB(1:200)	polyklonal; gerichtet gegen N- terminales Epitop von <i>Drosophila</i> p38;	Santa Cruz (#15714)
anti-p38b (Kaninchen)	IHC (1:100)	bindet neben <i>Drosophila</i> p38b vermutlich auch p38a	Adachi-Yamada et al., 1999
anti-GFP (Huhn)	IHC (1:100)	anti- Green Fluorescent Protein (GFP); polyklonal	Abcam (Ab13970)
anti-β-Aktin	WB (1:2500)	bindet die β-Isoform des Strukturproteins Aktin	S. Schneuwly
anti-Rh1(4C5) (Maus)	IHC (1:100)	anti-Rhodopsin1; monoklonal	DSHB
Sekundäre Antikörper (Wirt - Reaktivität)	Anwendung (Verdünnung)	Details	Herkunft/Referenz
Alexa Fluor 488 (Ziege anti-Huhn)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A11039)
Alexa Fluor 488 (Ziege anti- Meerschwein)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A11073)
Alexa Fluor 488 (Ziege anti-Maus)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A11029)
Alexa Fluor 488 (Ziege anti-Kaninchen)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A11034)
Alexa Fluor 555 (Ziege anti-Kaninchen)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A21429)
Alexa Fluor 555 (Ziege anti-Ratte)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A21434)
Alexa Fluor 555 (Affe anti-Ziege)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A21432)
Alexa Fluor 635 (Ziege anti-Maus)	IHC (1:200)		Invitrogen (#A21076)
Alexa Fluor 635 Phalloidin	IHC (1:200)	fluoreszenz-markiertes Phallotoxin Phalloidin aus <i>Amanita phalloides</i> ; bindet F-Aktin	Invitrogen (#A34054)
Alexa Fluor 647 (Affe anti-Maus)	IHC (1:25)		Invitrogen (#A31571)
Alexa Fluor 680 (Ziege anti-Kaninchen)	WB(1:5000)		Invitrogen (#A2116)
IRDye680 (Affe-anti-Ziege)	WB(1:5000)		LI-COR Biosciences (#926- 32224)
Seren	Anwendung (Verdünnung)	Details	Herkunft/Referenz

Normal Goat Serum (NGS)	IHC (5%)	zum Blocken unspezifischer Bindungen	Sigma (#G9023)
Normal Donkey Serum (NDS)	IHC (5%)	zum Blocken unspezifischer Bindungen	Sigma (#D9663)

IHC: Immunhistochemie; WB: Westernblot; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank; IgG: Immunglobulin G; AS: Aminosäure

2.7 Kitsysteme

Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme.

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
Quick-RNA™ MicroPrep	RNA Extraktion	Zymo Research (#R1051)
SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit	quantitative Real-time PCR	Bioline (#98020)
QuantiTectReverse Transcription Kit	cDNA Synthese	Qiagen (#205311)
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen; Klonierung	Sigma (#NA1020)
MSB® Spin PCRapace	DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen; Sequenzierung	Invitak (#1020220300)
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Plasmid DNA Extraktion (Minipräparation)	Sigma (#PLN70)
Phusion High-Fidelity PCRKit	Klonierung	Thermo Scientific (#F553)

2.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Verwendung	Herkunft
Agarose-Gelelektrophorese		
TAE (Tris-acetate-EDTA) (10x Konzentrat)	400 mM Tris-Acetat and 10 mM EDTA, pH 8.3; Agarose-Gelelektrophorese: 0,5x	Sigma (#T9650)
6x DNA Ladepuffer	0,001 M EDTA; 50% Glycerol (v/v); 0,25% Bromphenolblau (w/v); 0,25% Xylencyanol (w/v)	
Restriktionsverdau		
10x Fast Digest Buffer	Puffer für Restriktionsverdau	Thermo Scientific (#FD0274)
10x Fast Digest Green Buffer	Puffer für Restriktionsverdau; beinhaltet Farbstoffe und erlaubt direktes Laden auf ein Agarosegel	Thermo Scientific (#FD0274)
Immunhistochemie		

PBS (Phosphate buffered saline)	7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM NaH ₂ PO ₄ ; 154 mM NaCl; pH 7,4	Sigma (#P5493)
PBST (0,1% oder 0,5%)	PBS mit Triton X-100 (0,1% oder 0,5%; v/v); pH 7,4	
Paraformaldehyd (PFA)	4% PFA in PBS oder PBST 0,1% (hier: 4% PFA in PBS mit Triton X-100 versetzt; 0,1%; v/v)	Affimetrix (#199431)
Blocklösung	5% NGS bzw. 5% NDS in PBST 0,5% (v/v) ; frisch angesetzt	
Proteinextraktion		
Stammlösung für Proteinextraktionspuffer (Köpfe)	20 mM HEPES (pH 7,5); 100 mM KCl; 5% Glycerol (v/v); 10 mM EDTA; 0,1% Triton X-100 (v/v); 20 mM β -Glycerophosphat; 0,1 mM Natriumorthovanadat (pH 10-12);steril filtriert; Lagerung bei -20°C	
Proteinextraktionspuffer (Köpfe)	1ml (frisch ansetzen): 854 μ l Proteinextraktionspuffer I (Stammlsg.); 142 μ l 7x cOmplete Proteaseinhibitor; 1 μ l 1M Dithiothreitol; 1 μ l Pepstatin (10 mg/ml); 2 μ l Aprotinin (10 mg/ml)	
cOmplete, Mini, EDTA-free (Proteaseinhibitor)	7x Stammlösung: 1 Tablette cOmplete, Mini, EDTA-free Proteaseinhibitorcocktail auf 1,5 ml mit H ₂ O _{bidest}	Roche (#04693159001)
Lysispuffer (Bakterien)	50mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 5mM Imidazol	
SDS- und Harnstoff-PAGE		
Tris-Glycin Lösung	240 mM Tris; 2,13 M Glycin	
2x Harnstoff-Ladepuffer	0,5 ml (frisch ansetzen): 0,273g Harnstoff; 45 μ l Tris-Glycin-Lösung; 1,5 μ l 500mM EDTA (pH 7.5); 1 μ l 500mM Dithiothreitol (frisch angesetzt); 0,04% Bromphenolblau (w/v); auf 500 μ l mit H ₂ O _{bidest}	
5x SDS-Ladepuffer	312 mM Tris; 10% SDS (w/v); 50% Glycerol (v/v); 20% β -Mercaptoethanol (v/v); 0,1% Bromphenolblau (w/v)	
Harnstoff-Trenngel 9%	10 ml (kleines Gel): 4,8g Harnstoff; 3,3ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 833 μ l Tris-Glycin-Lösung; auf 10ml mit H ₂ O _{bidest} ; 50 μ l 10% APS; 5 μ l TEMED	
Harnstoff-Sammelgel 5%	10ml (kleines Gel): 4,8g Harnstoff;1,7ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 715 μ l 1M Tris (pH 6,8); auf 10 ml mit H ₂ O _{bidest} ; 50 μ l 10% APS; 10 μ l TEMED	
SDS-Trenngel 6%	25 ml (großes Gel): 12,21 ml H ₂ O _{bidest} ; 6,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8); 250 μ l 10% SDS; 4,9 ml 30% Acrylamid; 1 ml 2% Bisacrylamid; 125 μ l 10% APS; 15 μ l TEMED	
SDS-Trenngel 10%	25ml (großes Gel): 9,78 ml H ₂ O _{bidest} ; 6,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8); 250 μ l 10% SDS; 8,33 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 125 μ l 10% APS; 15 μ l TEMED	
SDS-Sammelgel 4,5%	10 ml (großes Gel): 7,08 ml H ₂ O _{bidest} ;1 ml 1 M Tris (pH 6,8); 100 μ l 20% SDS; 1,48 ml 30% Acrylamid; 300 μ l 2% Bisacrylamid; 50 μ l 10% APS; 10 μ l TEMED	
Elektrophoresepuffer I (SDS-PAGE)	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% SDS (v/v)	
Elektrophoresepuffer II	20mM Tris; 178 mM Glycin	

(Harnstoff-PAGE)		
Western Blot und Coomassie-Färbung		
Transferpuffer (Wet-blot)	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% Methanol (v/v); 0,2% SDS (v/v)	
Transferpuffer (Semi-Dry-Blot)	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% Methanol (v/v); 0,04% SDS (v/v)	
TBS (Tris buffered saline)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl	
TBST	TBS mit 0,1% Tween20 (v/v)	
Blocklösung	50% Odyssey Blocking Buffer in TBS	
Coomassie-Färbelösung	0,14% Coomassie Brilliant Blau R-250 (w/v); 9% konz. Essigsäure (v/v); 45% Ethanol (v/v)	
Entfärbelösung	7% konz. Essigsäure (v/v); 5% Ethanol (v/v)	
Ni-Chelat Affinitätschromatographie		
Äquilibrierungs-/Waschpuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol	
Elutionspuffer I	50mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 150 mM Imidazol	
Elutionspuffer II	50mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol	
Elutionspuffer III	50mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol	
In vitro Kinasenassay		
10x Kinasepuffer	500 mM Tris-HCl (pH 7,5); 300 mM Mg ²⁺ ; 50 mM Dithiothreitol (frisch angesetzt); 10 mM ATP; 1 mM Natriumorthovanadat (pH 10-12); 25 mM β-Glycerophosphat	

SDS :Sodiumdodecylsulfat; PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.9 Größenstandards, Enzyme und Proteine

Tabelle 8: Verwendete Größenstandards, Enzyme und Fusionsproteine.

Bezeichnung	Details / Verwendung	Herkunft
Enzyme / Proteine		
Proteinase K	Extraktion von Einzelfliegen-DNA	Roche
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Dephosphorylierung von Vektoren	Thermo Scientific (#EF0654)
T4 DNA Ligase	Ligation	Thermo Scientific (#EL0014)
Restriktionsenzyme	Restriktionsverdau	Thermo Scientific
cOmplete Mini EDTA-free Protease inhibitor cocktail	Proteaseinhibitoren-Gemisch	Roche (#04693159001)
MBP (Myelin Basic Protein)	in vitro Kinasenassay	Sigma (#M1891)
GST	Glutathion-S-Transferase; in vitro Kinasenassay	T. Raabe (Dusik et al., 2014)
GST-PER ¹⁻⁷⁰⁰	GST-gebundenes rekombinates PER (AS 1-700); in vitro Kinasenassay	T. Raabe (Dusik et al., 2014)

GST-PER ⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴	GST-gebundenes rekombinates PER (AS658-1124); in vitro Kinasenassay	T. Raabe (Dusik et al., 2014)
JumpStart REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Kolonie-PCR; Test-PCRs zur Optimierung der Annealing-Temperatur	Sigma (#P0982)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Sequenzierung; Klonierung von p38a-His ₆ und p38b-His ₆	Thermo Scientific (#F530)
Größenstandards		
GeneRuler 1kb DNA Ladder	DNA-Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese	Fermentas (# SM0311)
Roti-Mark Standard	Protein-Größenstandard für SDS-PAGE; Größenbereich: 14-212 kD	Carl Roth (#T851.1)
Prestained Protein Marker	Protein-Größenstandard für SDS-PAGE; Größenbereich: 7-175 kD	New England BioLabs (#P7708S)

AS: Aminosäure; kD: Kilo-Dalton

2.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Verwendung	Herkunft
Midori Green Advance	DNA-Färbemittel für Agarose-Gelelektrophorese	NIPPON Genetics EUROPE GmbH
Odyssey Blocking Buffer	Blocklösung für Western-Blot	LI-COR Bioscience (#927-40003)
Rotiphorese Gel 30	30% Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1	Carl Roth (#3029.1)
Rotiphorese Gel A	30%ige Acrylamidlösung	Carl Roth (#3037.1)
Rotiphorese Gel B	2%ige Bisacrylamidlösung	Carl Roth (#3039.1)
HIS Select Nickel Affinity Gel	Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie; als Säule zur Bindung von Poly-Histidin gebundenen Proteinen	Sigma (#P6611)
Triton X-100	Detergenz	Carl Roth (#3051.4)
Vectashield	Immunhistochemie; Einbettmedium für Fluoreszenzmikroskopie	Vector Laboratories (#H-1000)

3 Methoden

3.1 Verhalten

3.1.1 Entrainment und Aufzeichnung der Laufaktivität

Entrainment bezeichnet die Synchronisation der Fliegen an ein vorgegebenes Licht-Dunkel-Regime und ermöglicht das Absammeln der Versuchstiere für Folgeexperimente zu bestimmten Tageszeiten. Hierfür wurden, wenn nicht anders angegeben, 3-7 Tage alte Fliegen in zeitlich versetzt geschalteten Lichtboxen (Abbildung 6) 4 Tage auf Standardmedium bei 20°C, 60% (+/- 1%) Luftfeuchtigkeit und Weißlicht der Intensität 100 lux an einen 12h:12h Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12) synchronisiert. Nach chronobiologischem Standard wurde der Zeitpunkt für „Licht-an“ mit Zeitgeber-Zeit 0 (zeitgeber time; ZT), der Zeitpunkt „Licht-aus“ mit ZT12 definiert. Die Aufzeichnung der Laufaktivität von 3-7 Tage alten adulten Männchen erfolgte mit dem *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) System (Trikinetics; Waltham; MA) nach Hermann et al. (2012). Eine detaillierte Beschreibung und graphische Darstellung der Aufzeichnungsanlage ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Jedes Verhaltensexperiment setzte sich aus 2 Versuchsabschnitten zusammen: einer Woche in einem LD 12:12 sowie zwei weiteren Wochen unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen (DD). Während mit Hilfe des künstlichen Lichtregimes die Anpassungsfähigkeit der inneren Uhr an einem vorgegebenen Tag-Nacht-Rhythmus untersucht wurde, diente der zweite Versuchsabschnitt dazu die individuelle Taktgeschwindigkeit der inneren Uhr, die sogenannte Freilaufperiode, unter Abwesenheit externer Zeitgeber zu berechnen.

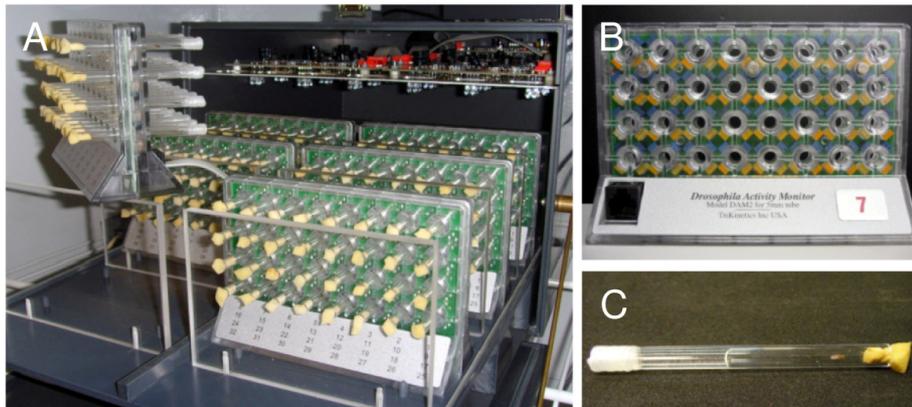


Abbildung 6: Lichtbox und Drosophila Activity Monitoring (DAM) System

Das Entrainment und die Aktivitätsmessung erfolgten in eigens konstruierten, lichtundurchlässigen und über ein Ventilationssystem belüfteten Lichtboxen (A). Bis zu 144 an der Deckenplatte angebrachte Weißlicht-LED (11000mcd, Lumitronix, LED-Technik, Hechingen, Deutschland) sorgten für eine gleichmäßige Beleuchtung der Versuchstiere. Für die Aufzeichnung der Laufaktivität kamen zusätzlichen DAM-Aktivitätsmonitore (B) der Firma Trikinetics (Trikinetiks, Waltham, MA) zum Einsatz. Letztere verfügen über Steckplätze für insgesamt 32 Aufzeichnungseinheiten sowie einen Infrarotstrahl an jedem einzelnen Steckplatz. Als Aufzeichnungseinheit wurde pro Fliege ein mit einer Agar-Zucker-Mediums (2% Agar; 4% Zucker) gefülltes Glasröhrchen (C) gewählt und so innerhalb des DAM-Aktivitätsmonitors platziert dass der Infrarotstrahl den Freilaufbereich der Fliege in zwei gleichmäßige Bereiche unterteilt. Jede Unterbrechung des Infrarotstrahl wurde in Folge als Aktivität registriert und in 1-Minuten-Aktivitätswerte zusammengefasst. Ein Tag entspricht demnach 1440 Messpunkten.

3.1.2 Auswertung der Aktivitätsdatendaten

Zur Analyse der Laufaktivität wurden, wie im Folgenden näher beschrieben, Aktogramme und Durchschnittstage erstellt um daraus die Freilaufperiode bzw. den Beginn der Abendaktivität zu bestimmen.

Aktogramm

Das Aktogramm beschreibt die graphische Darstellung des Aktivitätsprofils einer einzelnen Fliege über den gesamten Aufzeichnungszeitraum. Die Laufaktivität des Tiers wird durch einen Balken auf der Zeitachse wiedergegeben, die Höhe des Balken repräsentiert das Aktivitätsniveau zum jeweiligen Zeitpunkt (Abb. 7A). Die im Rahmen dieser Arbeit illustrierten Aktogramm sind als Doppelplots dargestellt. Die einzelnen Tage werden hierbei nicht nur untereinander abgebildet, sondern zeitlich versetzt auf der linken Seite wiederholt. Die Berechnung und Darstellung erfolgte aus den 1-Minuten-Aktivitätswerten des gesamten Datensatzes mit Actogram J (Schmid et al., 2011), einem kostenfreien, frei zugänglichen Java-Plug-in der Grafiksoftware Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>, Wayne Rasband, NIH, USA). Um atypisches Laufverhalten der

Fliegen aufgrund von CO₂-Begasung oder neuer Umgebung auszuschließen, wurde der erste Tag eines LD-Experiments grundsätzlich von jeglicher Auswertung ausgeschlossen. Ebenso wurden Fliegen, die während der Aufzeichnung starben oder nicht an einen LD 12:12 synchronisierten, für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt.

Durchschnittstag

Die Darstellung der Aktivitätsdaten in Form eines 24h-Aktivitätsprofils (Durchschnittstag) erfolgte durch Auswertung der LD-Daten mit Microsoft Excel. Hierfür wurden zunächst Rohdaten von Tag 2-7 des LD-Abschnitts einer Fliege für jede Minute gemittelt und zu einem Einzel-Durchschnittstag zusammengefasst. Um die Genotypen untereinander besser vergleichen zu können, wurden im Anschluss die Einzel-Durchschnittstage aller entrainer Fliegen eines Genotyps zu einem Durchschnittstag (Abb. 7A Abbildung 7A Abbildung 7) vereint. So repräsentieren alle im Rahmen dieser Arbeit illustrierten Durchschnittstage stets das 24h-Aktivitätsprofil eines Genotyps und nicht einer einzelnen Fliege. Zur Glättung des Aktivitätsprofils wurde zusätzlich der gleitende Mittelwert aus jeweils 11 benachbarten Aktivitätswerten gebildet. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem freien Open-Source-Programm QtiPlot (<http://qtiplot.com>, Ion Vasilief, Rumänien).

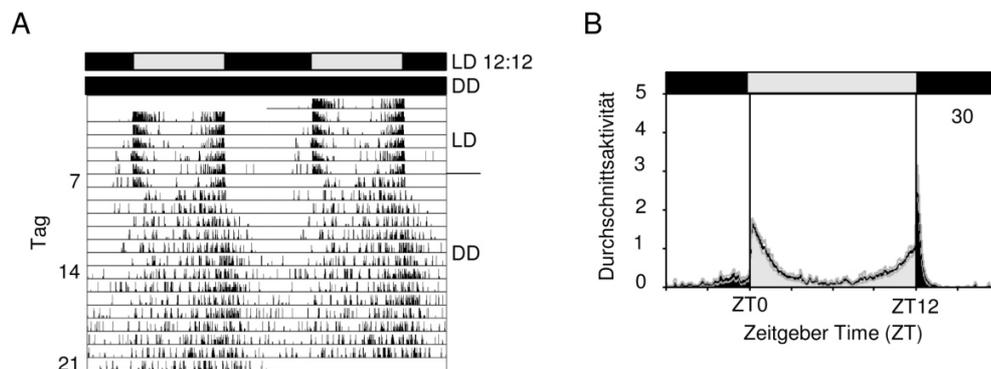


Abbildung 7: Aktogramm und Durchschnittstag des Wildtypstamm *Canton S*

A zeigt ein exemplarisches Doppelblot-Aktogramm einer einzelnen *Canton S* (CS)-Fliege in einer Woche LD 12:12 und zwei Wochen DD, B repräsentiert das durchschnittliche 24h-Aktivitätsprofil des Wildtypstamm CS in LD 12:12. Die Anzahl *n* der ausgewerteten Fliegen in B ist oben rechts im Graphen wiedergegeben. Die virtuelle Zeitgeber Time (ZT) wird auf der x-Achse, die zum Tagesaktivitätsmaximum normalisierte durchschnittliche Laufaktivität auf der y-Achse abgebildet. Über den Graphen dargestellten Balken in A und B repräsentieren das verwendete Lichtregime – schwarz symbolisiert „Licht-aus“, hellgrau „Licht-an“.

Abendaktivitätsbeginn

Die Ermittlung des Aktivitätsbeginns am Abend erfolgte zunächst für jede einzelne Fliege mit Hilfe der Einzel-Durchschnittstags. Um den abendlichen Aktivitätsanstieg im Graphen deutlicher darzustellen und somit die zeitliche Bestimmung des Aktivitätsstarts zu erleichtern, wurden Einzel-Durchschnittstage diesmal aus 15-Minuten-Aktivitätswerten berechnet. Die ermittelten Minutenwerte wurden im Anschluss innerhalb des Genotyps gemittelt und in die Maßeinheit Zeitgeber-Zeit (ZT) umgerechnet. Die statische Auswertung der Daten erfolgte wie in Abschnitt 3.6 beschrieben.

Freilaufperiode

Verhaltensversuche unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen, lassen Rückschlüsse auf den eigentlichen Rhythmus der inneren Uhr (Freilaufperiode) des Organismus zu. So wurden Fliegen nach einer Woche LD, zusätzlich zwei weitere Wochen in DD aufgezeichnet. Die Berechnung der Freilaufperiode jeder Fliege erfolgte aus den DD-Rohdaten von Tag 9-18 nach Sokolove und Bushell (1978) unter Verwendung der χ^2 -Periodogrammanalyse mit einem Signifikanzniveau von 5%. Ein entsprechendes Makro für Microsoft Excel wurde von Taishi Yoshii zur Verfügung gestellt. Die ebenfalls berechnete Power, als Prozentsatz der Varianz festgelegt, galt als Maß für die Rhythmizität der Fliegen. So wurden Fliegen mit einer Power kleiner zwanzig als arrhythmisch gewertet. Die ermittelten Freilaufperioden rhythmischer Fliegen hingegen wurden innerhalb des Genotyps gemittelt und statistisch ausgewertet.

3.2 Methoden auf DNA-Ebene

3.2.1 DNA-Extraktion und Reinigung

3.2.1.1 Extraktion von Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation)

Die Isolierung extrachromosomaler Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation) erfolgte in der Regel aus 2 ml einer Übernacht-Flüssigbakterienkultur und diente vor allem der Überprüfung gewachsener Bakterienkolonien einer vorangegangenen Transformation. Hierzu wurde am Vortag nach erfolgreicher Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 3.2.2) je 3 ml LB_{Amp} -Medium mit einer „positiven“ Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 180 rpm für 14-16 h inkubiert. Die anschließende Zellyse und Plasmid-Präparation wurde gemäß Herstellerangaben unter Verwendung des

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Sambrook und Russell (2001) in Kombination mit einer Aufreinigung durch Silikat-Membran Säulen. Zur Erhöhung der finalen Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte die Elution grundsätzlich mit 50 µl leicht angewärmten DNase-freiem Wasser und nach zweiminütiger Inkubation. Nach Bestimmung der Konzentration (siehe Abschnitt 3.2.1.2) wurde die DNA mittels Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.2.5) und Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.8) auf Richtigkeit geprüft und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit

Die Bestimmung der Konzentration sowie Reinheit gelöster DNA erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop 2000c (Peqlab). Diese Messmethode macht sich die Eigenschaft von Nukleinsäuren zu Nutzen, Licht der Wellenlänge 260nm zu absorbieren. Somit entspricht eine optische Dichte von 1 einer Lösung bei 260nm, einer Konzentration von ca. 50 ng/µl an doppelsträngiger DNA bzw. ca. 40 ng/µl an RNA. Da Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren Licht einer Wellenlänge von 280nm absorbieren, kann das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260nm und 280nm (A_{260}/A_{280}) zusätzlich zur Ermittlung des Reinheitsgrads der Probe herangezogen werden. Der errechnete Wert sollte für eine ausreichend reine DNA-Präparation bei 1,8 - 2,0 liegen. Kleinere Werte deuten auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen und Phenol hin, wohingegen ein Quotient >2 auf eine Verunreinigung mit RNA hinweist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde für die spektralphotometrische Messung 1 µl Probe sowie die entsprechende Menge an DNase-freiem Wasser als Referenz eingesetzt. Die Auswertung erfolgte automatisch durch die entsprechende Software des Spektralphotometers.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, gezielte Nukleotidsequenzen innerhalb kurzer Zeit *in vitro* zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Für die Vervielfältigung eines definierten DNA-Bereichs werden definierte Starter-Oligonukleotide (sogenannte Primer) benötigt, welche zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind und an die entgegengesetzten Enden des zu amplifizierenden Bereichs binden. Durch die Wiederholung eines Reaktionszyklus, der aus der

Denaturierung der DNA, der Hybridisierung der Primer (Annealing) und der Elongation, sprich der am 3'-Primerende fortlaufenden DNA-Synthese durch hitzestabile DNA-Polymerase, besteht ist eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Bereichs möglich. Nach Abschluss des letzten Reaktionszyklus schließt sich eine zehnmütige Synthesephase an, in der die Matrizen in doppelsträngige Produkte überführt werden.

Je nach Anwendungsbereich kamen im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterschiedliche DNA-Polymerasen zum Einsatz. Während die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) aufgrund ihrer "Proof-Reading"-Funktion hauptsächlich bei PCR-Reaktionen mit anschließender Klonierung oder Sequenzierung verwendet wurde, kam die Taq-DNA Polymerase (JumpStart RedTaq ReadyMix, Sigma) hauptsächlich bei PCR-Reaktionen zum Einsatz, die dazu dienten die Anwesenheit einer bestimmten DNA-Sequenz in einem Plasmid zu überprüfen (Kolonie-PCR) und bei denen folglich auf eine geringer Fehlerrate verzichtet werden konnte.

Standard-PCR

Die Standard-PCR diene vor allem der Amplifikation von DNA-Fragmenten für eine anschließende Sequenzierung oder Klonierung. Im letzteren Fall wurden mit Hilfe der Insertionsmutagenese durch Modifizierung der Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende zusätzlich Restriktionsschnittstellen an die zu amplifizierende DNA-Sequenz angefügt. Die aufgereinigten PCR-Produkte konnten somit in Folge mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und für weitere Klonierungsschritte verwendet werden. Als Matrize für die PCR diene die für die Herstellung von p38-Konstrukten synthetisch hergestellte cDNA. Es wurden folgender Ansatz und Programm verwendet:

Ansatz (50 µl):		Programm:		
Matrize	1-2 µl (ca. 100ng)	Initialisierung	98°C 30 s	
5x HF Buffer	10 µl	Denaturierung	98°C 30 s	} 35x
5 mM dNTPs	2 µl	Annealing	x°C 20 s	
10µM 5' Primer	2,5 µl	Elongation	72°C y min	
10µM 3' Primer	2,5 µl	Elongation(final)	72°C 10 min	
DMSO	1,5 µl			
Phusion High-Fidelity		x: abhängig von der Annealingtemperatur der		
DNA Polymerase	0,5 µl	verwendeten Primer; y: je nach Länge des		
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	PCR-Produkts		

Kolonie-PCR

Eine Abwandlung der Standard-PCR stellt die Kolonie-PCR dar. In der hier vorliegenden Arbeit kam sie bei der Klonierung von His₆-p38a und His₆-p38b zum Einsatz und diente der Identifizierung von positiven Bakterienklonen nach Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA. Hierbei wurde je eine Bakterienkolonie mit einer Spitze aufgenommen, in 1 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium überführt und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurden 5 µl Bakterienkultur in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, 3 min im Ultraschallbad sonifiziert und 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluss folgte die PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen:

Ansatz (50 µl):		Programm:	
Bakterienkultur	5 µl	Initialisierung	94°C 2 min
2x RedTaq PCR Mix	10 µl	Denaturierung	94°C 30 s
10µM 5' Primer	0,5 µl	Annealing	60°C 30 s
10µM 3' Primer	0,5 µl	Elongation	72°C 45 s
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl	Elongation (final)	72°C 10 min

} 35x

Nach erfolgreicher Identifikation positiver Bakterienklone wurden für die DNA-Minipräparation am Folgetag je 3 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium zu den entsprechenden positiven Bakterienkulturen gegeben und diese über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1-2%igen Agarosegelen (1 bzw 2% (w/v) Agarose in 0,5x TAE) unter Verwendung des DNA-Farbstoff Midori-Green Advance (NIPPON Genetics). Nach kompletter Aushärtung des Gels wurden 5 µl DNA-Größenstandard und je 10 µl PCR-Ansatz auf das Gel aufgetragen. Während die zu analysierenden Proben mit JumpStart RedTaq ReadyMix direkt geladen werden konnten, mussten die PCR-Ansätze mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase zuvor noch mit 6x DNA Ladepuffer (0,001 M EDTA; 50% Glycerol; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) versetzt werden. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 120 Volt in 0,5x TAE-Puffer. Zur Detektion und Dokumentation von Nukleinsäuren unter UV-Licht diente das Geldokumentationssystem E-Box VX2 (Vilber).

3.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde entsprechend den Herstellerangaben das GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) oder das MSB® Spin PCRapace Kit (Invitex) verwendet.

3.2.5 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Der enzymatische Verdau von DNA kam in dieser Arbeit aus unterschiedlichen Gründen zum Einsatz. Zum einen diente er dazu den pH6HTN His₆Halo Tag T7 Expressionsvektor sowie die amplifizierte PCR-Produkte p38a und p38b auf die anschließende Klonierung vorzubereiten, zum anderen wurde er genutzt um rekombinante Plasmide nach der Transformation auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Je nach Verwendungsgrund wurden folgende Restriktionsansätze verwendet:

Restriktionsansatz – Insert (Klonierung):

PCR-Produkt	43 µl
10x Fast Digest Buffer	5 µl
Restriktionsenzym I	1 µl
Restriktionsenzym II	1 µl
	<hr/>
	50 µl

Restriktionsansatz - Vektor (Klonierung):

Vektor (bis zu 2,5 µg)	X µl
10x Fast Digest Buffer	5 µl
Restriktionsenzym I	1 µl
Restriktionsenzym II	1 µl
Alkalische Phosphatase	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Restriktionsansatz (Plasmid-Überprüfung):

Plasmid-DNA	10 µl
10x Fast Digest Green Buffer	2 µl
Restriktionsenzym I	1 µl
Restriktionsenzym II	1 µl
H ₂ O _{bidest}	6 µl
	<hr/>
	20 µl

Zum Schneiden des PCR-Produkts p38a wurden die Restriktionsenzyme PvuI und ApaI, für p38b die Restriktionsenzyme PvuI und NotI (alle von Thermo Scientific) verwendet. Der Vektor pH6HTN His₆Halo Tag T7 (Promega) wurde mit beiden Restriktionsenzym-Kombinationen verdaut. Desweiteren wurde dem Vektor-Ansatz zusätzlich alkalische Phosphatase (Thermo Scientific) zugegeben, ein Enzym welches Phosphate am 5'-Ende der Schnittstellen entfernt und somit eine Religation der Schnittstellen verhindert.

Der enzymatische Verdau erfolgte für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze zum Inaktivieren der Enzyme für weitere 10 min bei 80°C inkubiert und aufgereinigt (Abschnitt 3.1.4). Restriktionsansätze zur Überprüfung rekombinanter Plasmide wurden direkt nach dem Inaktivierungsschritt auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels elektrophoretische Auftrennung auf Richtigkeit überprüft.

3.2.6 Ligation

Zur Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA (*pH6HTN-His₆Halo-p38a* bzw. *pH6HTN-His₆Halo-p38b*) wurde geschnittenes *p38a* (bzw. *p38b*) in je zwei getrennten Ansätzen mit dem geschnittenen, dephosphorylierten Expressionsvektor pH6HTN His₆Halo Tag T7 gemäß Herstellerangaben (Thermo Scientific) ligiert. Hierfür wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis 3:1 in den Ligationsansatz eingesetzt und zusammen mit T4 DNA Ligase in einer entsprechenden Menge 10x Ligationspuffer für mindestens 10 min bei RT inkubiert.

3.2.7 Hitzeschocktransformation von E.coli

Das Einbringen von *pH6HTN-His₆Halo-p38a* bzw. *pH6HTN-His₆Halo-p38b* in Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock-Transformation. Hierbei wurde mit *One Shot TOP10* (Invitrogen) zunächst ein E. coli Stamm mit hoher Transformationsrate verwendet. Nach erfolgreicher Überprüfung der rekombinanten Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung wurden diese zur späteren heterologen Proteinexpression in *Escherichia coli BL21(DE3)pLysS* (Promega), einen Bakterienstamm mit hoher Expressionsrate, transformiert. In beiden Fällen wurden bei -80°C gelagerte Hitzeschock-kompetente Zellen (50 µl Aliquots) des jeweiligen Stammes vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 0,5 µl Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgten ein Hitzeschock von 1 min bei 42°C und ein erneutes Abkühlen für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 300 µl kaltem LB₀-Medium und weiteren 60 min bei 37°C, wurden die Zellen auf vorgewärmten LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Transformationsansatz ohne Ligationsprodukt bzw. Plasmid-DNA (Negativ-Kontrolle), sowie ein vom Hersteller bereitgestellter Ansatz kompetenter Zellen samt Kontroll-DNA (Positiv-Kontrolle). Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Kolonien wurden am Folgetag in einer Kolonie-

PCR und mittels DNA-Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.8) auf positive Bakterienklone getestet.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurden von den Firmen LGC Genomics und Eurofins MWG Operon GmbH durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und eingeschickt.

3.3 Methoden auf RNA-Ebene

3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Isolierte Gesamt-RNA diente der Bestimmung des wildtypischen Expressionslevels von *p38a* bzw. *p38b* mRNA im Tagesverlauf sowie der Aufdeckung von Transkriptionsunterschieden in *p38* Mutanten. Die RNA-Extraktion erfolgte aus adulten Fliegenköpfen mit Hilfe des Quick-RNA™ MicroPrep Kit (Zymo Research). Hierfür wurden 5 Fliegen auf Eis dekapitiert und die Köpfe in 350 µl kaltem Homogenisierungsbuffer 20 s mit einem Stößel händisch zerdrückt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

3.3.2 Reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription extrahierter mRNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Nach photospektrometrischer Bestimmung der Konzentration wurde die synthetisierte cDNA bis zur Weiterverwendung auf -20°C gelagert.

3.3.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mit ihrer Möglichkeit DNA in einem Schritt zu amplifizieren, zu detektieren und gleichzeitig zu quantifizieren stellt die quantitative real-time PCR (qPCR) ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Genexpressionsanalyse dar. Die nach der reversen Transkription gewonnene cDNA dient hierbei als Ausgangsmatrize und lässt, entsprechend der Menge ursprünglich extrahierter mRNA, später Rückschlüsse auf die

eigentliche Transkriptionsrate des entsprechenden Gens zu. Die Detektion der Menge an PCR Produkten erfolgt mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green (SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit; Biorline). Dieser lagert sich in doppelsträngige DNA ein und reagiert in Folge mit einer Verstärkung der Fluoreszenz. Das nach jedem Reaktionszyklus gemessene Fluoreszenzsignal ist somit proportional zur Menge an vorhandener DNA und erlaubt so eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung. Zur Amplifikation der gewünschten Produkte wurde der Rotor-Gene Q Thermocycler (Qiagen) und die in Tab. X aufgelisteten Primer verwendet. Nachfolgend sind die Zusammensetzung des finalen qPCR Ansatzes sowie die verwendeten Reaktionsbedingungen aufgelistet:

Ansatz (20 µl):

2x SensiFAST SYBR	
No-ROX Mix	10 µl
5' Primer	0,1 -0,5 µM
3' Primer	0,1 -0,5 µM
Matrize	100ng
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Programm:

Initialisierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	5 s	} 40x
Annealing	x°C	10 s	
Elongation	72°C	y min	
Elongation II	72°C	10 min	

x: abhängig von der Annealingtemperatur der verwendeten Primer; y: je nach Länge des PCR-Produkts

Parallel zu den gewünschten Produkten wurde zusätzlich das Haushaltsgen β -Tubulin amplifiziert. Konstitutiv exprimiert, stellte es eine geeignete interne Kontrolle für die tatsächlich eingesetzte gesamte cDNA-Menge dar und ermöglichte zugleich eine relative Quantifizierung der Expressionsdaten. Um auch die biologische Varianz sowie mögliche Pipettierfehler zu berücksichtigen wurden desweiteren pro Probe je 3 biologische und 3 technische Replikate angefertigt. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode nach Pfaffl et al. (2001) unter Verwendung der Rotor-Gene Q Software (Qiagen) und Microsoft Excel.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Expression rekombinanter Proteine in E.coli

3.4.1.1 Kultivierung und Induktion der Proteinexpression

Die Expression der Fusionproteine His₆-p38a und His₆-p38b erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysS unter aeroben Bedingungen bei 37°C wie nachfolgend beschrieben. Als Expressionsvektor wurde der pH6HTN His₆Halo Tag T7 Vektor (Promega) verwendet. Mit einem T7 RNA Polymerase Promotor vor der multiple cloning site erlaubt dieser eine *in vivo* Expression des gewünschten Gens in Bakterienstämmen mit T7 RNA Polymerase. BL21(DE3)pLysS besitzt das Gen für die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle eines *lacUV5* Promotors. Durch die Zugabe von IPTG, eines Aktivators des *lac*-Operons, kann somit die Expression zu einem definierten Zeitpunkt induziert werden. Zur heterologen Proteinexpression wurden in der hier vorliegenden Arbeit zunächst 2 l LB_{Amp} Flüssigmedium mit 200 ml einer Übernachtskultur angeimpft und auf einem Horizontalschüttler bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h bei 37°C und 180 rpm wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 4000 rpm und 4°C in sechs 50 ml-Falconröhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in 20 ml eiskaltem PBS (Sigma) resuspendiert. Nach erneuter 40-minütiger Zentrifugation wurden die Pellets entweder in Lysipuffer gelöst oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.1.2 Herstellung von Bakterienlysats

Zur Herstellung des Bakterienlysats wurden die tiefgefrorenen Pellets auf Eis aufgetaut und in Lysipuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol) mit 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin und cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (2 Tabletten auf 50 ml Puffer) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im Ultraschallbad für 5 x 5 s bei 70 W mit zwischenzeitlichen Ruhepausen auf Eis. Im Anschluss wurde das Lysat mit 1% Triton X-100 versetzt und bei 10000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Die im Pellet enthaltene Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile wurden verworfen und der lösliche Überstand zur Extraktion von His₆-p38a und His₆-p38b auf eine Ni-Chelat-Säule aufgetragen.

3.4.1.3 Proteinaufreinigung mittels Ni-Chelat Affinitätschromatographie

Die Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie stellt ein Trennverfahren für heterolog exprimierte Proteine mit Poly-His-Tag dar und beruht auf der spezifischen reversiblen Bindung von Histidinresten an Ni^{2+} Ionen. Letztere sind über Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Trägermatrix gebunden und können im Austausch gegen Wasser über zwei Bindestellen mit den Histidin-Resten des Fusionsproteins interagieren, dieses an die Trägermatrix binden und aus dem Bakterienlysat herausfiltern. Die Bindung erfolgt hierbei über den Imidazolrings des Histidins. Imidazol allein, bindet ebenfalls an Ni^{2+} and kann folglich, aufgrund seines kompetitiven Effekts, auch zur Elution gebundener Proteine verwendet werden.

Für die Isolation rekombinanter Proteine mit N-terminalem His_6 -Tag kamen in dieser Arbeit HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) und eine 14 ml Protino Säule (Macherey-Nagel) mit Filterporendurchmesser von 50 μm zum Einsatz. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, erfolgte die Aufreinigung von His_6 -p38a und His_6 -p38b stets getrennt auf zwei unterschiedlichen Nickel-Chelat-Säulen. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, nach Protokoll des Herstellers sowie unter nativen Bedingungen bei konstanten 4°C. Um die Bindung von nicht getagten, histidin-haltigen Hintergrundproteinen an die Säulenmatrix zu reduzieren, wurde sowohl der Lysispuffer (siehe 3.4.1.2) als auch der zur Äquilibrierung und zum Waschen dienende Säulenpuffer (50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) mit einer geringen Menge Imidazol versetzt. Die Elution gebundener His-getaggtter Proteine erfolgte hingegen über einen Imidazolgradienten mit je 2ml Elutionspuffer I, II und III (50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 150 mM / 250 mM / 500 mM Imidazol). Desweiteren wurde zur Überprüfung der Effektivität des Trennverfahrens der Säulendurchfluss des Lysats, sowie der Wasch- und Elutionsschritte getrennt aufgefangen und am Ende mittels SDS-PAGE (siehe 3.4.3.1) und Coomassie-Färbung (siehe 3.4.4) auf seinen Reinheitsgrad hin analysiert. Die Eluate mit der höchsten Konzentration an Fusionsprotein His_6 -p38a bzw. His_6 -p38b wurden anschließend vereint und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert, entsalzt und von Imidazol gereinigt (siehe 3.4.1.4). Da laut Hersteller eine bis zu zwanzigfache Wiederverwendung der Nickel-Chelat-Säule möglich ist, wurde diese im Anschluss nach Herstellerangaben gereinigt und bis zum nächsten Gebrauch in 30% Ethanol bei 4°C verwahrt.

3.4.1.4 Pufferaustausch und Konzentrierung gereinigter Proteine mittel Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente der Aufkonzentrierung der rekombinanten Proteine His₆-p38a und His₆-p38b sowie der weitreichenden Entfernung von Salz und Imidazol (< 3 mM) aus der Lösung. Das Prinzip beruht auf der Abtrennung größerer Proteine sowie niedermolekularer Substanzen von Flüssigkeiten über eine semipermeable Filtermembran mit definierter Porengröße unter Anwendung der Zentrifugalkraft. Das Eluat wurde hierfür in Amicon Ultra Centifugal Filterröhrchen (MWCO 30kDa; Merck) überführt und bei 3500 rpm und 4°C so lange zentrifugiert bis die Filtermembran nur noch zu 50% mit Flüssigkeit bedeckt war. Nachfolgend wurde der Filterdurchfluss verworfen, PBS mit 1 mM DTT (immer frisch angesetzt) im Verhältnis 1:1 zum Resteluat im Filter pipettiert und die Lösung ein weiteres Mal abzentrifugiert. Nach 8 weiteren Wiederholungen wurde das verbleibende Konzentrat mittels Pipette aus dem Filter in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde mit einem Spotttest (siehe 3.4.1.5) die Proteinkonzentration bestimmt.

3.4.1.5 Proteinmengenbestimmung mittels Spotttest

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 1 µl des zu bestimmenden Konzentrats mit jeweils 1 µl BSA-Lösungen einer Eichreihe (0,01 – 2 µg/µl) auf Whatman Filterpapier aufgetragen und bei RT getrocknet. Nach 3s Inkubation in Coomassie-Färbelösung (0,14% Coomassie Brilliant Blau R-250; 9% konz. Essigsäure; 45% Ethanol) wurde das Filterpapier solange in Entfärbelösung (7% konz. Essigsäure; 5% Ethanol) entfärbt bis, abgesehen von den Auftragsorten, keine unspezifische Hintergrundfärbung mehr sichtbar war. Coomassie Brilliant Blau ist Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und damit Proteine unspezifisch anfärbt. Je intensiver die Blaufärbung am Auftragungsort desto höher ist die Proteinkonzentration der Probe. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe durch Vergleich mit den Farbintensitäten der BSA-Eichreihe abgeschätzt und das Konzentrat auf -20°C gelagert.

3.4.2 Proteinisolierung aus adulten Fliegenköpfen

Zur Untersuchung des Uhrproteincyclings in *p38* Mutanten sowie der Expression von *p38* im Tagesverlauf, wurden 3-7 Tage alte Fliegen für mindestens 4 Tage an einen LD 12:12 entraint und zu den angegebenen Zeitgeber-Zeitpunkten in flüssigem Stickstoff

abgesammelt. Im Anschluss wurden die tiefgefrorenen Tiere durch Vortexen dekapitiert und 25 Köpfe pro Zeitpunkt auf Trockeneis abgezählt. Nach Überführung in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden die Köpfe in kaltem Proteinextraktionspuffer (50 µl) homogenisiert und für 6 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Extraktionspuffer zur Proteinisolierung wurde stets frisch aus einer Stammlösung (20 mM HEPES; 100 mM KCl; 5% Glycerol; 10 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 20 mM β -Glycerophosphat; 0,1 mM Natriumorthovanadat), 7x cOmplete Proteaseinhibitor, 1 mM Dithiothreitol, 10 µg/ml Pepstatin und 20 µg/ml Aprotinin angesetzt. Um unlösliche Zellbestandteile vollständig zu entfernen, wurde das Pellet verworfen, der Überstand in ein neues vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt ein weiteres Mal wiederholt. Zur Auftrennung des Proteingemisches unter denaturierenden Bedingungen wurde der Überstand mit 5x SDS-Ladepuffer (312 mM Tris; 10% SDS; 50% Glycerol; 20% β -Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau) versetzt, für 3 min bei 95°C aufgeköcht und im Anschluss direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren aus der Proteinanalytik und dient der Trennung von Stoffgemischen nach Molekülmasse in einem elektrischen Feld. In der hier vorliegenden Arbeit wurde sie verwendet um die Phosphorylierung von PER sowie die Expression von p38 im Tagesverlauf zu untersuchen. Hierzu wurde das Proteingemisch im Vorfeld mit einem Ladepuffer samt β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und bei 95°C aufgeköcht. Hitze, β -Mercaptoethanol sowie SDS führen zur vollständigen Denaturierung der Proteine. Durch Anlagerung des anionischen Tensids SDS an die linearisierte Proteinstruktur mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein), wird die Eigenladung des Proteins maskiert und dem Protein-SDS-Komplex eine negative Ladung verliehen. Dies hat zur Folge dass die Auftrennung eines Proteingemisch im elektrischen Feld rein nach Molekülmasse und nicht nach Ladung erfolgt. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese diente ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. So erfolgte die Auftrennung des Uhrproteins PER in einem 4,5% SDS-Polyacrylamid-Sammelgel und einem 6% SDS-Polyacrylamid-Trenngel,

während zur Untersuchung der p38 Expression im Tagesverlauf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Trenngel verwendet wurde (siehe Tab. 7 in Abschnitt 2.8). Als Protein-Größenstandards dienten ein 7-175kD Prestained Protein Marker (New England BioLabs) und ein 14-212 KD Roti-Mark Standard (Carl Roth). Die Gelelektrophorese erfolgte in einer gekühlten Hoefer SE600 Gelelektrophorese-Kammer (Hoefer) mit Elektrophoresepuffer I (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% SDS) über Nacht bei 55 V, 150 mA und 5 W.

3.4.3.2 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Harnstoff-PAGE)

Wie die SDS-PAGE stellt auch die Harnstoff-PAGE ein Trennverfahren unter denaturierenden Bedingungen dar. Hierbei werden Proteine durch Zugabe von großen Mengen chaotropen Harnstoffs denaturiert. Im Gegensatz zu SDS maskiert Harnstoff nicht die Eigenladung der Proteine und ermöglicht so eine elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisch nach Größe und Ladung: je negativer die Ladung, desto länger die Laufstrecke im Gel. Da Phosphorylgruppen bei physiologischem pH negative Ladungen tragen, eignet sich diese Methode besonders zur Trennung verschieden stark phosphorylierter Proteine, da bereits Unterschiede von einer Phosphorylgruppe detektiert werden können. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Harnstoff-PAGE verwendet um die Phosphorylierungsunterschiede rekombinater PER Proteine (GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ und GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴) im Anschluss an *in vitro* Kinasenassays (Abschnitt 3.4.6) zu untersuchen. Die Proben wurden hierfür direkt im Anschluss an den *in vitro* Kinasenassay mit der entsprechenden Menge an 2x Harnstoff-Ladepuffer (0,273g Harnstoff; 45 µl Tris-Glycin-Lösung; 1,5 µl 500 mM EDTA (pH 7.5); 1 µl 500 mM Dithiothreitol; 0,04% Bromphenolblau; ad 500 µl H₂O_{bidest}) versetzt und auf einem 5%igen Harnstoff-Sammelgel und 9%igen Harnstoff-Trenngel (siehe Tab. 7 in Abschnitt 2.8) bei RT und 290 V für 2 ¾ h in einer Mini-Protean Tetra Cell Elektrophoresekammer (Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer kam ein Puffer mit 20 mM Tris und 178 mM Glycin zum Einsatz. Um ein bestmögliches Einlaufen der Proben ins Sammelgel zu gewährleisten, wurde das Gel vor dem Beladen durch Anlegen einer Spannung von 200 V für 30min erwärmt und jede Geltasche gründlich mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Der Nachweis der aufgetrennten Proteine erfolgte durch direktes Anfärben im Gel (Abschnitt 3.4.4) oder mittels Westernblot (Abschnitt 3.4.5).

3.4.4 Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung

Um Proteinbanden im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurde eine Färbelösung mit Coomassie-Brilliant-Blau verwendet, einem anionischen Triphenylmethanfarbstoff der sich an basischen und aromatischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und folglich Proteine unspezifisch anfärbt. Hierfür wurde das Gel zunächst 1-2 h bei RT in Coomassie-Färbelösung (0,14% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% Ethanol, 9% konz. Essigsäure) inkubiert und kurz in Wasser geschwenkt. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde das Gel anschließend über Nacht bei RT auf einen Schüttler in Entfärbelösung (5% Ethanol, 7% konz. Essigsäure) inkubiert und am darauffolgenden Tag nochmals kurz in Wasser gewaschen. Die Dokumentation der Färbeergebnisse erfolgte mit einem handelsüblichen Farbscanner.

3.4.5 Proteinnachweis durch Western-Blot

Neben dem unspezifischen Proteinnachweis mittels Coomassie-Brilliant-Blau stellt der Western-Blot mit anschließender Immunodetektion (Immunoblot) ein Verfahren zum gerichteten, spezifischen Nachweis von Proteine dar. Die Proteine werden hierfür aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran transferiert und im Anschluss mit spezifischen primären und fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern detektiert. Der Proteintransfer erfolgt unter Anlegen einer Spannung entweder in Puffertanks als Wet-Blot oder im halbtrockenen Blotverfahren (Semi-Dry-Blot) über puffergesättigte Filterpapiere. Der große Vorteil letzterer Methode liegt vor allem in der höheren Transfargeschwindigkeit und der geringeren Menge an benötigtem Transferpuffer. Der Wet-Blot hingegen ist schonender aufgrund besserer Kühlmechanismen und ist besonders für größere Proteine geeignet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, kleinere Proteine (< 100 kDa) wie p38 stets im Semi-Dry Verfahren (siehe 3.4.5.2) transferiert, während beim Transfer von PER die Wet-Blot Methode (siehe 3.4.5.1) zum Einsatz kam. In beiden Fällen wurde direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel auf die gewünschte Größe zugeschnitten und zur Entfernung des freien SDS in eine Schale mit Transferpuffer überführt. Der Blotaufbau erfolgte der Methode entsprechend wie in Abschnitt 3.4.5.1 und 3.4.5.2 beschrieben.

3.4.5.1 Proteintransfer mittels Wet-Blot

Zum Wet-Blot Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran wurde ein gekühltes Transfer-Tank-System (TE62) der Firma Hoefer verwendet. Hierfür wurden zunächst vier Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulose-Membran (Protran Nitrocellulose; Schleicher & Schüll) auf Gelgröße zugeschnitten, in Transferpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% Methanol; 0,2% SDS) bzw. $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ getränkt und wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt aufgebaut. Nach Platzierung des Trenngels auf 2 Lagen Whatman-Filterpapier, wurde die Nitrozellulose-Membran in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewässert und vorsichtig auf das Gel aufgelegt. Ein wiederholtes Auflegen und Abziehen der Membran, sowie die Ausbildung von Luftblasen, welche den Proteintransfer erheblich stören, wurde so gut wie möglich vermieden. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden nach weiteren zwei Lagen Whatman-Filterpapier zusätzlich durch leichtes Walzen mit Hilfe einer Glaspipette aus dem fertigen Blot-Sandwich entfernt. Im Anschluss wurde der Aufbau in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt und der Transfer gestartet. Da Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern, wurde beim Einsetzen der Blot-Kassette stets auf die korrekte Ausrichtung des Gels hinsichtlich der Kathode geachtet. Der Proteintransfer erfolgte bei 1000 mA, 100 V, 200 W für 2 h in einer 4°C Klimakammer.

3.4.5.2 Proteintransfer mittels Semi-Dry-Blot

Im Gegensatz zum Wet-Blot fand der Proteintransfer beim Semi-Dry Verfahren ausschließlich über in Transferpuffer getränkte Filterpapiere in einem Semi-Dry Elektroblogger der Firma Peqlab statt. Eine als Anode fungierende platinumhüllte Titanplatte sowie eine Kathoden-Platte aus rostfreiem Edelstahl sorgten für ein gleichmäßiges elektrisches Feld und maximale Transfereffizienz. Der Aufbau des Semi-Dry-Blots erfolgte wie in Abbildung 8 beschrieben in umgekehrter Reihenfolge zum Wet-Blot. Jeweils drei auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Filterpapiere wurden kurz in Transferpuffer (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% Methanol; 0,04% SDS) eingeweicht und mittig auf der Anodenplatte aufeinander angeordnet. Auf in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ getränkte Nitrozellulose-Membran folgten ein Trenngel sowie drei weitere Lagen Transferpuffer gesättigtes Whatman-Filterpapier. Ein möglichst Luftblasen-freies „Blot-Sandwich“ wurde auch hier durch mehrmaliges Walzen des Aufbaus sichergestellt. Zum Schluss wurde die Kathodenplatte mit konstant leichtem Druck aufgesetzt und die Kammer an

eine Stromquelle angeschlossen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte im Falle von p38 für 1 h bei 400 mA, 30V und 250 W.

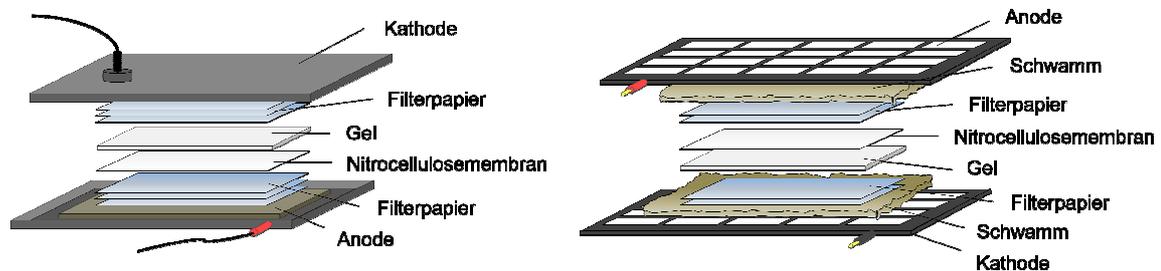


Abbildung 8: Aufbau von Wet-Bot und Semi-Dry-Blot

3.4.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst kurz in TBS (10 mM Tris-HCl pH7,5; 150 mM NaCl) gewaschen um verbliebene Gelreste sowie mögliche Methanolrückstände vollständig zu entfernen. Nach dem Reinigungsschritt wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1-2 h bei RT in Blocklösung (50% Odyssey Blocking Buffer in TBS) geschwenkt und anschließend über Nacht in eine Antikörperlösung mit spezifischem Primärantikörper auf 4°C überführt. Alle im Rahmen eines Westernblots verwendeten spezifischen Primär- und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden stets in TBST mit 25% Odyssey Blocking Buffer und 0,02% Natriumazid gelöst und sind, zusammen mit ihrer Konzentration, der Tabelle 5 zu entnehmen. Am nächsten Tag wurde die Membran zum Entfernen der Antikörperlösung 3 x 10 min bei RT in TBST (TBS mit 0,1% Tween20) gewaschen und dann 2 h auf einem Schüttler mit fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST und einem letzten kurzen Inkubationsschritt in TBS wurde die Fluoreszenzfärbung mit Hilfe des Odyssey Infrarot Scanner (Odyssey Infrared Imaging System; LICOR Bioscience) visualisiert. Um eine statistische Aussage treffen zu können wurde jeder Blot fünfmal wiederholt.

3.4.6 *In vitro* Kinasenassays

Für die Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von PER durch p38a oder p38b wurde ein nicht-radioaktiver *in vitro* Kinasenassay mit anschließender Harnstoff-PAGE gewählt. Rekombinante PER-Peptide, GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ and GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸,

wurden freundlicherweise von Benjamin Mentzel (Dusik et al., 2014) zur Verfügung gestellt, His-getaggtetes p38a und p38b hingegen wurde wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Für nicht-radioaktive Phosphorylierungsassays wurden in zwei getrennten Ansätzen zunächst je 5 μM Substrat (GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ bzw. GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸) in Kinasenpuffer (50 mM Tris-HCl; 5 mM DTT; 30 mM Mg²⁺; 0,1 mM Na₃VO₄) mit 1 mM ATP überführt und einige Minuten bei 30°C inkubiert. Die Initiation der Phosphorylierungsreaktion erfolgt im Anschluss über Zugabe von 1 μM His₆-p38a bzw. His₆-p38b. Zum Nachweis einer möglichen Phosphorylierung von GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ (bzw. GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸), wurden Stichproben aus den Phosphorylierungsansätzen unverzüglich (0 min), sowie 30 min und 60 min nach Zugabe der Kinase entnommen. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an 2x Harnstoff-Ladepuffer (9 M Harnstoff; 20 mM Tris; 190 mM Glycin; 1,5 mM EDTA pH7.5; 1 mM DTT; 0,016% Bromphenolblau) wurde die Phosphorylierungsreaktion gestoppt. Als Kontrolle diente ein paralleler Phosphorylierungsansatz ohne Kinase zu den entsprechenden Zeitpunkten (0 min, 30 min, 60 min). Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden die Proben im Anschluss mittels einer Harnstoff-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung im Gel visualisiert. In einigen Fällen erfolgte der Phosphorylierungsnachweis zusätzlich mittels Immunoblot (Abschnitt 3.4.5). Hierfür wurden am Rand des Gels die 60 min-Ansätze mit und ohne His₆-p38b je zweimal auf das Harnstoffgel aufgetragen. Vor Behandlung mit Coomassie-Färbelösung wurde die zweite Hälfte abgetrennt, die Proteine mittels Wet-Transfer auf Nitrozellulose-Membran übertragen und durch Inkubation mit anti-PER und fluoreszierendem Sekundärantikörper angefärbt. Auf diese Weise war es möglich von den fluoreszenzmarkierten Banden auf der Membran direkt auf die Coomassie-gefärbten Banden im Gel zu schließen.

3.5 Immunhistochemische Methoden

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung

3.5.1.1 Färbung adulter *Drosophila* Gehirne

Anhand immunhistochemischer Färbungen sollte das örtliche und zeitliche Expressionsmuster von Proteinen in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* sowohl unter „entraineten“ als auch unter Freilauf-Bedingungen untersucht werden.

Hierfür wurden 5-10 Tage alte männliche Fliegen für mindestens 4 Tage an einem LD 12:12 synchronisiert und zu den angegebenen ZTs abgesammelt. Für Expressionsstudien unter Freilaufbedingungen wurden die Fliegen zunächst 4 Tage in LD 12:12 gehalten und dann für einige Tage in DD überführt. Während das Absammeln der Tiere im Fall der Lichtpuls-Experimente bereits am ersten Tag DD erfolgte, wurden zur Untersuchung des nukleären PER-Cyclings die Fliegen erst am vierten Tag DD (genauer: alle 4 h exakt 96 h nach Licht-an (ZT1) des letzten Tages im LD) fixiert. Um auch die individuellen Freilaufperioden der Genotypen zu berücksichtigen, wurden die Absammelzeitpunkte im Anschluss in Circadian Time (CT) umgerechnet. Der Aktivitätsbeginn, bei tagaktiven Tieren im Freilauf mit CT0 definiert, diente hierbei als Umrechnungsmaß. So wurden zu den Tieren des Färbeversuchs, Fliegen desselben Genotyps in parallelem Setup aufgezeichnet und deren Aktivitätsbeginn am 4. Tag DD bestimmt. Der errechnete Mittelwert wurde später herangezogen um die eigentlichen Absammelzeitpunkte in CT-Zeitpunkte umzurechnen.

Die Fixierung der Fliegen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einer 4% igen Paraformaldehyd-Lösung (4% PFA in PBS; Affimetrix) mit 0,1% Triton X-100 für 2,5 h bei RT auf einem Rotierer und, falls erforderlich, lichtgeschützt verpackt. Da Detergenzien wie Triton X-100 Zellmembranen zerstören und GFP-Signale unter Umständen abschwächen, wurde für die Fixierung von Fliegen mit GFP-Expression 4% PFA ohne Triton-X verwendet und die Inkubationszeit stattdessen auf 3 h erhöht. Im Anschluss wurden die Fliegen 5 x 10 min in PBS gewaschen, die Gehirne in eiskaltem PBS präpariert und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 3 h bei RT oder über Nacht bei 7°C in Blocklösung (5% NGS bzw. 5% NDS in PBST 0,5%) überführt. Im Anschluss an den Blockschrift folgte die Inkubation mit spezifischem Primärantikörper in PBST 0,5% (PBS mit 0,5% Triton-X100) mit 5% NGS und 0,02% Natriumazid für 24-48 h bei 7°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Gehirne zum Entfernen des Primärantikörpers 5 x 10 min in PBST 0,5% gewaschen und anschließend für 3 h bei RT mit Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper in PBST 0,5% mit 5% NGS und 0,02% Natriumazid inkubiert. Eine Auflistung der hier verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren eingesetzte Konzentration ist der Tabelle 5 (Abschnitt 2.6) zu entnehmen. Nach weiteren 4 x 10 min in PBST 0,5% und einen finalem Waschschrift mit PBST 0,1% (PBS mit 0,1% Triton-X100) wurden die Gehirne auf Superfrost Objektträgern in VectaShield Einbettmedium (Vector Laboratories) eingebettet und bei 7°C lichtgeschützt verwahrt.

3.5.1.2 Färbung adulter *Drosophila* Retinas

Die Fixierung und Färbung von Retinas adulter Fliegen erfolgte in der Regel nach Standardfärbeprotokoll für Gehirne. Lediglich bei Versuchsansätzen mit rot- oder orangeäugigen Fliegen wurden die Retinas im Anschluss an die Inkubation mit Sekundärantikörper anstelle von 4 x 10 min für 2-4 Tage in PBST 0,5% inkubiert. Der verlängerte Waschschrift bei 7°C diente zum Auswaschen der roten Augenpigmentierung. Desweiteren wurde zum Anfärben der Rhabdomere anstelle fluoreszenz-markiertes Phalloidin (Alexa Fluor 635 Phalloidin; Invitrogen) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein toxisches Alkaloid des Knollenblätterpilzes welches an F-Aktin bindet und dessen Depolymerisation verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Alexa Fluor 635 Phalloidin stets zusammen mit den Sekundärantikörpern eingesetzt.

3.5.2 Visualisierung und Auswertung der Färbeergebnisse

Aufnahmen von fluoreszenz-markierten Retinas und Gehirnen wurde an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica TCS SPE) der Firma Leica erstellt. Hierfür wurden die Präparate mit einem Abstand von 2 µm schichtweise gescannt und nach Rekonstruktion der Einzelbilder als 3D-Aufnahmen (z-Stacks) abgespeichert. Die graphischen Bearbeitung und Auswertung der Färbeergebnisse erfolgte im Anschluss mit der Grafiksoftware Image J über zwei unterschiedliche Messverfahren: Zum Bestimmen der zellulären Färbeintensität phospho-p38-positiver DN_{1a} wurde die Methode nach Yoshii et al. (2008) angewendet. Hierfür wurde zunächst eine Messfläche (Area) definierter Größe (5 Pixel) festgelegt, dann die Zellebene mit der stärksten Fluorezenz gewählt und schließlich im hellsten Zellbereich die durchschnittliche Färbeintensität gemessen. Um auch eine unspezifische Hintergrundfärbung mit einzubeziehen, wurden die Messwerte anschließend innerhalb einer Uhrneuronengruppe gemittelt und mit einem Hintergrund-Mittelwert verrechnet. Dieser ergab sich aus drei unabhängigen Messungen der Färbeintensität in direkter Umgebung der untersuchten Zellgruppe. Für die Untersuchung der nukleären Translokation von PER in Fliegen mit modifiziertem p38 Level in PDF-positiven Uhrneuronen kam dagegen das Messverfahren nach A. Burgess (<http://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-using-imagej/>) zum Einsatz. Im Gegensatz zu Yoshi et al. (2008) wird hier das Messareal nicht von vornherein fest definiert, sondern bei jeder Messung manuell mit dem „Freehand

selection“ Tool neu festgelegt. So wurde für jede ausgewählte Zelle sowohl das Signal des gesamten Zellkörpers als auch des Nukleus gemessen. Zur Orientierung diente die PDF-Färbung welche rein zytoplasmatisch ist und im Tagesverlauf nicht schwankt. Neben der durchschnittlichen Färbeintensität wurden für jede Messung desweiteren die Parameter „Area“ (Größe des Messareals) und „Integrated Density“ (Gesamtintensität des Fluoreszenzsignals innerhalb des markierten Bereichs) bestimmt. Unter Anwendung der Formel $CTCF_{\text{Nukleus (Zelle)}} = \text{Integrated density}_{\text{Nukleus (Zelle)}} - (\text{Area}_{\text{Nukleus (Zelle)}} \times \text{Mean fluorescence}_{\text{Background}})$ konnte so für jede Zelle bzw. jeden Nukleus die „Corrected total cell fluorescence“ (CTCF) – sprich das eigentliche Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von Zell- bzw. Nukleusgröße und Hintergrund – bestimmt werden. Die nukleäre Färbeintensität ($CTCF_{\text{Nukleus}}$) normalisiert zum Gesamtsignal der Zelle ($CTCF_{\text{Zell}}$) ließ schließlich Rückschlüsse auf nukleäre Translokation von PER in den LN_vs zu. Unabhängig von der gewählten Messmethode erfolgte die Auswertung an je 10 Gehirnen pro Zeitpunkt und Genotyp.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Systat (Systat Software, Leland Wilkinson, USA). Alle erhobenen Datensätze wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test (Lilliefors) auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden im Anschluss mit einer one-way ANOVA und einem Post-hoc Test mit Bonferroni Korrektur statistisch verglichen. Bei nicht normalverteilten Daten kam der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Wilcoxon Test samt Bonferroni Korrektur zum Einsatz. Daten mit p-Wert kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurden als signifikant unterschiedlich, Daten mit p-Wert kleiner 0,001 ($p < 0,001$) wurden als hochsignifikant unterschiedlich betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisation und Expression von p38 MAPK in Gehirn und Retina von *Drosophila melanogaster*

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen verfügen über ein breites Spektrum regulatorischer Funktionen und werden aufgrund dessen in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen exprimiert. Während MAPK-Expressionsstudien der vergangenen Jahre den Focus vorwiegend auf Expressionsorte hinsichtlich ihrer Funktion bei Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose sowie Immun- und Stressantwort legten, ist über eine mögliche Expression von MAP-Kinasen im circadianen System nur wenig bekannt. Um einen Nachweise für p38 in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster* zu erbringen, wurde im Folgenden das örtliche und zeitliche Expressionsmuster der p38 MAP-Kinase im Gehirn sowie im Komplexauge der Fruchtfliege mittels Reporterlinien und Antikörperfärbung untersucht.

4.1.1 Untersuchung der p38 Expression mittels Reporterlinien

Mit dem Ziel p38 MAPK in der inneren Uhr zu lokalisieren wurden zunächst Antikörperfärbungen mit der Reporterlinie *w;p38b-lacZ* Linie durchgeführt. Diese exprimiert β -Galaktosidase (*lacZ*) ektopisch unter der Kontrolle des *p38b*-Promotors und zeigt neben Darm und Fettkörper insbesondere eine verstärkte Expression des Reportergens im larvalen Gehirn, den Ganglien und der Speicheldrüse (Park et al., 2003). *p38b* mRNA Expressiondaten der *Drosophila* Genexpression Datenbank FlyAtlas (<http://flyatlas.org>) bestätigen dieses Expressionsmuster und weisen auf eine breite Expression von *p38b*, mitunter in Gehirn und Komplexauge der Fliege hin (Tab. A2 im Anhang). Immunhistochemische Färbungen mit anti-TIM und anti-lacZ an Gehirnen der Reporterlinie *w; p38b-lacZ* konnten dies jedoch nicht bestätigen. So zeigt *w; p38b-lacZ* im Vergleich zu *w¹¹⁸* keine Unterschiede im Färbemuster (Abb. 9A2 und B2) sowie keine Co-Lokalisation der Antikörper anti-TIM und anti-lacZ in den Uhrneuronclustern LN_v, LN_d, DN₁, DN₂, und DN₃ (Abb. 9A1 und B1).

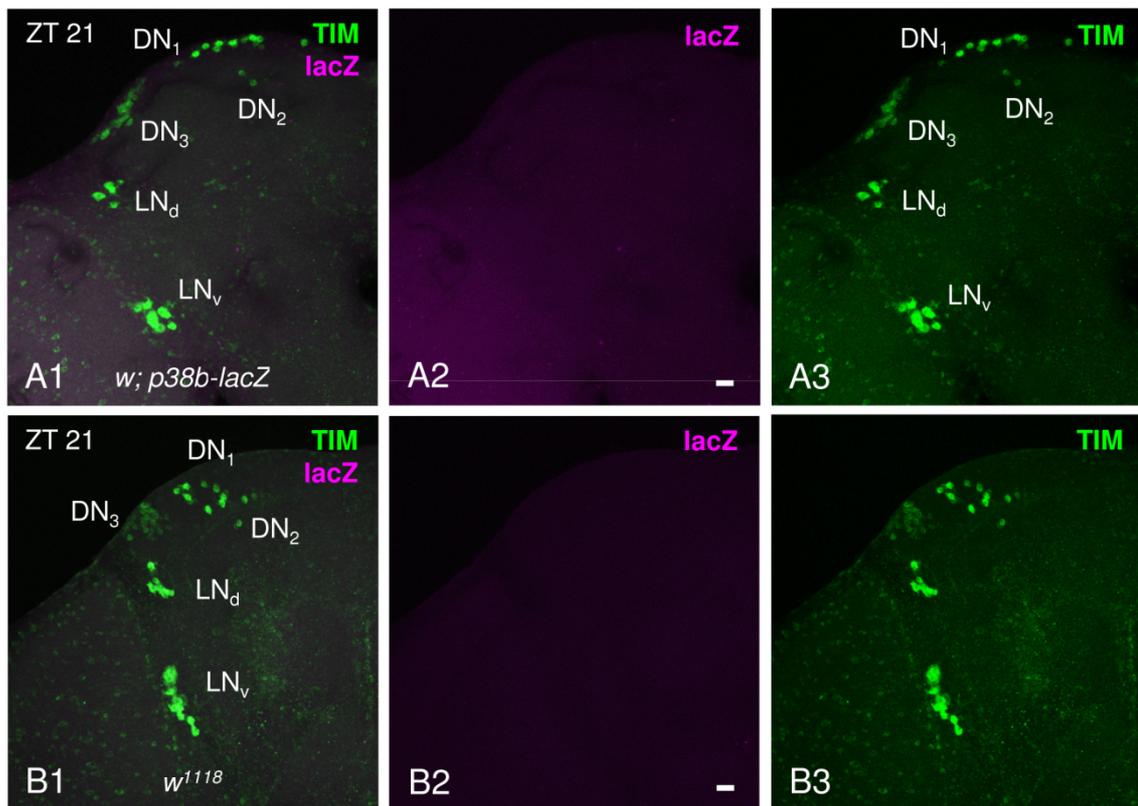


Abbildung 9: Antikörperfärbung von ektopisch exprimierten lacZ in Gehirnen von *w; p38b-lacZ* und *w¹¹¹⁸*.

Zweifach-Antikörperfärbungen an Gehirnen von *w; p38b-lacZ* mit anti-TIM (grün) und anti-lacZ (magenta) geben keinen Hinweis auf *p38b*-getriebene lacZ-Expression im circadianen System der Fliege. Zwar zeigt die Reporterlinie (A) im Vergleich zur Kontrolle (B) ein leicht erhöhtes, wenn auch nicht signifikant unterschiedliches, lacZ-Hintergrundsignal (A2 und B2), doch findet keine Kolokalisation von anti-TIM und anti-lacZ in den Uhrneuronen statt (A1). LNv: ventrolaterale Neurone; LNd: dorsolaterale Neurone; DN₁: dorsale Neurone 1; DN₂: dorsale Neurone 2; DN₃:dorsale Neurone 3; Maßstab: 10 µm;

Letzteres könnte auf eine fehlende Expression von p38b im Uhrnetzwerk hindeuten, lässt sich aber auch wie folgt erklären. Möglicherweise wurde mit ZT21 ein Färbezeitpunkt gewählt, zu dem zwar einerseits eine maximale Menge an TIM Protein in der Zelle vorhanden ist, zu dem aber andererseits lacZ nur gering exprimiert wird. Darüber hinaus könnte das leicht erhöhte lacZ-Hintergrundsignal in *w; p38b-lacZ* eine schwache p38b-gesteuerte lacZ-Expression maskieren. Auch muss in Betracht gezogen werden, dass die ektopische Expressionen eines Reportergens nicht immer die reelle Expression des Gens widerspiegelt. Um all diese Möglichkeiten auszuschließen wurden unter Verwendung des UAS/Gal4-Systems *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* Fliegen hergestellt und Hirnfärbungen durchgeführt. Das UAS/Gal4-System nach Brand und Perrimon (1993) erlaubt durch Kreuzung einer UAS-Effektorlinie (*UAS-nuclacZ³⁶⁰*) mit

einer Gal4-Treiberlinie (*p38b-Gal4*) die gezielte Expression eines gewünschten Konstrukts, in diesem Fall von nukleärem lacZ in p38b-exprimierenden Zellen. Im Unterschied zu *w; p38b-lacZ* kann es in *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* Fliegen aufgrund des, in *Drosophila* auf natürliche Weise nicht vorkommenden Aktivators Gal4 und dessen Bindung an die als Enhancer wirkende „upstream activating sequence“ (UAS), jedoch zu einer Verstärkung der Expression von nukleären lacZ (*nuclacZ³⁶⁰*) kommen. In der Tat zeigen *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* Fliegen im Gegensatz zu *w; p38b-lacZ* (Abb. 9A und Abb. 10A) sowie zu ihrer UAS-Kontrolle (Abb. 10A und 10F2) eine breite Expression von *p38b*-getriebenen nukleärem lacZ im Zentralhirn, optischen Lobus, sub-ösophalen Ganglion sowie im Bereich des Pilzkörpers. Eine Kolokalisation von anti-TIM und anti-lacZ in den DN₁, DN₂ und DN₃ (Abb. 10B1-B3) sowie den LN_d (Abb. 10C) ist jedoch trotz der großen Menge an lacZ-positiven Neuronen im Protocerebrum leider nicht erkennbar. Ein gegenteiliges Bild ergibt sich bei Betrachtung von 2 µm dicke Einzelschnittaufnahmen der LN_v. Während die s-LN_v ähnlich der dorsalen Uhrneurone kein nukleäres lacZ exprimieren, scheint eine Expression in den I-LN_v nicht völlig ausgeschlossen (Abb. 10D-E). Eine Kolokalisation beider Antikörper ist jedoch aufgrund der möglicherweise unterschiedlichen zellulären Verteilung der Proteine (Zytoplasma vs. Nukleus) nicht eindeutig nachweisbar (Abb. 10E1-E2).

Endgültige Klarheit sollten Antikörperfärbungen an Gehirnen von *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* Fliegen bringen. Diese exprimieren zytoplasmatisches GFP ektopisch unter Kontrolle einer *p38b*-Treiberlinie und zeigen in Übereinstimmung mit *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* eine breite Expression des Reportergens im optischen Lobus und Zentralhirn, ebenso wie dem Pars intercerebralis, dem sub-ösophalen Ganglion und dem Pilzkörper (Abb. 11A). Trotz der Vielzahl GFP-positiver Neurone offenbaren *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* Fliegen dennoch weder in den Uhrneurongruppen LN_d und s-LN_v (Abb. 11B) noch in den DN₁, DN₂ und DN₃ (Abb. 11D) eine *p38b*-getriebene GFP-Expression. In den I-LN_v (Abb. 11C) hingegen, ist eine deutliche Kolokalisation von anti-GFP, anti-PER und anti-PDF (einem spezifischen Marker der ventrolateralen Uhrneuronengruppen) zu erkennen. Diese Dreifachfärbung der I-LN_v bestätigt den anfänglichen Verdacht des *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* Experiments und liefert zugleich einen wichtigen Hinweis auf eine Expression von p38 in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*.

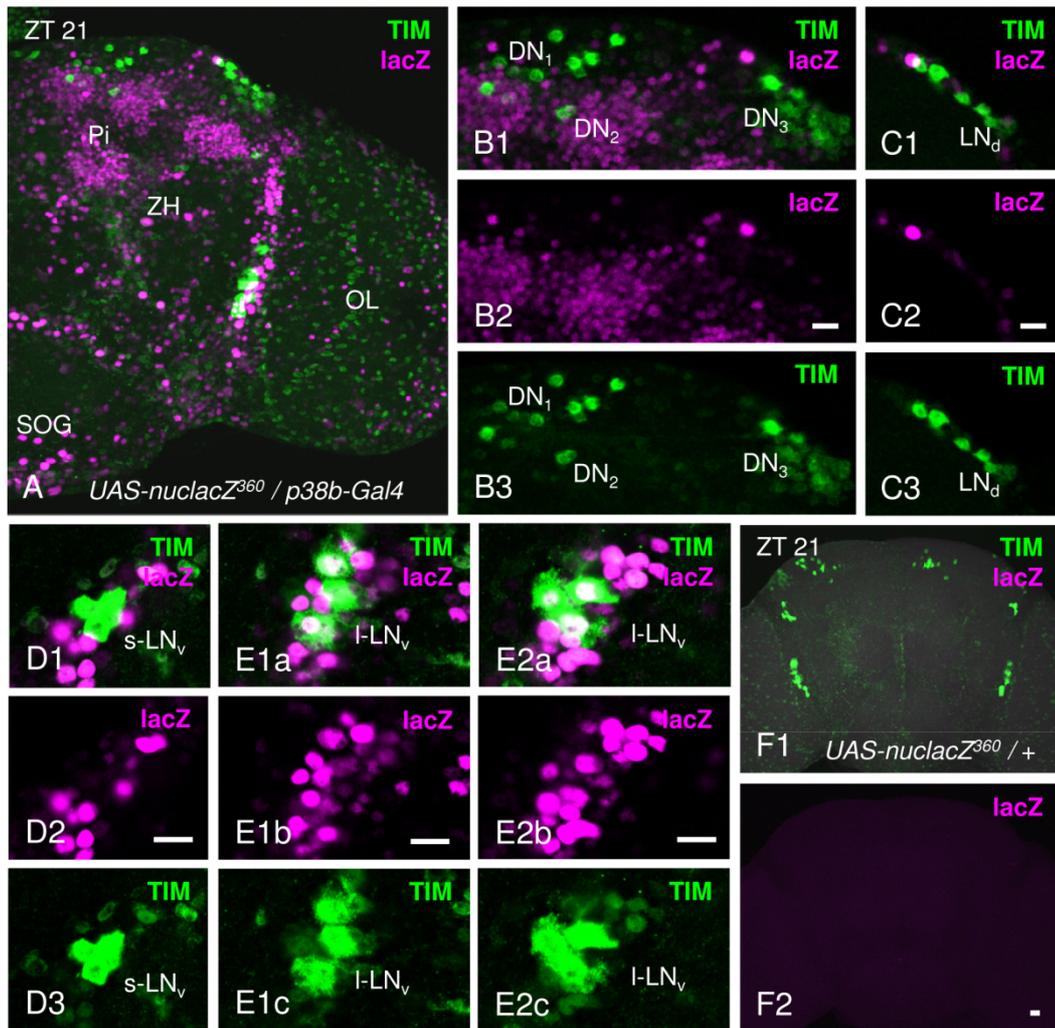


Abbildung 10: lacZ-Expression und Antikörperfärbung in Gehirnen von *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* und *UAS-nuclacZ³⁶⁰*.

Zweifachmarkierungen mit anti-lacZ (magenta) und anti-TIM (grün) in *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* (A-E) offenbaren eine breite Expression von *p38b*-getriebenem nukleärem lacZ in Zentralhirn (ZH), optischem Lobus (OL), sub-ösophalen Ganglion (SOG) und im Pilzkörper (Pi) (A). Während eine Kolokalisation von anti-TIM und anti-lacZ in den Uhrneuronclustern DN₁, DN₂ und DN₃ (B1-B3), sowie den LN_d (C) und s-LN_v (D) nicht erkennbar ist, zeigen 2 µm dicke Einzelschnittaufnahmen der I-LN_v (E1 und E2) ein gegenteiliges Bild. Zwar macht die hohe Dichte lacZ-positiver Zellen am Übergang vom Zentralhirn zum optischen Lobus die Identifizierung lacZ-positiver Uhrneurone schwierig, dennoch scheint eine lacZ-Expression in den I-LN_v (E1a und E2a) nicht ausgeschlossen. I-LN_v: große ventrolaterale Neurone; s-LN_v: kleine ventrolaterale Neurone; LN_d: dorsolaterale Neurone; DN₁: dorsale Neurone 1; DN₂: dorsale Neurone 2; DN₃: dorsale Neurone 3; Maßstab: 10 µm;

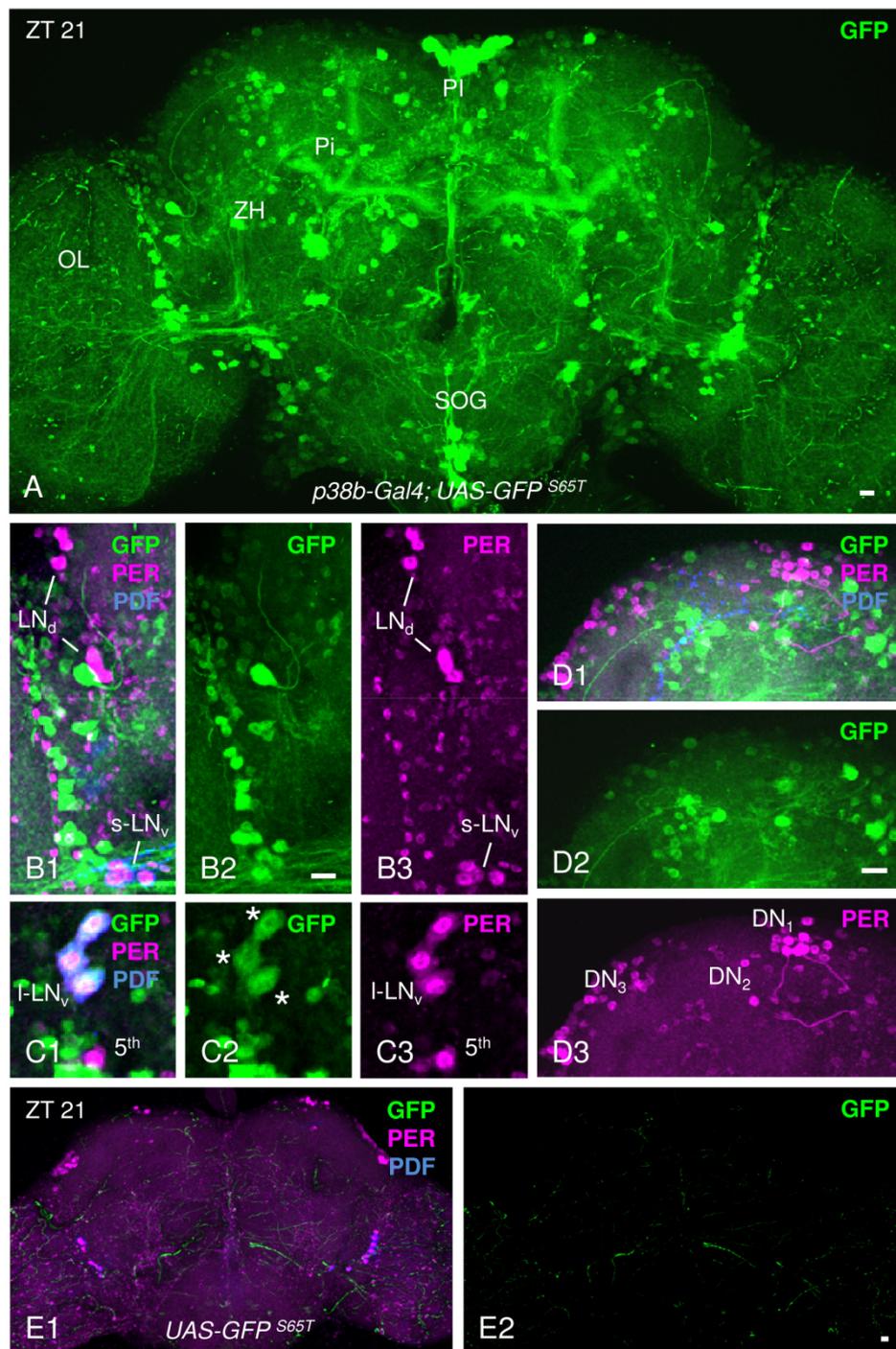


Abbildung 11: GFP-Expression und Antikörperfärbung in Gehirnen von *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* und *UAS-GFP^{S65T}*.

Ähnlich *UAS-nuclacZ³⁶⁰/p38b-Gal4* (Abb.10) zeigen *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* Fliegen (A) im Gegensatz zur UAS-Kontrolle (E) ein breites Expressionsmuster des Reportergens im optischen Lobus (OL), Zentralhirn (ZH), Pars intercerebralis (PI), sub-ösophalen Ganglion (SOG) sowie im Pilzkörper (PI). Zwar lassen Nahaufnahmen der s-LN_v und LN_d (beides B), sowie der DN₁, DN₂ und DN₃ (D) keine Expression von GFP erkennen, I-LN_v jedoch zeigen eine deutliche Kollokalisation von anti-GFP (grün), anti-PER (magenta) und anti-PDF (blau). I-LN_v: große ventrolaterale Neurone; s-LN_v: kleine ventrolaterale Neurone; LN_d: dorsolaterale Neurone; DN₁: dorsale Neurone 1; DN₂: dorsale Neurone 2; DN₃:dorsale Neurone 3; Maßstab: 10 µm; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Neben einer biologischen „Haupt-Uhr“ existieren in jedem Organismus periphere Oszillatoren. Ähnlich dem Hauptschrittmacherzentrum, weisen auch diese eine zyklischen Expression der Uhrproteine sowie einen eigenständigen Rhythmus auf, agieren jedoch nicht komplett autonom (zusammengefasst von Giebultowicz, 2001; Plautz et al, 1997). Bei *Drosophila* wurden periphere Uhren unter anderem in den Malpighischen Gefäßen (Giebultowicz et al., 1997), den Antennen (Krishnan et al., 1999), dem Fettkörper (Xu et al., 2008) sowie den Komplexaugen (Zerr et al., 1990; Cheng und Hardin, 1998) nachgewiesen. Ob p38 MAPK neben dem Hauptschrittmacherzentrum im Gehirn auch in den peripheren Uhren der Fliege, wie dem Komplexauge, exprimiert wird, sollten Antikörperfärbungen an adulten Retinas der UAS/Gal4-Linie *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* klären. Erste Anhaltspunkte liefern Kikuchi et al. (2000) und Jarvis et al. (1997), deren Studien p38 im Auge von Säugern sowie in der Retina von Fliegen des Puppenstadiums nachweisen konnten, diese Expression allerdings in Verbindung mit dem programmierten Zelltod setzten. Um die retinale Expression von p38 aus chronobiologischen Standpunkt zu betrachten, wurde unter Verwendung von anti-PER und Phalloidin, einem Rhabdomer-Marker, der Focus insbesondere auf die Photorezeptorzellen R1 bis R8 gelegt. In Übereinstimmung mit Jarvis et al. (1997) zeigen Längsschnitt- und Querschnittaufnahmen von adulten Retinas der Effektorlinie *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* eine p38b-induzierte Expression von GFP in den sekundären und tertiären Pigmentzellen (Abb. 12A2 und 12C2), sowie im Bereich der interommatidialen Borsten (hier nicht abgebildet). Eine Kolokalisation von anti-GFP mit anti-PER und Phalloidin in den Photorezeptorzellen Zellen R1 bis R8 ist nicht erkennbar. Da es nach aktuellem Stand der Forschung noch keine Erkenntnisse zu einer Rolle der Pigmentzellen im peripheren Oszillator gibt, lässt dies eine mögliche Uhr-spezifische Funktion von p38 im Komplexauge der Fliege weiter offen.

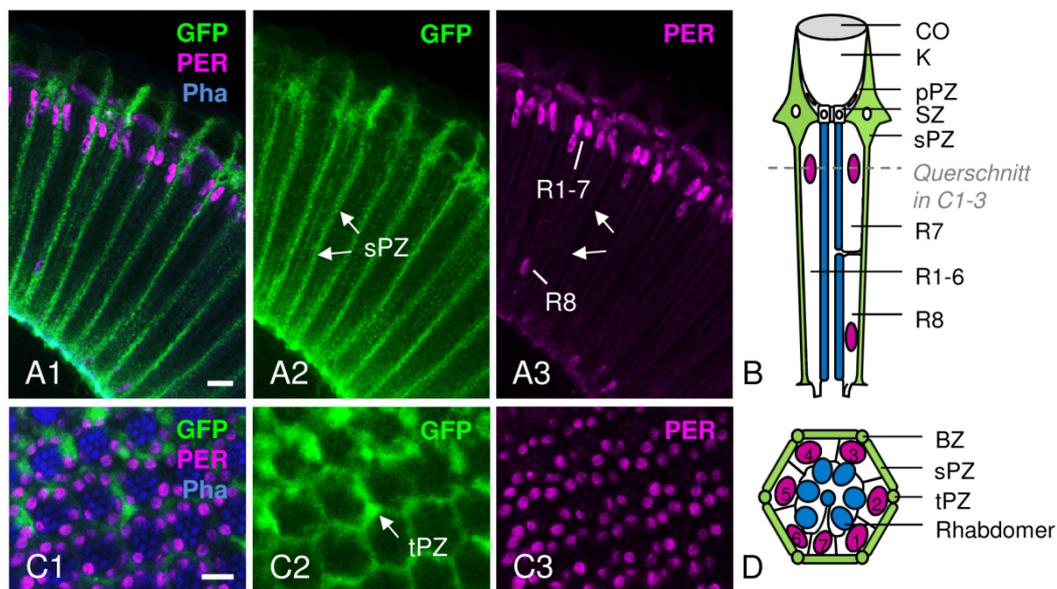


Abbildung 12: GFP-Expression und Antikörperfärbung in Retinas von *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}*.

Längsschnitt- (A) und Querschnittsaufnahmen (C) adulter Retinas der Effektorlinie *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* offenbaren eine deutliche Expression von GFP in den sekundären (A2) und tertiären Pigmentzellen (C2), sowie der interommatidialen Borste (hier nicht abgebildet). Rezeptorzelle R1 – R8 zeigen keine Co-Lokalisation von anti-GFP (grün) mit anti-PER (magenta) und fluoreszenz-markiertem Phalloidin (blau). In Übereinstimmung mit Abbildung 11 trat auch in Kontroll-Retinas *UAS-GFP^{S65T}* keinerlei GFP-Färbung auf, weshalb auf eine bildliche Darstellung an dieser Stelle verzichtet wurde. B und D repräsentieren den schematischen Längs- und Querschnitt eines Ommatidiums. CO: Cornea; K: Kristallkegel; pPZ: primäre Pigmentzelle; SZ: Semperzelle; sPZ: sekundäre Pigmentzelle; R: Rezeptorzelle; BZ: Borstenzelle; tPZ: tertiäre Pigmentzelle; Maßstab: 10 μ m

4.1.2 p38-Antikörperfärbung an wildtypischen Fliegen

Mit einer p38b-induzierten Expression von GFP sowie nukleärem lacZ in den I-LN_v lieferten UAS/Gal4-Reporterlinien erste Hinweise auf eine Expression von p38 MAPK in der inneren Uhr von *Drosophila melanogaster*. Wie jedoch bereits erwähnt spiegelt die ektopische Expression eines Reportergens nicht zwingend die reelle Expression des zu untersuchenden Gens wider. Aus diesem Grund wurden, um die Ergebnisse der UAS/Gal4-Linien zu bestätigen, immunhistochemische Färbungen an Gehirnen und Retinas des Wildtyps *Canton S (CS)* mit 3 unterschiedlichen p38 Antikörpern (Tab. 5) durchgeführt: anti-p38 (Santa Cruz Biotechnology), anti-p38b (Adachi-Yamada et al., 1999) and anti-p-p38 (Cell Signaling Technology). Während anti-p38 und anti-p38b speziell gegen *Drosophila* p38 gerichtet sind und neben nicht-phosphoryliertem auch phosphoryliertes p38a und p38b detektieren (<http://www.scbt.com/datasheet-15714-p38-dn-20-antibody.html>; persönl. Korrespondenz mit T. Adachi-Yamada), handelt es

sich bei anti-p-p38 um einen synthetisch hergestellten humanen p38 Antikörper. Dieser zeigt keine Kreuzreaktion mit p42/44 MAPK und SAPK/JNK, zwei weiteren Vertretern der MAPK-Familie, erkennt die Phosphorylierungsstellen Thr180 und Tyr182 und bindet ausschließlich an zweifach phosphorylierte p38-Isoformen (Kumar et al., 1999; Miyaji et al., 2009). Infolge der hohen Sequenzhomologie der p38-Phosphorylierungsstellen erkennt und detektiert anti-p-p38 darüber hinaus phosphorylierte p38 Isoformen in der Taufliede (Seisenbacher et al., 2011). Um unspezifische Färbesignale von reeller Färbungen zu unterscheiden dienten bei allen Färbeexperimenten $p38b^{\Delta 25}$; $p38a^{\Delta 1}$ Fliegen als interne Kontrolle. Die eigentliche Doppelknockoutmutante $p38b^{\Delta 45}$; $p38a^{\Delta 1}$ ist, aufgrund der entscheidenden Rolle der p38 MAPK während der Entwicklung der Fliege, nicht lebensfähig. Infolgedessen wurde mit $p38b^{\Delta 25}$; $p38a^{\Delta 1}$ ein Stamm gewählt, der im p38a Knockout-Hintergrund noch eine hypomorphe Expression von p38b zeigt (siehe Abb. 30 in Abschnitt 4.3.5).

Zu Beginn wurden Mehrfachfärbungen mit anti-p38, anti-PER und anti-PDF zu ZT21 in *CS* und $p38b^{\Delta 25}$; $p38a^{\Delta 1}$ durchgeführt. Gegensätzlich zu den UAS/GAL4-Reporterlinien zeigt *CS* ähnlich *w*; *p38b-lacZ* anstelle von einzelnen gefärbten Zellkörpern ein gleichmäßig über das gesamte Gehirn verteiltes p38-Färbemuster (Abb. 13). Visuell betrachtet scheint das p38-Signal des Wildtyps im Vergleich zur hypomorphen Kontrolle tendenziell zwar leicht erhöht zu sein (Abb. 13A und D), eine deutliche Expression von p38 in den Uhrneurongruppen ist jedoch nicht zu erkennen (Abb. 13 A-C). Dies könnte allerdings dem Fehlen einer vollständigen Doppelknockoutmutante geschuldet sein. So stechen schwache Färbeunterschiede zwischen Wildtyp und Kontrollstamm aufgrund der „Restexpression“ in $p38b^{\Delta 25}$; $p38a^{\Delta 1}$ möglicherweise nicht deutlich ins Auge. Lediglich bei 2 von insgesamt 12 Wildtyp-Gehirnen trat eine p-p38-positive s-LN_v auf (siehe Stern in Abb. 13C). Ob es sich hierbei um eine unspezifische Färbung oder möglicherweise doch um ein reelles Signal handelt, ist aufgrund der seltenen Auftretshäufigkeit nur schwer zu beurteilen, zumal auch in einem Gehirn der hypomorphen Knockoutmutante zwei LN_d p38-Färbung aufwiesen (siehe Stern in Abb. 13F2). Fakt bleibt, anti-p38-Färbungen können Färbeergebnisse von $p38b-Gal4$; UAS-GFP^{S65T} und UAS-nuclac^{Z360}/ $p38b-Gal4$ nicht eindeutig bestätigen. Allerdings deuten sie dennoch auf eine breite Expression von p38 im Zentralhirn und möglicherweise auch in den s-LN_v hin.

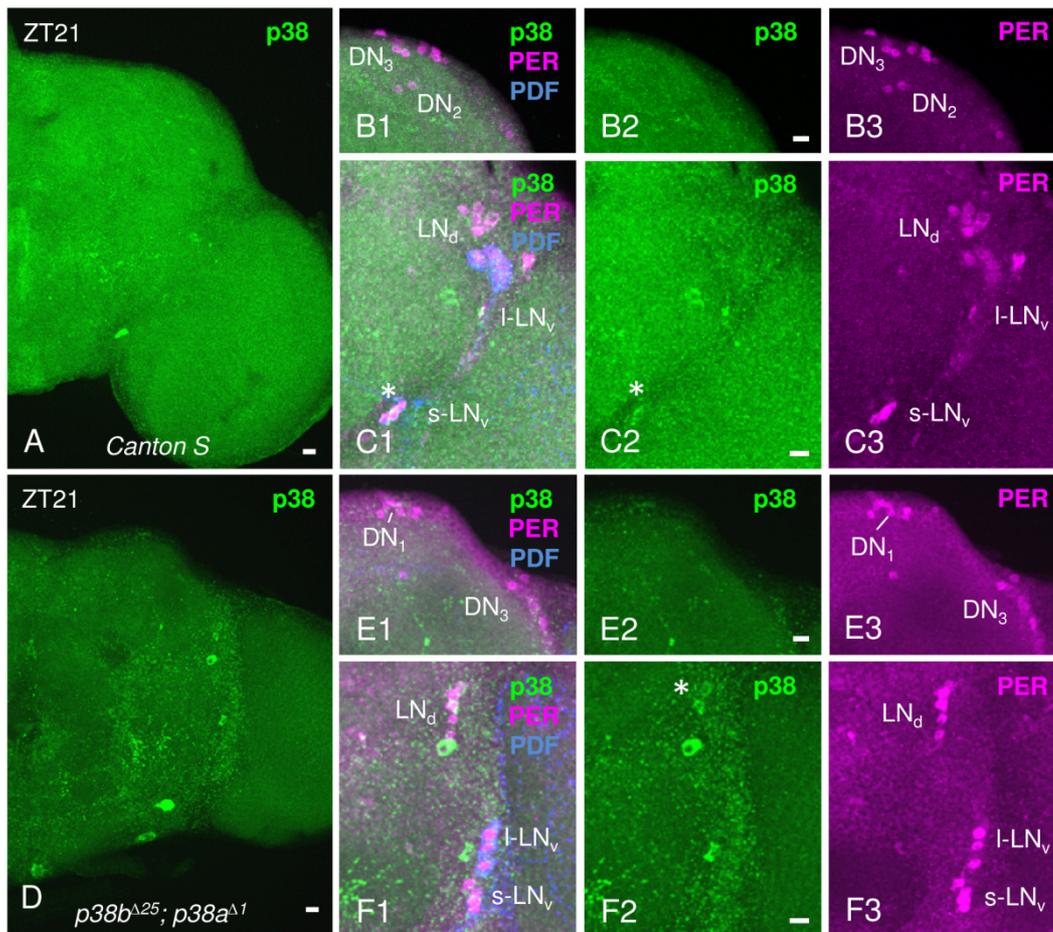


Abbildung 13: Antikörperfärbungen mit anti-p38 in *Canton S* und $p38b^{\Delta25}; p38a^{\Delta1}$.

Mehrfachfärbungen mit anti-p38 (grün), anti-PER (magenta) und anti-PDF (blau) in Wildtyp (A-C) und $p38b^{\Delta25}; p38a^{\Delta1}$ (D-F) lassen keine Expression von p38 im Uhrnetzwerk erkennen. Zwar treten im Wildtyp, zusätzlich zu einem insgesamt stärkeren p38-Färbesignal (vgl. A mit D), in seltenen Fällen auch p38-positive s-LN_v auf (Stern in C2), eine Bewertung dieser Färbung als reelles, positives Signal ist jedoch aufgrund der geringen Auftretshäufigkeit kaum möglich. So zeigen in einem Fall auch zwei p38-positive LN_d im hypomorphen Kontrollstamm ein positives Färbesignal. I-LN_v: große ventrolaterale Neurone; s-LN_v: kleine ventrolaterale Neurone; LN_d: dorsolaterale Neurone; DN₁: dorsale Neurone 1; DN₃: dorsale Neurone 3; Maßstab: 10 µm; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Um diesen Verdacht zu bestätigen wurde in einem zweiten Färbeexperiment die Expression von p38 in *CS* Wildtypfliegen unter Verwendung des zweiten p38-Antikörpers, anti-p38b, untersucht. Da anti-p38b und anti-PER aus demselben Wirtsorganismus stammen, wurde diesmal neben anti-PDF zusätzlich anti-VRI als „Uhrmarker“ gewählt. Ebenso wurde, aufgrund des früheren VRILLE-Maximums im Proteincycling (Dusik et al., unpublizierte Daten), der Färbezeitpunkt von ZT21 auf ZT19 verschoben. Im Gegensatz zur vorhergehenden p38-Färbung zeigen wildtypische Gehirne mit anti-p38b gegenüber *p38b^{Δ25}*; *p38a^{Δ1}* (Abb. A2) eine ausgeprägte Expression von p38 im Hirnareal zwischen Zentralhirn und optischem Lobus (Abb. 14A und 14B) sowie im dorsalen Protocerebrum (Abb. 14C und 14D). Vergrößerte Einzelschnittaufnahmen dieser Bereiche lassen darüber hinaus ein ausgeprägtes zytoplasmatisches Signal von anti-p38b in den s-LN_v (Abb. 14G) sowie den l-LN_v (Abb. 14F) erkennen und bestätigten damit den Anfangsverdacht aus den Versuchen mit den UAS/Gal4-Linien sowie der p38-Färbung. p38b-positive Neurone in den DN₁, DN₂, DN₃ (Abb. 14D) oder LN_d (Abb. 14E) traten nicht auf.

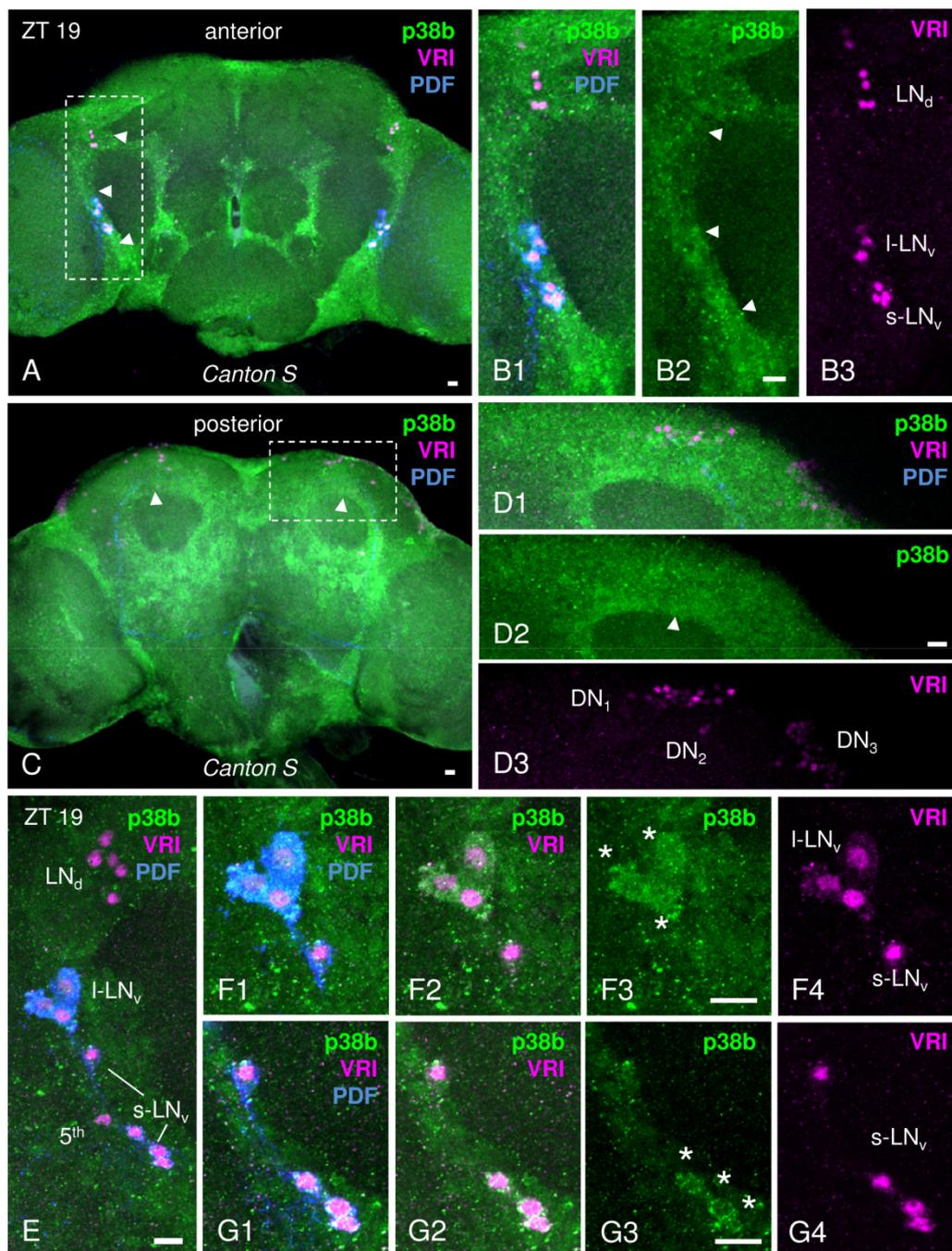


Abbildung 14: Antikörperfärbungen mit anti-p38b in *Canton S*.

Mehrfachfärbungen mit anti-p38b (grün), anti-VRI (magenta) und anti-PDF (blau) zeigen, ähnlich der UAS/Gal4-Reporterlinien, eine starke Expression von p38 insbesondere im Bereich der LN_v zwischen Zentralhirn und optischem Lobus (A und B) sowie im dorsalen Protocerebrum (C und D). Dennoch ist keine Colokalisation von anti-VRI und anti-p38b in den DN₁, DN₂ und DN₃ zu erkennen (D). Einzelaufnahmen der s-LN_v (G) und I-LN_v (F) offenbaren hingegen eine deutliches zytoplasmatisches p38b-Signal (Sterne in G3 und F3) in den lateralen Uhrneuronen. I-LN_v: große ventrolaterale Neurone; s-LN_v: kleine ventrolaterale Neurone; 5th: fünfte s-LN_v; LN_d: dorsolaterale Neurone; DN₁: dorsale Neurone 1; DN₂: dorsale Neurone 2; DN₃:dorsale Neurone 3; Maßstab: 10 µm; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Mit dem Ziel neben den s-LN_v und l-LN_v noch weitere p38-exprimierende Zellen im Uhrnetzwerk zu identifizieren, wurden zusätzlich Gehirnfärbungen mit anti-p-p38 durchgeführt, einem p38-Antikörper der ausschließlich phosphorylierte und damit aktivierte Isoformen von p38 detektiert. In Anbetracht der Tatsache dass p38 im SCN von Mäusen ein zeitliches Aktivierungsmuster zeigt (Pizzio et al., 2003), wurden Gehirne von Wildtyp und Kontrolle zu ZT9 und zu ZT21 gefärbt. Im Vergleich mit p38- bzw. p38b-Antikörperfärbungen zeigt CS mit anti-p-p38 eine deutliche, jedoch auf wenige Neuronen begrenzte, Färbung im dorsalen Hirnbereich (Abb. 15). So scheinen mit den DN_{1a} lediglich zwei anterior gelegene Uhrneuronen der DN₁-Gruppe phosphorylierte und somit aktive p38 MAPK aufzuweisen (Abb. 15B und E). Alle übrigen Uhrneuronengruppen, insbesondere die mittels anti-p38b detektierten s-LN_v oder l-LN_v, sind p-p38-negativ (Abb. 15C und F). Darüber hinaus deuten auftretende Färbeunterschiede der DN_{1a} zu ZT9 und ZT21 (Abb. 15B2 und E2) auf ein zyklisches Aktivierungsmuster von p38 in der inneren Uhr hin und könnten zugleich auch das fehlende p-p38-Signal in den übrigen Uhrneurongruppen erklären.

Um die Möglichkeit auszuschließen dass es sich bei der zytoplasmatischen Färbung der DN_{1a} zu ZT21 um ein unspezifisches Signal handelt, wurden im Folgenden zusätzlich zum Wildtyp sowohl p38a (*w; +; p38a^{Δ1}*) als auch p38b Knockoutfliegen (*w; p38b^{Δ45}*) mit anti-p-p38 und anti-TIM gefärbt. Im Gegensatz zu CS zeigen sowohl *w; +; p38a^{Δ1}* als auch *w; p38b^{Δ45}* eine signifikante Reduktion der p-p38-Färbeintensität in den DN_{1a} auf 50 % (Abb. 16; ANOVA, $p < 0,001$). Diese Halbierung der Färbeintensität ebenso wie die Tatsache, dass beide Knockoutmutanten neben der fehlenden Expression des jeweils mutierten Gens stets noch eine wildtypische Expression der zweiten p38-Isoform zeigen (siehe Abb. 28 in Abschnitt 4.3.4), bestätigt nicht nur die Spezifität des Antikörpers sondern lässt zudem eine Expression beider p38 Isoformen in den DN_{1a} vermuten.

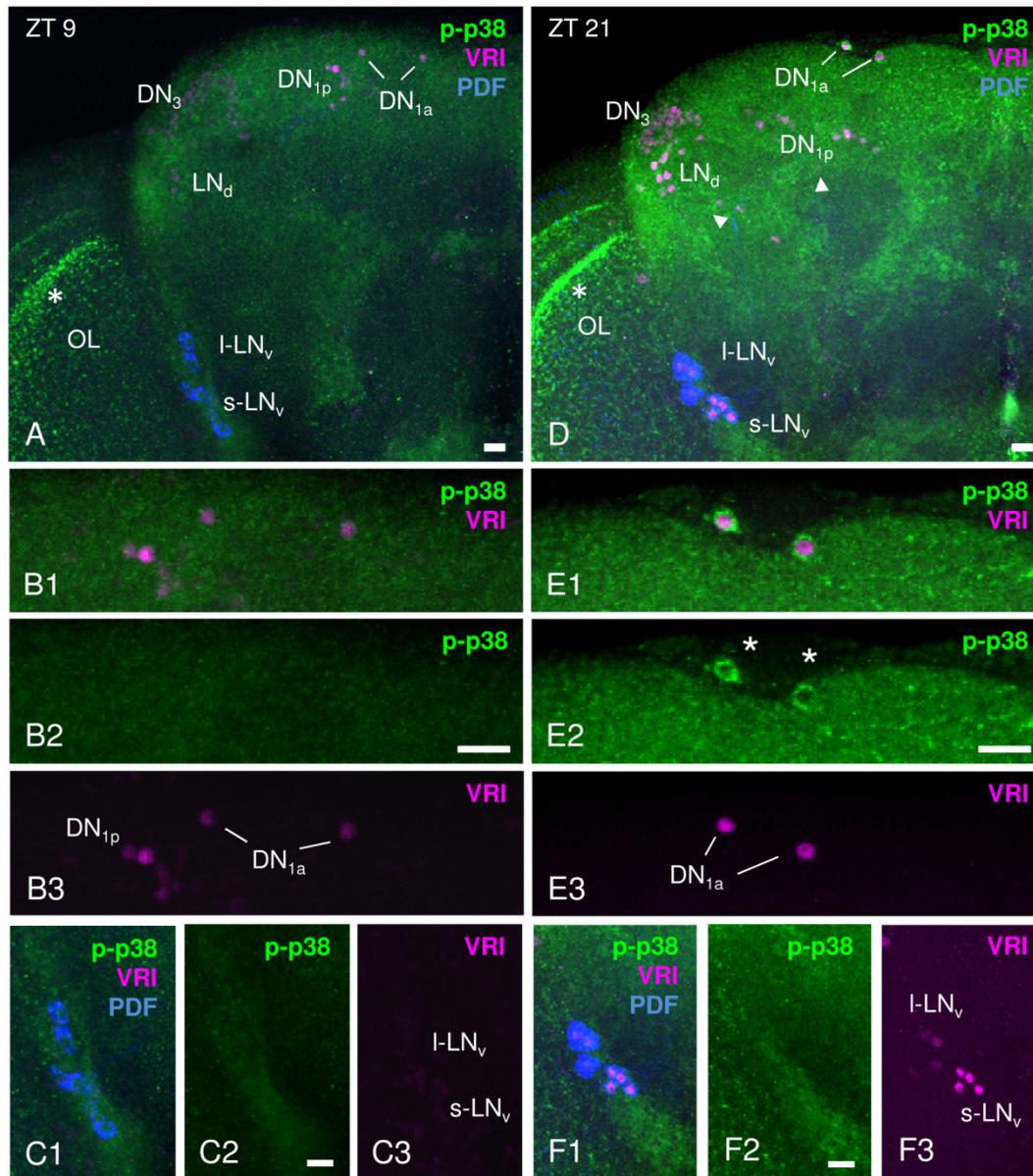


Abbildung 15: Antikörperfärbungen mit anti-p-p38 in *Canton S*.

Mehrfachfärbungen von *CS* mit anti-p-p38 (grün), anti-TIM (magenta) und anti-PDF (blau) zu ZT9 (A-C) und ZT21 (D-F) offenbaren phosphorylierte und aktivierte p38 MAPK vor allem im Protocerebrum (D), dem optischen Lobus (Stern in A und D) sowie im Zytoplasma der DN_{1a} (E). zu ZT21. Der Unterschied in der p-p38-Färbeintensität zwischen ZT9 und ZT21 deutet zudem auf eine zyklische Aktivierung von p38 in der inneren Uhr der Fliege hin (vgl. B2 und E2). Im Gegensatz dazu lassen DN_{1p}, DN₃; und LN_d (A und D) ebenso wie s-LN_v und I-LN_v (C und F), keine aktivierte p38 MAPK erkennen. I-LN_v: große ventrolaterale Neurone; s-LN_v: kleine ventrolaterale Neurone; LN_d: dorsolaterale Neurone; DN_{1a}: anterior gelegenen dorsalen Neurone 1; DN_{1p}: posterior gelegenen dorsalen Neurone 1; DN₃: dorsale Neurone 3; OL: optischer Lobus; Maßstab: 10 µm; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

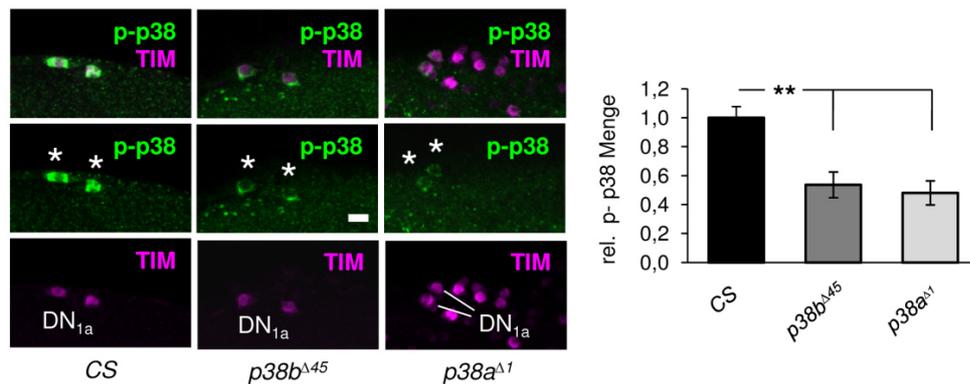


Abbildung 16: p-p38-Antikörperfärbung und normalisierter Spiegel aktiver p38 MAPK zu ZT21 in den DN_{1a} von CS, *w*; ; *p38a^{Δ1}* und *w*; *p38b^{Δ45}*.

DN_{1a} der Knockoutmutanten *w*; ; *p38a^{Δ1}* und *w*; *p38b^{Δ45}* zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine hoch signifikante Reduktion in phosphorylierter p38 um 50% und bekräftigen die Spezifität des p-p38 Antikörpers. DN_{1a}: anterior gelegene dorsale Neurone 1; anti-p-p38: grün.; anti-TIM: magenta; Maßstab: 10 μm; **: *p*<0,001; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Retinas von *p38b-Gal4*; *UAS-GFP^{S65T}* Fliegen lieferten erste Hinweise auf eine Expression der MAPK p38, insbesondere in den sekundären und tertiären Pigmentzellen der Fliege. Um dieses Ergebnis in Antikörperfärbungen zu bestätigen, wurden Fliegenretinas zu ZT21 präpariert und über Nacht in Färbelösung mit anti-p-p38, anti-PER und anti-Rh1 inkubiert. Da rote Augenpigmente im konfokalen Lasermikroskop fluoreszieren und zugleich langwierige Waschschrte zum Entfernen der Pigmentierung vermieden werden sollten, wurden anstelle von *Canton S* Retinas des weißäugigen Stammes *w¹¹¹⁸* Fliegen verwendet. Diese zeigen im Unterschied zu hypomorphen Doppelknockoutkontrolle *p38b^{Δ25}*; *p38a^{Δ1}* ein deutliches p-p38-Signal in den sekundären Pigmentzellen (weiße Pfeile in Abb. 17) und bestätigen somit das Expressionsmuster von *p38b-Gal4*; *UAS-GFP^{S65T}*. Ein Nachweis von aktivierter, phosphorylierter p38 MAPK in weiteren Bereichen der Retina, wie zum Beispiel den tertiären Pigmentzellen oder Photorezeptorzellen Rh1 bis Rh8 war hingegen nicht möglich. Dies könnte jedoch an einem generell schwachen p-p38-Signal in Verbindung mit der ungeeigneten, hypomorphen Kontrolle (*p38b^{Δ25}*; *p38a^{Δ1}*) liegen, sowie an ungünstig gewählten Färbezeitpunkten.

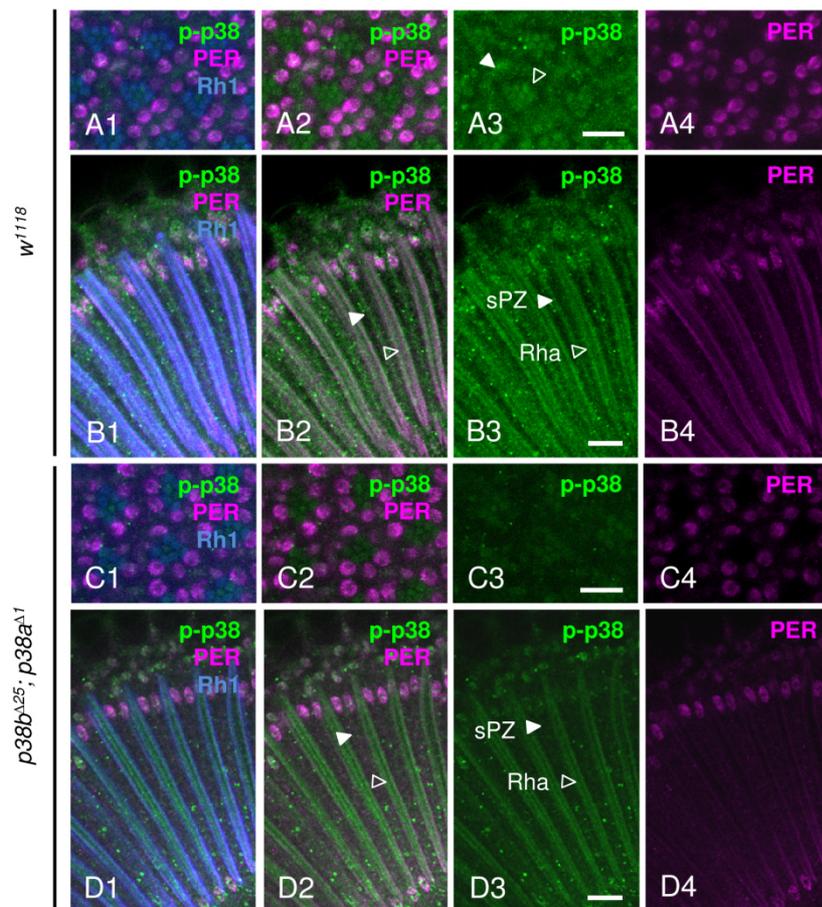


Abbildung 17: Retinafärbung mit anti-p-p38 in w^{118} und $p38b^{\Delta 25}; p38a^{\Delta 1}$ zu ZT21.

A und D zeigen Längsschnitte, B und C Querschnitte von Retinas des weißäugigen Wildtypstamm w^{118} (A, B) sowie der weißäugigen hypomorphen Doppelknockout $p38b^{\Delta 25}; p38a^{\Delta 1}$ (C, D). Dreifachfärbungen mit anti-p-p38 (grün), anti-PER (magenta) und anti-Rh1 (blau) weisen auf aktivierte p38 MAPK in den sekundären Pigmentzellen hin (weißer Pfeil in A3, B2 und B3). sPZ: sekundäre Pigmentzelle; Rha: Rhabdomer (ungefüllter Pfeil); Maßstab: 10 μm

4.1.3 Endogene Expression von p38 im Tagesverlauf

Deutliche Färbeunterschiede mit anti-p-p38 in den DN_{1a} zu ZT9 und ZT21 (Abb. 15) könnten sowohl auf eine zeitabhängige Aktivierung, als auch auf eine zeitlich variierende Expression von p38 zurückzuführen sein. Um zum einen letztere Möglichkeit auszuschließen und zum anderen die Expression von p38 MAPK in der inneren Uhr der Fliege besser zu charakterisieren, wurde im nächsten Schritt die Transkriptionsrate von p38a und p38b im Tagesverlauf untersucht. Hierfür wurde über den Tag verteilt alle 4 Stunden die p38 mRNA-Menge in Kopfextrakten bestimmt und zum Haushaltsgen $\alpha\text{-Tubulin}$ normalisiert. $\alpha\text{-Tubulin}$ zeigt im Tagesverlauf eine konstitutive Transkription

ohne internen oder externen regulatorischen Einflüssen zu unterliegen und eignet sich somit hervorragend um Schwankungen im Transkriptionsspiegel in Folge von Variationen in der Ausgangsmenge zu eliminieren. Quantitative real-time PCR-Daten offenbaren, ähnlich dem Haushaltsgen *α -Tubulin*, eine konstante Transkription von *p38a* und *p38b* im Tagesverlauf (Abb. 18).

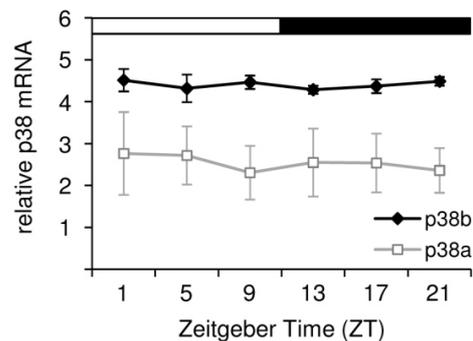


Abbildung 18: Relative *p38a* und *p38b* mRNA Level in Kopfextrakten von CS.

Zur Untersuchung der Transkription von *p38* im Tagesverlauf, wurden mittels quantitativer real-time PCR *p38a* und *p38b* mRNA Level zu ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17 und ZT21 bestimmt und für jeden Zeitpunkt relativ zum Haushaltsgen *α -Tubulin* gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler von jeweils drei Ansätzen mit je fünf Köpfen. Der weiß-schwarze Balken oberhalb des Graphen repräsentiert das während dem Entrainment verwendete Lichtregime. Sowohl *p38a* als auch *p38b* mRNA Level zeigen keine circadiane Schwankungen im Tagesverlauf und deuten auf eine konstitutive Transkription beider *p38* Isoformen hin. Zudem weist *p38b* über den gesamten Tag ein höheres Transkriptionslevel als *p38a* auf (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Ebenso zeigen mRNA Expressionsdaten einen über den Tag verteilt beständig höheren Transkriptionsspiegel von *p38b* gegenüber *p38a*, eine Tatsache die auf eine bedeutende Rolle in der inneren Uhr hinweisen könnte. Jedoch muss angemerkt werden, dass das verwendete Ausgangsgewebe nicht exklusiv das Expressionsmuster der inneren Uhr widerspiegelt. Im Gegenteil, so machen p38-positive Uhrneurone im Vergleich zu übrigen p38-exprimierenden Zellen in Gehirn (Abb. 10 - 11 vs. Abb. 13 - 15) und Komplexauge der Fliege nur einen geringen Prozentsatz aus. Eine circadiane Regulation der Transkription von *p38a* und *p38b* in der Uhr könnte demzufolge durch die Expression in den übrigen Geweben maskiert werden. Konstante p38 Proteinlevel in Zirbeldrüse (Chik et al., 2003; Hayashi et al., 2003) und SCN (Pizzio et al., 2003) stehen allerdings in Einklang mit den hier gezeigten mRNA-Daten und unterstützen die Hypothese einer konstitutiven *p38a* und *p38b* Expression im circadianen System. Selbst wenn die geringe Anzahl an durchgeführten qPCR keine Rückschlüsse auf die Repräsentativität des Ergebnisses zulässt ist, so weisen doch Expressionsdaten der

Dies muss jedoch nicht bedeuten dass p38 MAPK in Fliegenköpfen über den Tag verteilt in seiner konstitutiv aktiven Form vorliegt. Vielmehr enthalten die aufgetragenen Proteinextrakte einen Pool aus unterschiedlichsten p38-exprimierenden Neuronen bzw. Zellgruppen (siehe Abb. 10 - 11), welche in sich durchaus eine zyklische Aktivierung von p38 (Abb. 15) aufweisen können. Ebenso detektiert anti-p-p38, neben phosphoryliertem p38a auch phosphoryliertes p38b und könnte demnach mögliche antizyklische Aktivierungskurven beider Isoformen „miteinander verrechnen“. In beiden Fällen würde in der Summe betrachtet Schwankungen im p-p38 Level nicht zu Tage treten. Zwar konnten Chik et al.(2003) und Pizzio et al. (2003) eine zyklische Aktivierung von p38 im circadianen System von Hühnern und Hamstern mittels Westernblots nachweisen, allerdings handelt es sich bei den hierbei untersuchten Geweben, der Zirbeldrüse und dem SCN, um zwei lokal abgegrenzte und somit isolierbare Schrittmacherzentren. Die innere Uhr von *Drosophila melanogaster* hingegen setzt sich aus bis zu 150, über das gesamte Gehirn verteilte Neuronen zusammen. Ein Westernblot übermittelt demnach lediglich einen Eindruck über das mögliche Aktivierungsmuster von p38 im Kopf der Fliege, erlaubt im Detail aber keine Schlüsse auf die Phosphorylierung von p38 in der inneren Uhr. Um letzteres zu untersuchen, wurden immunhistochemische Dreifachfärbungen mit anti-p-p38, anti-VRI und anti-PDF an adulten Fliegengehirnen in LD 12:12 durchgeführt. In der Hoffnung neben den DN_{1a} noch weitere p-p38-positive Uhrneurone zu detektieren, wurden die Fliegen über den Tag verteilt alle 4 Stunden fixiert und präpariert. Entgegen den Erwartungen war trotz des im Vergleich zum Vorversuch (siehe Abb. 15 in Abschnitt 4.1.2) gewählten engeren Zeitintervalls, neben den DN_{1a} (Abb. 20), in keinem weiteren Uhrneuronencluster phosphorylierte p38 MAPK zu erkennen (Daten nicht gezeigt). In den DN_{1a} zeigt sich jedoch, ähnlich dem Vorversuch, in der Nacht ein, im Vergleich zum Tag, signifikant höheres Level an phosphoryliertem p38 (Abb. 20A; ANOVA, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Dies bestätigt den Anfangsverdacht einer zyklischen Aktivierung der p38 in den DN_{1a}.

Zeitgleich fiel bei der Messung der p-p38-Färbeintensität auf, dass die Anzahl p-p38-positiver DN_{1a} pro ZT vereinzelt stark variierte. So treten bei Nacht-Zeitpunkten durchschnittlich 1-2 deutlich gefärbte DN_{1a} auf, während Präparate in der Lichtphase nur in seltenen Fällen p-p38-Färbung in ein oder zwei DN_{1a} aufweisen. Trotz dieser leichten Variationen bleibt die durchschnittliche Anzahl gefärbter DN_{1a} während der gesamten Nacht stets signifikant höher als während des Tages (Abb. 20B; ANOVA, $p < 0,001$). Dieser Unterschied ebenso wie die signifikant höhere durchschnittliche p-p38-

Färbeintensität während der Nacht sprechen eindeutig für eine zyklisch regulierte Phosphorylierung von p38 MAPK im circadianen System von *Drosophila*.

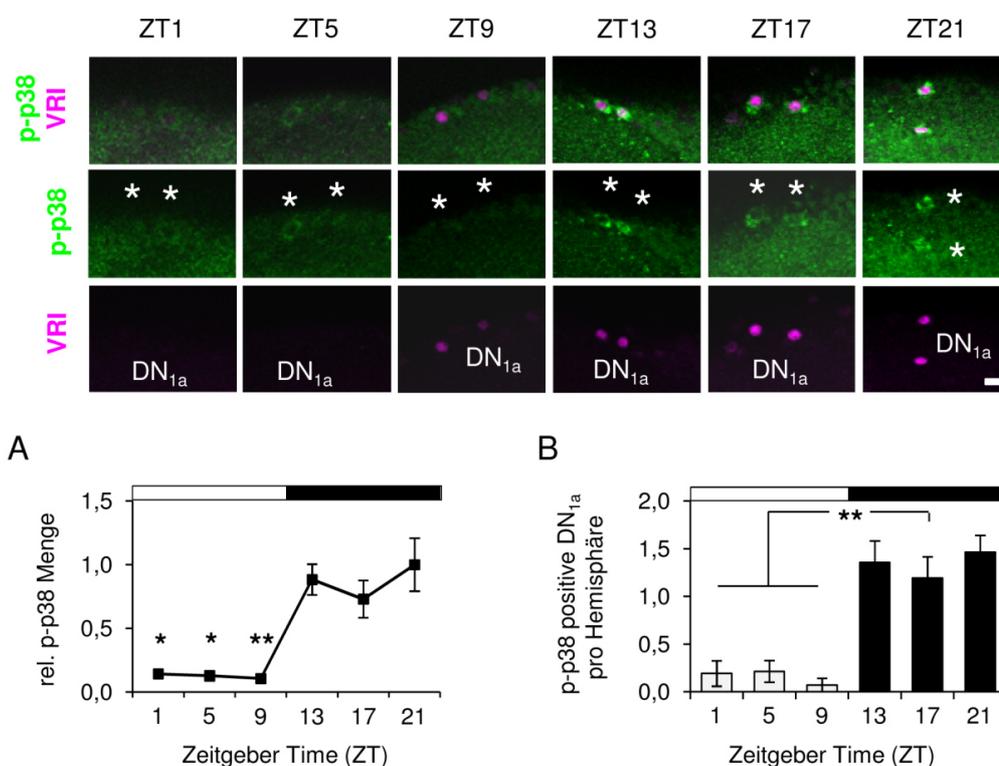


Abbildung 20: Phosphorylierte p38 MAPK und Anzahl p-p38-positiver DN_{1a} in CS Wildtyp in LD 12:12.

Gezeigt sind neben Nahaufnahmen von VRI- und p-p38-markierter DN_{1a}, relativer p-p38 Level im Tagesverlauf (A) sowie die Anzahl p-p38-positiver DN_{1a} pro Hirnhemisphäre (B). Zur Auswertung der p-p38 Färbung, wurde die Färbeintensität der DN_{1a} in 10 Hirnen pro ZT bestimmt, die Messwerte gemittelt und zum höchsten Mittelwert der Zeitreihe (ZT21) normalisiert. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung auf signifikante Unterschiede innerhalb der Zeitreihe mittels 1-way-ANOVA. Dargestellt sind p-Werte der Tageszeitpunkte im Vergleich zum niedrigsten Mittelwert der Nacht (ZT17). Während in der Lichtphase kaum aktives p38 vorliegt, zeigen die DN_{1a} einen signifikanten Anstieg sowie konstant hohes Level phosphorylierter p38 MAPK während der Nacht. Trotz circadianer Variationen in der Menge p-p38-positiver DN_{1a}, unterscheiden sich die Mittelwerte der Tageszeitpunkte von ZT17, dem Nachtzeitpunkt mit der durchschnittlich geringsten Anzahl p-p38-positiver DN_{1a}. Maßstab: 10 μ m, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Ob es sich hierbei um eine uhrvermittelte Phosphorylierung handelt oder lediglich um eine direkte Reaktion auf Dunkelheit, sollten Gehirnfärbungen in DD zeigen (Abb. 21). Hierfür wurden die Tiere zunächst 4 Tage auf einen LD 12:12 synchronisiert und nach Überführung in konstante Dauerdunkel-Bedingungen am ersten Tag zu CT6 und CT18 präpariert. Ähnlich den LD-Daten offenbaren Doppelfärbungen mit anti-p-p38 und anti-VRI signifikante Unterschiede im p-p38 Level mit signifikant mehr phosphoryliertem p38

in der subjektiven Nacht (CT18) als während des subjektiven Tages (CT6) und bestätigen damit die Hypothese einer Uhr-kontrollierten Phosphorylierung von p38 MAPK (Abb. 21A; ANOVA, $p < 0,001$). Da vorausgehende Studien bei Mäusen (Obrietan et al., 1998; Butcher et al., 2003; Nakaya et al., 2003) und Hamstern (Pizzio et al., 2003) insbesondere eine Licht-abhängige Regulation des Aktivitätszustands von MAP Kinasen wie ERK und p38 beschreiben, wurden Fliegen zu CT6 und CT18 zusätzlich einem 15-minutigen Lichtpuls von 100 lux ausgesetzt und direkt im Anschluss fixiert und präpariert. Tiere ohne Lichtpuls-Behandlung dienten dabei als entsprechende Kontrolle. Interessanterweise führt ein Lichtpuls zu CT18 zu einer signifikanten Abnahme von p-p38 in den DN_{1a} (Abb. 21B; ANOVA; $p < 0,05$), während am subjektiven Tag die Menge an aktivem p38 trotz Lichtpuls-Behandlung konstant bleibt (ANOVA, $p = 1,000$). Dieses Ergebnis deutet neben einer Uhr-regulierten Phosphorylierung zusätzliche auf ein Licht-gesteuerte Regulation (Inhibierung) von p38 hin und steht zudem im Widerspruch zur Licht-induzierten Aktivierung von p38 im SCN von Hamstern (Pizzio et al., 2003).

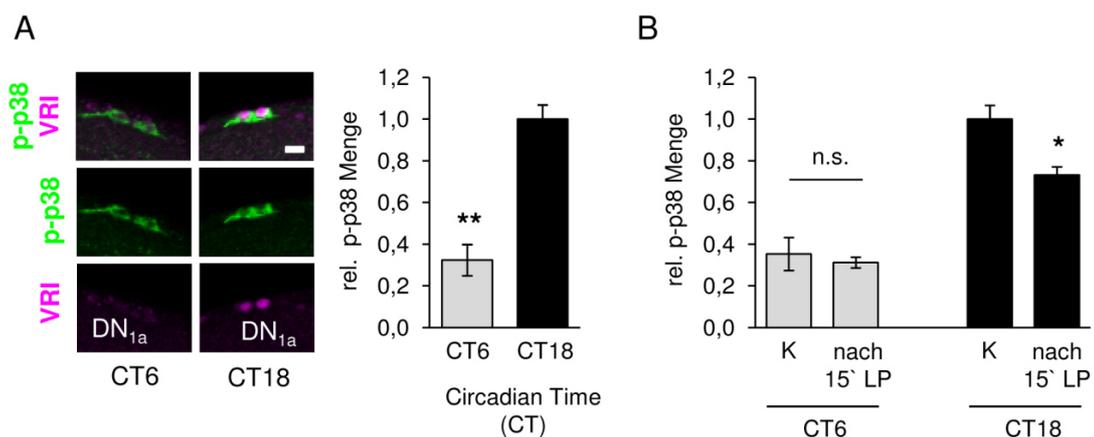


Abbildung 21: Uhr- und lichtgesteuerte Aktivierung von p38 MAPK in den DN_{1a}.

Abbildung A zeigt repräsentative Nahaufnahmen der DN_{1a} mit anti-p-p38 und anti-VRI zu CT6 und CT18. P-p38-Färbeintensitäten aus 10 Fliegenhirnen pro Zeitpunkt wurden gemessen, gemittelt und zum Wert bei CT18 normalisiert. Der signifikante Anstieg von phosphorylierter, aktivierter p38 setzt sich, ähnlich dem LD (siehe Abb. 20A), auch in DD fort und deutet zugleich auf eine uhrgesteuerte Phosphorylierung von p38 MAPK hin (A). Dass dieser Anstieg rein Uhr-induziert und nicht lichtgesteuert ist zeigen 15-Minuten-Lichtpulse zu CT6 bzw. CT18. Während sich Fliegen nach einem 15-minütigen Lichtpuls (LP) während des subjektiven Tages (CT6) nicht in ihrer p-p38-Färbeintensität von der unbehandelten Kontrolle unterscheiden, bewirkt ein Lichtpuls während der subjektiven Nacht eine deutliche Reduzierung des p-p38 Levels in den DN_{1a} (B). Maßstab: 10 μ m, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.3 Einfluss des p38 Expressionslevels auf das rhythmische Laufverhalten

Immunhistochemische Färbungen im Rahmen dieser Dissertation konnten erstmals eine Expression von p38 MAPK in einzelnen Uhrneuronen von *Drosophila melanogaster* nachweisen. Um neben einer Lokalisation zusätzlich auch eine funktionelle Rolle von p38 im circadianen System aufzudecken, wurden mittels RNA Interferenz (RNAi) sowie durch ektopische Expression mutierter Kinasenkonstrukte mRNA Level, Proteinmenge und Aktivität von p38 MAPK in einzelnen Uhrneurongruppen manipuliert und die mutanten Fliegenstämme für 6 Tage in LD 12:12 gefolgt von 14 Tagen DD aufgezeichnet. Aktivitätsaufzeichnungen stellen in der Chronobiologie eine gängige und einfache Methode dar, circadiane Verhaltensrhythmen in *Drosophila* zu untersuchen und auf diese Weise die mögliche Bedeutung eines Proteins für die innere Uhr aufzuklären. So zeigen Wildtypfliegen in LD 12:12 ein typisches bimodales Aktivitätsmuster (siehe Abb. 7 in Abschnitt 3.1.2) mit verstärkter Morgenaktivität zu Licht-an (ZT0) sowie einem weiteren zweiten Aktivitätsmaximum zu Licht-aus (ZT12). Dieses rhythmische Laufverhalten setzt sich auch im Dauerdunkel fort. Die individuelle physiologische Periode dieses Aktivitätsrhythmus reflektiert hierbei die eigentliche Geschwindigkeit des „Uhrwerks“ und beträgt bei Wildtypfliegen etwa 24 Stunden. Durch Mutationen einzelner Proteine hervorgerufene Abweichungen von diesen „Aktivitätscharakteristika“, wie zum Beispiel eine Verschiebung der Aktivitätsphase in LD oder eine Periodenverlängerung in DD, deuten meist auf Störungen des circadianen Systems hin und erlauben oft erste Rückschlüsse auf die Bedeutung des jeweiligen Proteins für die innere Uhr und deren molekularen Mechanismus.

4.3.1 Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit herunterreguliertem p38b Signalweg

Mit dem Ziel, die Rolle von p38 MAPK innerhalb des circadianen Systems aufzuklären, wurde zunächst *w; UAS-p38b^{RNAi}; +* mit unterschiedlichen Uhrneuronen-Treiberlinien kombiniert. Jede dieser Treiberlinien besitzt neben ihrer spezifischen Gal4-Sequenz zusätzlich das Gen *dicer* unter Kontrolle einer UAS-Sequenz (*UAS-dicer2*; abgekürzt *dicer2*). Dicer, ist eine in eukaryotischen Zellen vorkommende Endoribonuklease, welche durch Schneiden von doppelsträngige RNA in 20-25-Nukleotid-große Stücke die RNA Interferenz einleitet (Bernstein et al., 2001) und auf diese Weise durch Überexpression auch zu einer Verstärkung des RNAi-vermittelten Knockdowns führen

kann. Um möglichst alle Uhrneuronen abzudecken und so die Chance auf einen sichtbaren Effekt im Verhalten zu erhöhen, wurde mit *dicer2;tim(UAS)-Gal4;+* zunächst eine Treiberlinie mit einem möglichst breiten Expressionsmuster gewählt. Entgegen den Erwartungen unterscheidet sich *dicer 2; UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* unter LD-Bedingungen jedoch nicht von seinen Kontrollen und zeigt im Durchschnittstag ein wildtypisches Aktivitätsmuster mit verstärkter Laufaktivität zu Licht-an und Licht-aus (Abb. 22A). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine fehlende oder nicht ausreichend starke RNAi-vermittelte Reduktion von *p38b* mRNA sein. Um die Effektivität des *p38b* RNAi-Transgens zu überprüfen, wurde eine real-time PCR mit Kopfextrakten von *dicer 2; UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* Fliegen durchgeführt. Zwar zeigen diese sowohl im Vergleich mit *CS* als auch mit den entsprechenden Kontrollen keine signifikante Reduktion ihres *p38b* mRNA Levels (Abb. A3; Kruskal-Wallis; $p=0,790$), der fehlende Unterschied könnte jedoch auf die, im Vergleich zur Gesamtzahl an *p38b*-exprimierenden Neuronen im Gehirn, geringe Anzahl an *p38b*-positiven Uhrneuronen zurückzuführen sein (siehe Abb. 11 vs. Abb. 14). Um diesem Verdacht nachzugehen wurde *w;UAS-p38b^{RNAi};+* zusätzlich mit *da-Gal4* kombiniert, einer Treiberlinie die Gal4 in nahezu allen Geweben im Laufe der Entwicklung exprimiert (Wodarz et al., 1995). Wider Erwarten zeigt *w;UAS-p38b^{RNAi}/+;da-Gal4/+* eine Reduktion seines *p38b* mRNA Levels auf bis zu 50% des Wildtyplevels (Abb. A3B; Wilcoxon; $p<0,05$). Dieses Ergebnis unterstreicht eindeutig die Effektivität des *p38b^{RNAi}*-Konstrukts, legt jedoch im Umkehrschluss auch einen ausbleibenden LD-Phänotyp trotz funktionierendem RNAi-Knockdowns in *dicer 2; UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* nahe. Aufgrund dieser fehlenden Auffälligkeiten unter LD-Bedingungen, wurde der Focus als nächstes auf Lokomotorrhythmen unter Freilaufbedingungen gelegt. Im Gegensatz zu LD, offenbaren χ^2 -Periodogrammanalysen in nahezu 93% der *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* Fliegen ein arrhythmisches Verhalten in DD (Tab. A4). Lediglich 7% zeigen rhythmische Laufaktivität mit signifikant verlängerter Freilaufperiode von 25,3 h (Abb. 22A; ANOVA; $p<0,001$; Tab. A4).

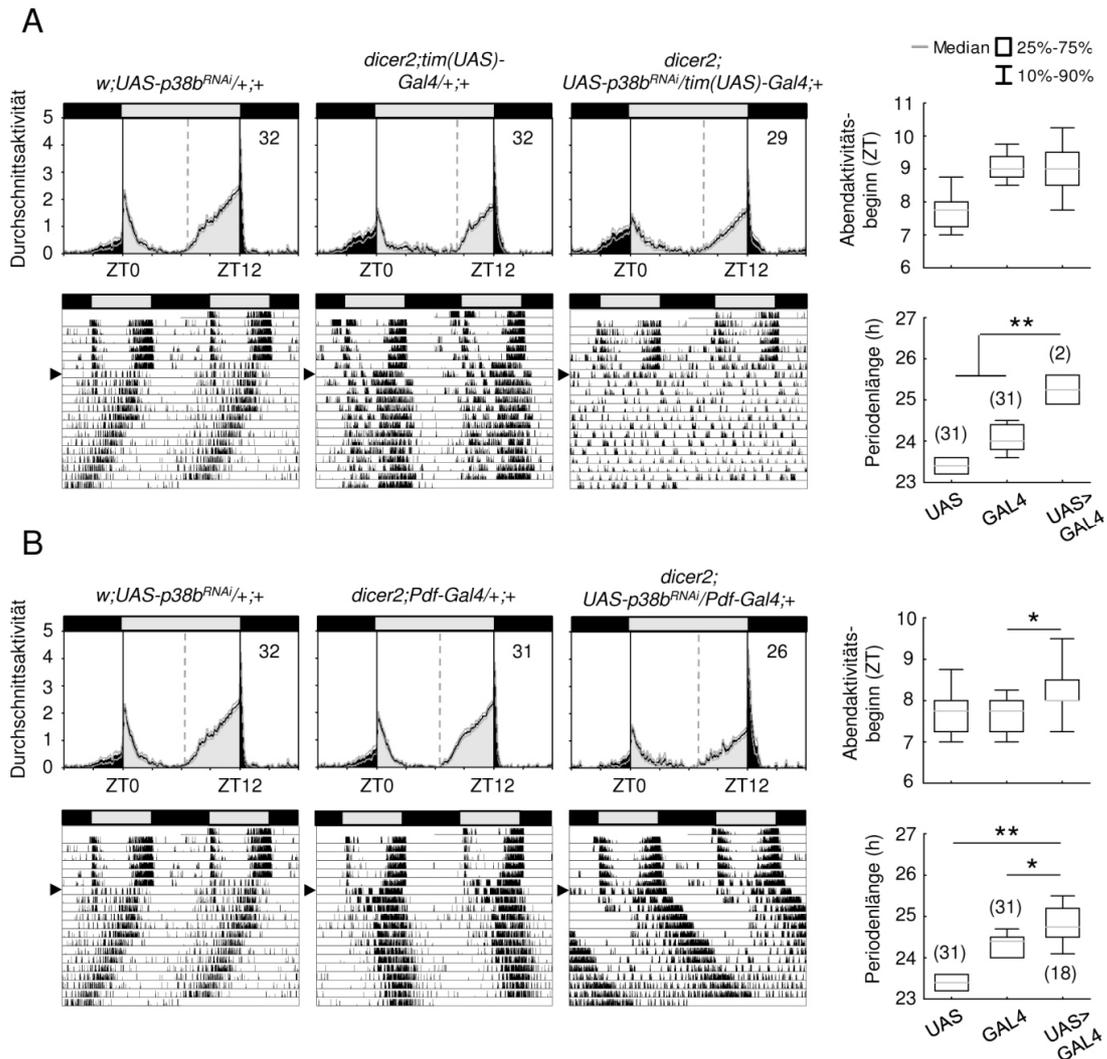


Abbildung 22: Laufaktivitätsrhythmen von $p38b^{RNAi}$ -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.

Für die Untersuchung der Aktivitätsrhythmen wurden Fliegen zunächst 6 Tage in LD 12:12 gefolgt von 14 Tagen DD aufgezeichnet. Die Aktivitätsdaten von Tag 2-7 in LD wurden pro Genotyp zu einem Durchschnittstag zusammengefasst und sind über den repräsentativen Doppelplot-Aktogramm von Einzelfliegen abgebildet (linke Spalte in A und B). Zusätzlich wurde für jeden Genotyp der Beginn der Abendaktivität in LD (oberer rechter Graph in A und B) sowie die durchschnittliche Freilaufperiode in DD (unterer rechter Graph in A und B) bestimmt und als Boxplot graphisch dargestellt. Während *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* (A) im Durchschnittstag ein wildtypisches LD-Verhalten mit Aktivitätsmaxima zu Licht-an und Licht-aus zeigt, ist der Beginn der Abendaktivität von *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* (B) im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verzögert ($p < 0,05$). Nach Transfer in DD, wird *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* zunehmend arrhythmisch (rechtes Aktogramm in A; Tab. A4). Lediglich 7% der Fliegen bleiben rhythmisch und zeigen im Gegensatz zu den Kontrollfliegen eine signifikante Verlängerung ihrer Freilaufperiode (unterer rechter Graph in A). Ein etwas anderes Bild liefert der $p38b^{RNAi}$ -vermittelter Knockdown in PDF-positiven Uhrneuronen. Hier zeigt *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* in 58% der Fälle rhythmisches Verhalten sowie eine signifikant längere Freilaufperiode als ihre entsprechenden Kontrolle (rechtes Aktogramm in B; Tab. 4A). Die Balken oberhalb der Durchschnittstag und Aktogramm stellen die verwendeten Lichtregime dar. Die seitlichen schwarzen Pfeile markieren den Übergang von 12:12 LD zu DD. Schwarze Linien im Durchschnittstag-Graphen repräsentieren die durchschnittliche relative Aktivität, graue Linien den Standardfehler und gestrichelte graue Linien den errechneten Startpunkt der Abendaktivität. ZT0 gibt den Zeitpunkt für Licht-an, ZT12 den Zeitpunkt für Licht-aus wieder. Graue Linien innerhalb der Boxplots symbolisieren den Median, Rechtecke markieren den Bereich zwischen oberer und unterer Quartile und T-Fortsätze den Bereich in dem 10-90% der Werte liegen. UAS bzw. GAL4 sind Abkürzungen

für die entsprechende UAS- bzw. Gal4- Kontrolle, UAS>GAL4 hingegen bezeichnet die Experimentallinie. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch *, hoch signifikante ($p < 0,001$) durch ** gekennzeichnet. „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Da *dicer2;tim(UAS)-Gal4;+* nicht nur in den Uhrneuronen, sondern auch in den Gliazellen eine Genexpression induziert, stellt sich die Frage ob es sich hier möglicherweise um einen reinen Glia-spezifischen Effekt auf Rhythmizität und Periodenlänge handelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde *w; UAS-p38b^{RNAi}; +* zusätzlich mit *dicer2;Pdf-Gal4;+* kombiniert, einer rein Uhr-spezifischen Treiberlinie welche mit den s-LN_v und l-LN_v, den RNAi-vermittelten *p38b* Knockdown einzig und allein auf 2 PDF-exprimierende Uhrneuronengruppen beschränkt. Interessanterweise zeigt *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* im Gegensatz zu *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+*, lediglich in weniger als der Hälfte der Fälle arrhythmisches Verhalten (Tab. A4). 58% der Tiere hingegen sind rhythmisch und offenbaren in ihrem Durchschnittstag im Vergleich mit ihren Kontrollen einen verspäteten Beginn der Abendaktivität sowie eine insgesamt länger anhaltende Laufaktivität nach Licht-aus (Abb. 22B; Wilcoxon; $p < 0,05$). Diese Phasenverschiebung setzt sich auch unter DD-Bedingungen fort und resultiert letztendlich in einer signifikant längeren Freilaufperiode von 24,8 h (Abb. 22B; Wilcoxon; $p < 0,05$ und $p < 0,001$; Tab. A4).

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse erste Hinweise für eine Rolle von *p38b* innerhalb des circadianen Systems der Fliege und legen die Vermutung nahe, dass eine gezielte Herunterregulierung von *p38b* in der Uhr zu einer Verschiebung der Abendaktivität sowie zu verlängerten Freilaufperioden führt. Dennoch dürfen potentielle „off-target“-Effekte - eine häufige Problematik der RNA Interferenz - nicht außer Acht gelassen werden. So besteht die Möglichkeit dass neben der gewünschten Ziel-mRNA auch andere Sequenzen prozessiert werden, ein auftretender Phänotyp würde infolgedessen zu einer falschen Genotyp-Phänotyp-Assoziation führen. Um derartige Fehlinterpretationen zu vermeiden, empfiehlt es sich grundsätzlich verschiedene unabhängige *p38b^{RNAi}*- Linien zu verwenden. Da dies im Zuge dieser Arbeit nicht möglich war, wurden zur erneuten Manipulation von endogenem *p38b* im circadianen System neben *p38b^{RNAi}* weitere *p38b*-Konstrukte in PDF- und TIM-positiven Uhrneuronen exprimiert: zwei *UAS-p38b kinase-dead* Transgene, das schwächere *UAS-p38b^{KD3}* und das stärkere *UAS-p38b^{KD8}*, sowie ein dominant-negatives *UAS-p38b* Transgen (*UAS-p38b^{DN-S}*). Letzteres besitzt in seiner MAPKK Zielsequenz an Stelle 183 die Aminosäure Alanin anstelle von Threonin. Dieser Aminosäureaustausch führt zu

einem kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität von p38b (Adachi-Yamada et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurden die *UASp38b^{KD}* Konstrukte durch Austausch von Lysin53 in der katalytischen Domäne mit Arginin hergestellt. Auch dieser Aminosäureaustausch hat einen Aktivitätsverlust zur Folge, erlaubt jedoch weiterhin die Bindung von Substrat (persönliche Korrespondenz mit A. Vrailas-Mortimer). Interessanterweise führt die simultane Expression von *UAS-p38b^{KD3}* und *UAS-p38b^{KD8}* in PDF- als auch TIM-exprimierenden Neuronen unter LD-Bedingungen im direkten Vergleich mit den Kontrollen zu einem verspäteten Aktivitätsbeginn am Abend (Abb. 23; Wilcoxon; $p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$), sowie zu einer um 1 h verlängerten Freilaufperiode in DD (Abb. 23; Wilcoxon; $p < 0,001$). Dies bestätigt die bereits durch RNA Interferenz von p38b gefundenen Phänotypen. Allerdings tritt, anders als beim RNAi-vermittelten Knockdown, in *UASp38b^{KD}*-Fliegen keine Arrhythmizität unter konstanten Bedingungen auf (Tab. A4).

Noch deutlicher wird dieser Phänotyp, wenn ein dominant-negatives p38b Transgen (*UAS-p38b^{DN-S}*) in allen Uhrneuronen (mit *w; tim(UAS)-Gal4; +*) oder ausschließlich in den LN_v (mit *yw; Pdf-Gal4; +*) exprimiert wird. So zeigen beide Experimentallinien gegenüber ihren Kontrollen einen sichtbar verzögerten Beginn der Abendaktivität in LD (Abb. 24; jeweils Wilcoxon; $p < 0,001$), und eine deutlich verlängerte Freilaufperiode in DD. Während *UAS-p38b^{DN-S}; tim(UAS)-Gal4/+* im Vergleich zu *UAS-p38b^{DN-S}; +; +* und *w; tim(UAS)-Gal4/+; +* mit 25,9 h eine um bis zu 2 Stunden längere Freilaufperiode aufweist (Abb. 24; Wilcoxon; $p < 0,001$), beträgt der Unterschied in *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* sogar bis an die 2,5 Stunden (Abb. 24; Wilcoxon; $p < 0,001$; Tab. A4). Darüber hinaus ist, ähnlich wie in *UASp38b^{KD}*-Fliegen, auch bei Expression von dominant-negativen p38b kein arrhythmisches Laufverhalten zu beobachten (Tab. A4).

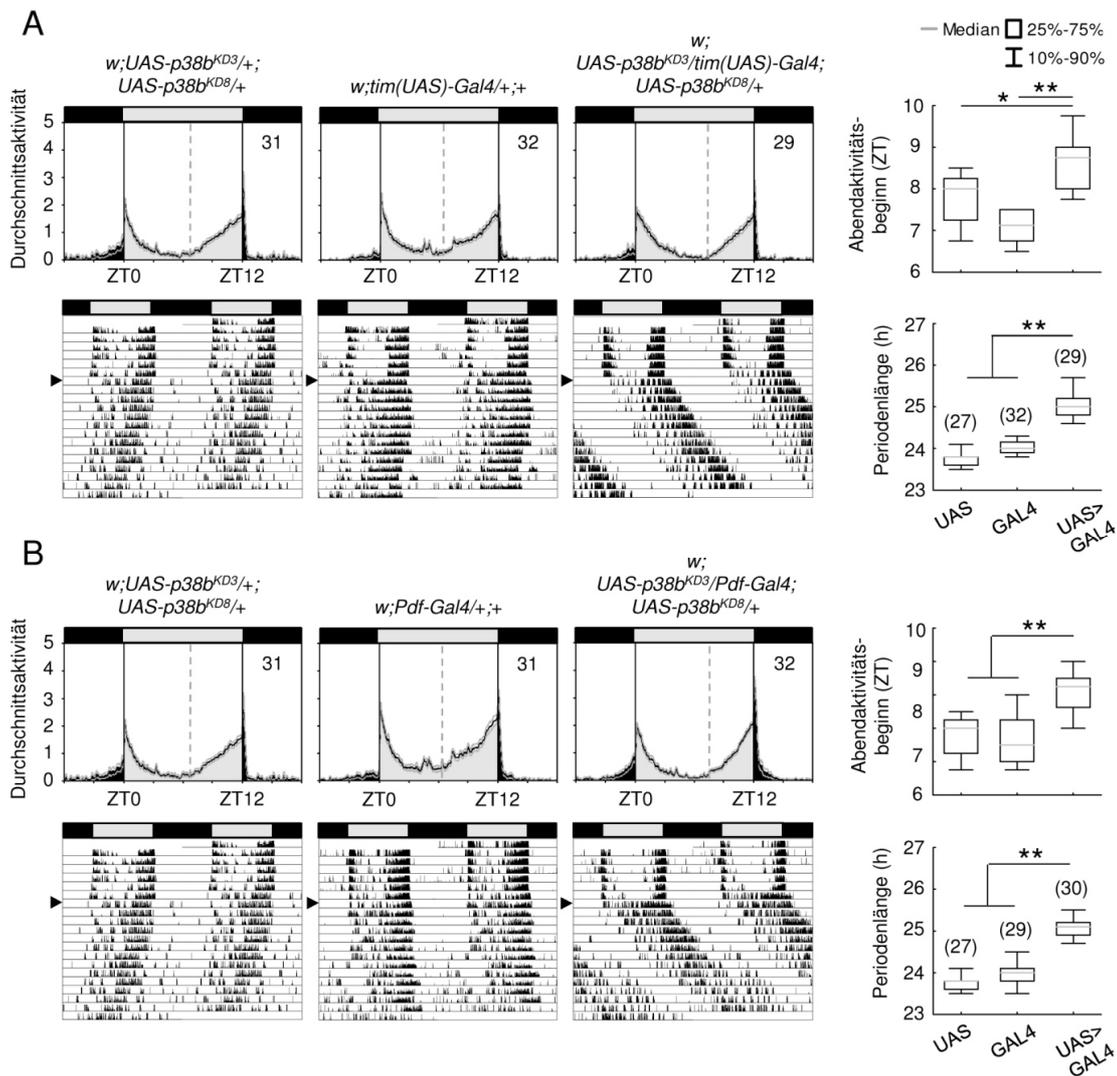


Abbildung 23: Laufaktivitätsrhythmen von *p38b^{KD}*-Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.

Sowohl *w; UAS-p38b^{KD3}/tim(UAS)-Gal4; UAS-p38b^{KDB/+}* (obere Reihe in A) als auch *w; UAS-p38b^{KD3}/Pdf-Gal4; UAS-p38b^{KDB/+}* (obere Reihe in B) zeigen wildtypisches Verhalten in LD mit Aktivitätsmaxima zu ZT0 und ZT12, sowie einen signifikant späteren Aktivitätsbeginn am Abend als die entsprechenden Kontrollstämmen. Diese Tendenz setzt sich in beiden Fällen in einer signifikanten Verlängerung der Freilaufperiode unter DD-Bedingungen fort (untere Reihe in A und B). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch *, hoch signifikante ($p < 0,001$) durch ** gekennzeichnet. „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zu Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

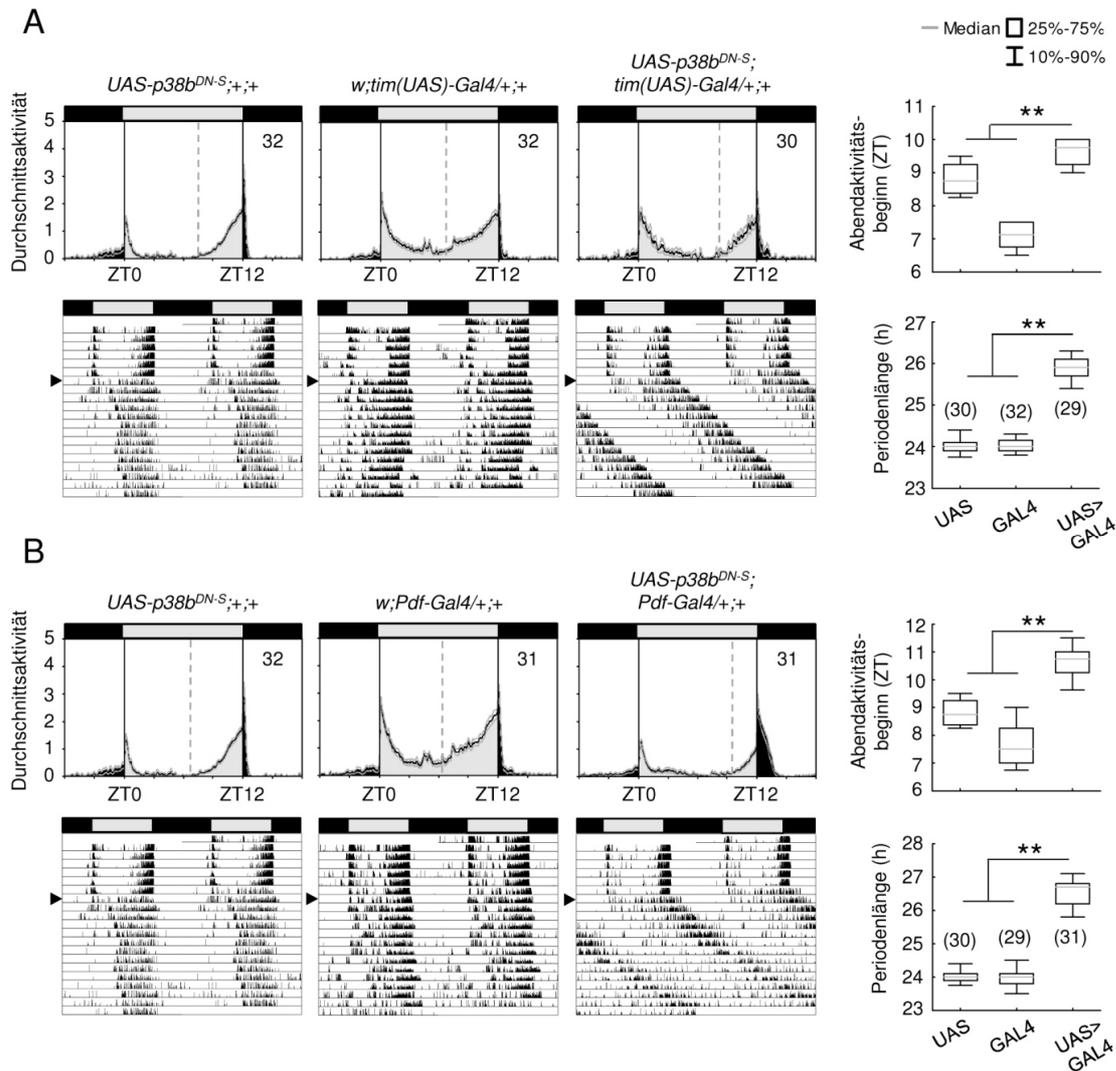


Abbildung 24: Laufaktivitätsrhythmen von $p38b^{DN-S}$ -Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.

Die Expression einer dominant-negativen Form von p38b ($p38b^{DN-S}$) sowohl in allen Uhrneuronen ($UAS-p38b^{DN-S}; tim(UAS)-Gal4/+; +$; obere Reihe in A), als auch in einer Gruppe von Uhrneuronen, den PDF-positiven LN_v ($UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +$; obere Reihe in B) resultiert in einem bimodalen Durchschnittstag mit signifikant späterem Abendaktivitätsstart. Diese zeitliche Verzögerung der Abendaktivität geht einher mit einer signifikant verlängerten Freilaufperiode in DD in $UAS-p38b^{DN-S}; tim(UAS)-Gal4/+; +$ und $UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +$ Fliegen (untere Reihe in A) und $UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +$ Fliegen (untere Reihe in B). Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind durch ** gekennzeichnet, „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zu Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.3.2 Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit überexprimierten p38b Signalweg

Da der RNAi-vermittelte Knockdown von p38b MAPK, ebenso wie die Expression von enzymatisch inaktivem p38b (*UAS-p38b^{KD}* bzw. *UAS-p38b^{DN-S}*) im circadianen System zu verspäteter Abendaktivität in LD und zu längeren Freilaufperioden in DD führt, stellte sich die Frage welche möglichen Auswirkungen eine Expression von funktionalem, wildtypischem p38b (*UAS-p38b⁺*) in unterschiedlichen Uhrneuronengruppen nach sich zieht (Abb. 25). Überraschenderweise zeigen *UAS-p38b⁺; Pdf-Gal4/+; +* und *UAS-p38b⁺; tim(UAS)-Gal4/+; +*, entgegen allen Erwartungen keine gegenläufigen *p38b^{RNAi}*-Effekte (d.h. kurze Freilaufperioden) sondern ähnlich *p38b^{RNAi}*- und *p38b^{KD}*-Fliegen eine deutlich spätere Abendaktivität in LD (Abb. 25; Wilcoxon; $p < 0,001$) sowie signifikant längere Freilaufperioden DD (Abb. 25; Wilcoxon; $p < 0,001$; Tab. A4). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass ein optimaler Spiegel an p38b in der inneren Uhr vorhanden sein muss, um wildtypische Laufaktivität hervorzurufen.

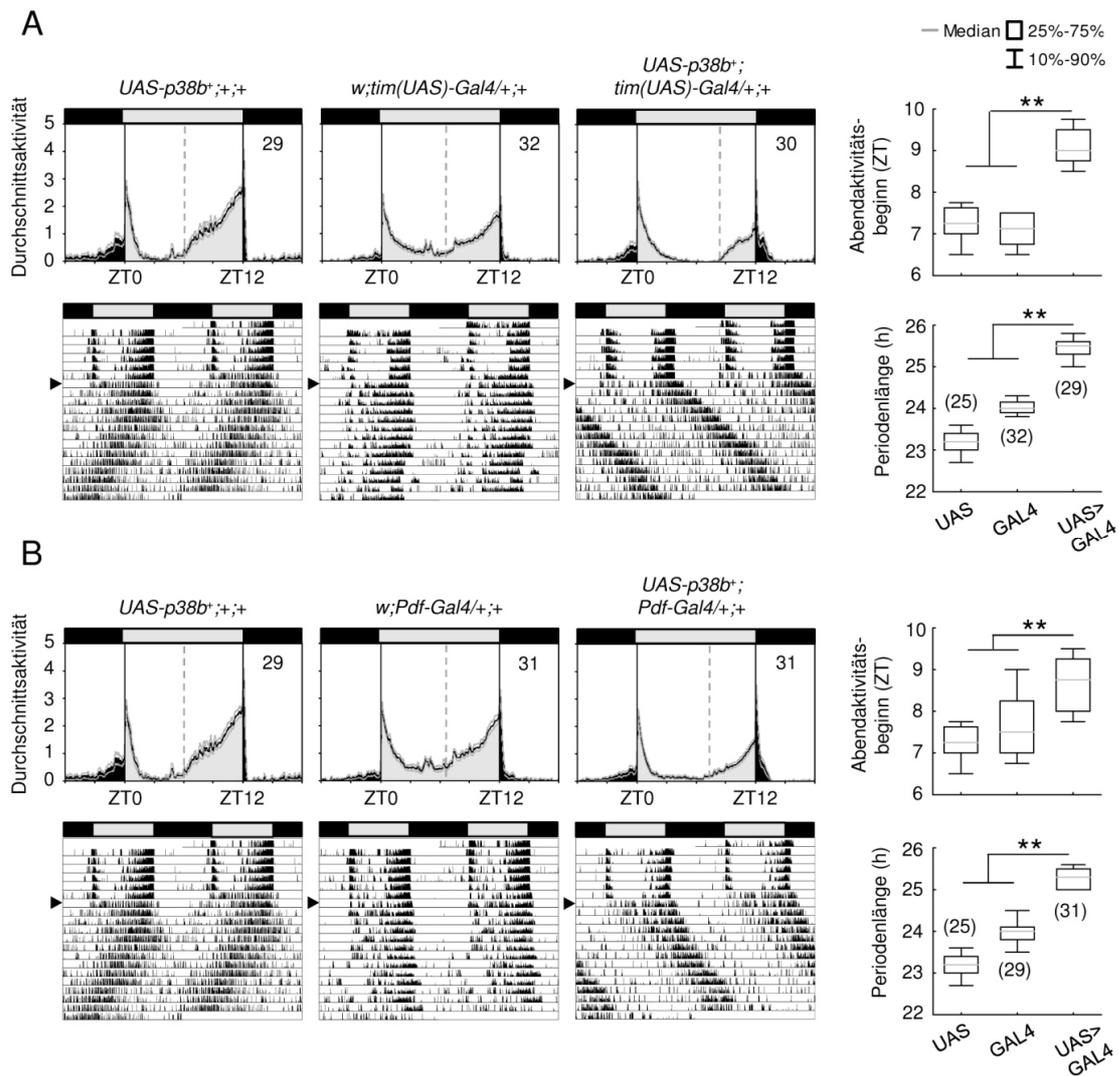


Abbildung 25: Laufaktivitätsrhythmen von p38b⁺-Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.

Die Überexpression von wildtypischem p38b (*p38b⁺*) in TIM-positiven Uhrneuronen (*UAS-p38b⁺; tim(UAS)-Gal4/+; +* in A) und PDF-positiven LN_v (*UAS-p38b⁺; Pdf-Gal4/+; +* in B) führt zu einem signifikant späteren Anstieg in der Abendaktivität in LD sowie zu einer verlängerten Freilaufperiode in DD. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind durch ** gekennzeichnet, „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zu Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.3.3 Aktivitätsrhythmik von Fliegen mit herunterreguliertem p38a Signalweg

Studien der vergangenen Jahre heben eine Rolle der p38 MAPK insbesondere bei der Stressantwort und der antimikrobiellen Immunität (Craig et al, 2004; Chen et al., 2010) hervor und messen in diesem Zusammenhang beiden Isoformen, p38a und p38b, eine entscheidende funktionelle Bedeutung bei. Konträr hierzu weisen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verhaltensaufzeichnungen bisher allein für p38b auf eine Rolle im circadianen System der Fliege hin. Die in den DN_{1a} von *w; p38b^{Δ45}* (Abb. 16) noch deutlich erkennbare p-p38-Färbung legt jedoch auch die Expression von p38a in den DN_{1a} nahe und lässt demzufolge die Frage aufkommen, ob neben p38b ebenso auch eine bestimmte Menge an p38a zur Generierung und Aufrechterhaltung circadianer Verhaltensrhythmen essentiell ist. Um dieser Hypothese nachzugehen wurde die Lokomotoraktivität von Fliegen untersucht, bei denen p38a entweder in allen Uhrneuronen (*dicer2; tim(UAS)-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+*), oder nur in den PDF-positiven Uhrneuronen (*dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+*) herunterreguliert ist. Überraschenderweise zieht eine Herunterregulierung von p38a im Vergleich zu p38b einen weitaus schwächeren Effekt auf das Laufverhalten nach sich. So zeigen weder *dicer2; tim(UAS)-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* noch *dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* eine signifikante Verschiebung der Abendaktivität in LD (Abb. 26). Zwar offenbaren χ^2 -Periodogrammanalysen für beide Experimentallinien eine signifikante Verlängerung der Freilaufperiode unter konstanten Bedingungen (Abb. 26; *dicer2; tim(UAS)-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+*: ANOVA; $p < 0,001$; *dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+*: Wilcoxon; $p < 0,05$ und $p < 0,001$; Tab A4), allerdings fällt diese im Gegensatz zu Fliegen mit manipuliertem p38b-Spiegel (Abb. 22-25; Tab A4) weit weniger drastisch aus. Um zu überprüfen, ob diese Diskrepanz möglicherweise auf einen uneffizienten Knockdown p38a zurückzuführen ist, wurde eine qPCR mit Kopfextrakten von *w; +; UAS-p38a^{RNAi}/da-Gal4* durchgeführt (Abb. A4A). Diese zeigt bei *w; +; UAS-p38a^{RNAi}/da-Gal4* eine im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollstämmen deutliche Reduktion an *p38a* mRNA auf unter 40% des Wildtypspiegels (ANOVA; $p < 0.001$) und bestätigt damit die Effektivität des *p38a^{RNAi}*-Konstrukts. Zusammen mit den leicht verlängerten, aber dennoch signifikant unterschiedlichen Freilaufrhythmen in *dicer2; tim(UAS)-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* und *dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* spricht dies eindeutig auch für eine Funktion von p38a in der inneren Uhr.

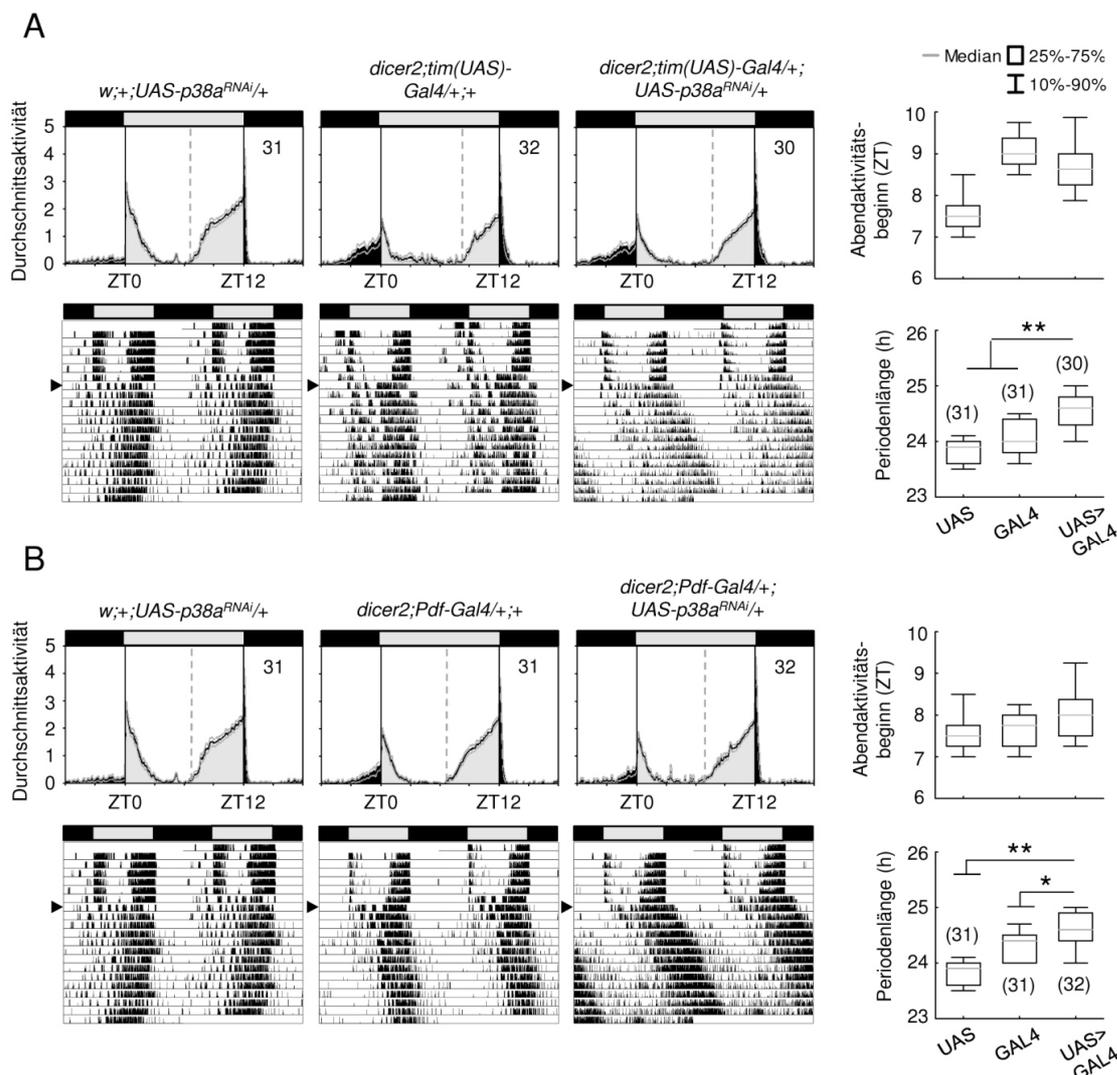


Abbildung 26: Laufaktivitätsrhythmen von *p38a^{RNAi}*-Fliegen und entsprechenden Kontrollstämmen.

Die Expression von *p38a^{RNAi}* in TIM-positiven Uhrneuronen (*dicer2; timUAS-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* in A) und PDF-positiven LN_v (*dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* in B) führt zwar zu signifikant verlängerten Freilaufperioden in DD, eine Verschiebung des Abendaktivitätsbeginns in LD tritt jedoch nicht auf. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch *, hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) durch ** gekennzeichnet, „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zu Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.3.4 Aktivitätsrhythmik von $p38a^{\Delta 1}$ und $p38b^{\Delta 45}$ Single-Knockoutmutanten

Nachdem eine Reduzierung von p38a ebenso wie von p38b in der inneren Uhr zu signifikanten Veränderungen im Freilaufverhalten führt, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob auch der komplette Verlust einer der beiden Isoformen einen vergleichbaren Phänotyp im rhythmischen Laufverhalten hervorruft. Dies war jedoch nicht der Fall. Zwar zeigt die Knockoutmutante $p38b^{\Delta 45}$ ($w; p38b^{\Delta 45}; +$) unter konstanten Bedingungen einen leicht erhöhten Prozentsatz arrhythmischer Fliegen, dies trifft jedoch in gleicher Weise auch auf $p38b^{pex41}$ ($w; p38b^{pex41}; +$), den dazugehörigen Kontrollstamm, zu und lässt eher auf einen Hintergrundeffekt, als auf eine Folge der Mutation schließen (Tab. A4). Darüber hinaus unterscheiden sich beide Fliegenlinien weder in ihrem LD-Verhalten noch in ihren Freilaufrythmen signifikant voneinander (Abb. 27A und Tab. A4). Zwar tritt in $p38a^{\Delta 1}$ ($w; +; p38a^{\Delta 1}$), einer $p38a$ Knockoutmutante, mehr arrhythmisches Verhalten als in w^{1118} auf (letzterer Stamm wurde aufgrund des Fehlens eines dazugehörigen „precise excision“-Stammes gewählt), in ihrer Freilaufperiode unterscheiden sich Knockoutmutante und Wildtyp jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 27B und Tab A4). Der höhere Prozentsatz arrhythmischer Fliegen könnte mit der bedeutenden Rolle von p38a bei der Stress- und Immunantwort (Craig et al, 2004; Chen et al., 2010), sowie bei Entzündungsreaktionen (Schieven, 2009; Han et al., 1998b) und der Regulation der Lebensdauer (Vrailas-Mortimer et al., 2011) zusammenhängen. Fehlt Fliegen p38a vollständig, könnten diese anfälliger gegenüber Krankheiten sein und aus diesem Grund verstärkt arrhythmisches Verhalten an den Tag legen. Fehlende Unterschiede im Freilaufverhalten wiederum, könnten darauf zurückzuführen sein, dass eine der beiden Isoformen unter bestimmten Bedingungen die jeweils andere funktionell ersetzen kann. So folgern Han et al. (1998b) auf Basis einer gleichartigen *in vivo* Aktivierung von p38a und p38b in Folge von Stress- und Entzündungs-induzierenden Stimuli, eine anteilige funktionelle Redundanz beider Isoformen. Dies könnte ebenso auf die Rolle von p38 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung circadianer Verhaltensrhythmen zutreffen.

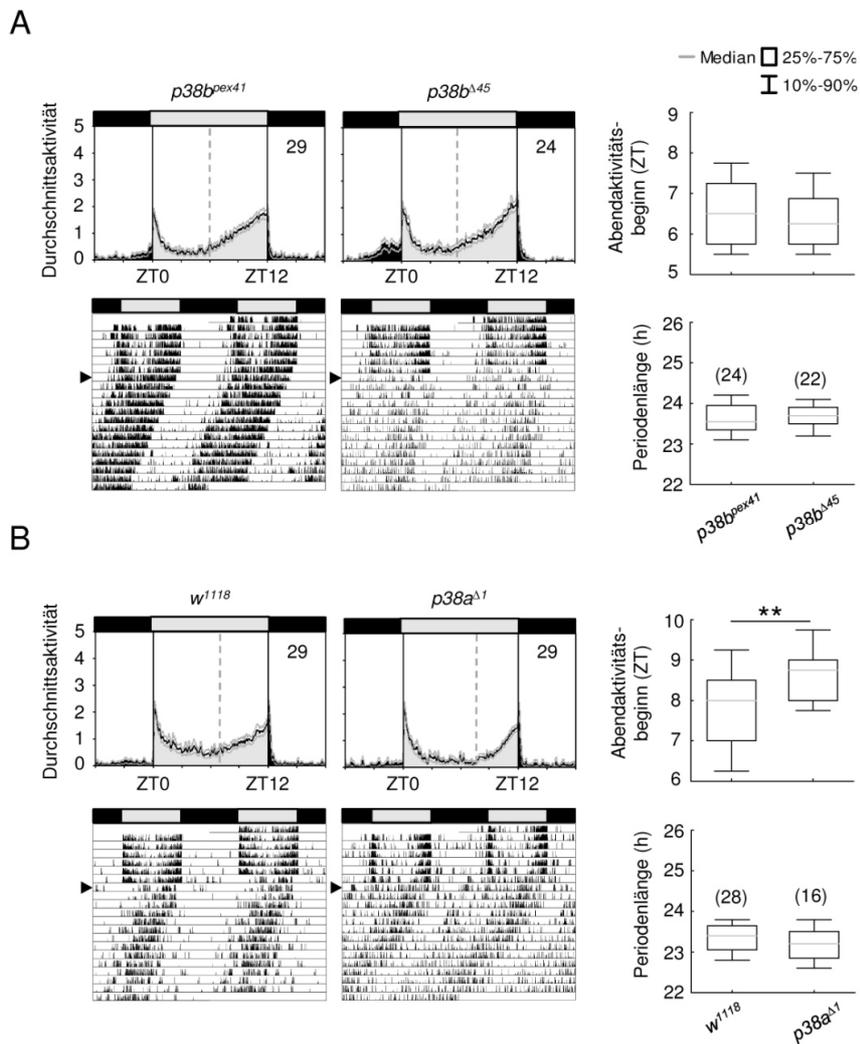


Abbildung 27: Laufaktivitätsrhythmen der Knockoutfliegen *p38b^{Δ45}* und *p38a^{Δ1}* im Vergleich mit dazugehöriger Kontrolle.

Im Gegensatz zu Fliegen mit reduziertem *p38a* bzw. *p38b* Spiegel in TIM- und PDF-positiven Neuronen zeigen *p38* Single-Knockoutmutanten, *p38b^{Δ45}* (A) oder *p38a^{Δ1}* (B), keine Abweichungen im Laufverhalten. Lediglich *p38a^{Δ1}* zeigt im Vergleich zu seiner Kontrolle einen leicht verspäteten Aktivitätsbeginn am Abend, dieser setzt sich jedoch in DD nicht in einer verlängerten Freilaufperiode fort. Als Kontrolle im Fall von *p38b^{Δ45}* diente *p38b^{pex41}*, ein Stamm mit exaktem Jump-out des remobilisierten p-Elements (im Folgenden auch als precise excision-Stamm bezeichnet). Da für *p38a^{Δ1}* solch eine Kontrolle nicht zur Verfügung stand, wurde als Referenz entsprechend des genetischen Hintergrunds von *p38a*, *w¹¹¹⁸*. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind durch ** gekennzeichnet, „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zu Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Ob diese Kompensation einer fehlenden Isoform zugleich eine übermäßige Expression der anderen bedeutet, sollten mRNA-Expressionsdaten von *p38b^{Δ45}* und *p38a^{Δ1}* Singleknockoutfliegen zeigen (Abb. 28). Sowohl *p38a* mRNA in *p38b^{Δ45}* als auch *p38b* mRNA in *p38a^{Δ1}* offenbaren ein wildtypisches Expressionslevel. Dies spricht eindeutig

dafür, dass im Falle einer funktionellen Redundanz beider Isoformen eine wildtypische Menge an p38a bzw p38b ausreichend ist, um circadiane Verhaltensrhythmen in Single-Knockoutmutanten zu generieren und aufrechtzuerhalten.

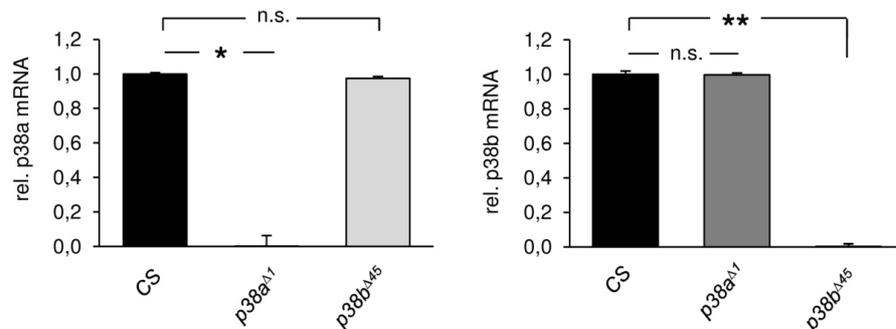


Abbildung 28: Relativer *p38a* und *p38b* mRNA Level in Kopffextrakten von *p38a*^{Δ1}, *p38b*^{Δ45} und CS.

Zur Untersuchung der *p38* Transkription in Single-Knockoutfliegen, wurden mittels quantitativer real-time PCR *p38a* und *p38b* mRNA Level zu ZT21 bestimmt, zum Haushaltsgen *α-Tubulin* relativiert und im Anschluss zur Wildtypmenge normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler von jeweils drei Ansätzen mit je fünf Köpfen. Expressionsdaten von *p38a*^{Δ1} und *p38b*^{Δ45} bestätigen den *p38a* bzw. *p38b* Knockoutgenotyp und liefern zusätzlich keine Hinweise auf eine mögliche kompensatorische, verstärkte Expression der jeweils anderen Isoform. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch *, hoch signifikante ($p < 0,001$) durch ** gekennzeichnet, „n.s.“ geben nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wieder (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.3.5 Aktivitätsrhythmik von *p38b*^{Δ45}; *p38a*^{Δ1} Doppel-Knockoutmutanten

Sollte die Hypothese der funktionellen Redundanz beider Isoformen wirklich zutreffen, so sollten *p38b*^{Δ45}; *p38a*^{Δ1} Doppel-Knockoutfliegen verlängerte Freilaufperioden unter konstanten Bedingungen zeigen. Allerdings waren Fliegen mit einer homozygoten Kombination beider Nullallele, ähnlich Beobachtungen im Rahmen früherer Studien (Craig et al., 2004; Ha et al., 2009; Park et al., 2003; Shinzawa et al., 2009; Cully et al., 2009; Vrailas-Mortimer et al., 2011), nicht überlebensfähig. Selbst die Zugabe von 500 µg/mL Ampicillin und 0,5% Propionsäure zum *Drosophila*-Standardmedium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1) führte, entgegen Berichten von Chen et al. (2010), zu keiner Erhöhung der Überlebensrate von *p38b*^{Δ45}; *p38a*^{Δ1}. So starben alle Tiere bereits im Laufe des Larven- oder Puppenstadiums (Tab. A4) und machten somit eine Aufzeichnung der Laufaktivität unmöglich. Lediglich heterozygote Kombinationen der Nullallele *p38a*^{Δ1} und *p38b*^{Δ45} (in *p38b*^{Δ45}/+; *p38a*^{Δ1}/+, *p38b*^{Δ45}/+; *p38a*^{Δ1} und *p38b*^{Δ45}; *p38a*^{Δ1}/+) hatten wildtypische Überlebensraten zur Folge, Auffälligkeiten im Verhaltensrhythmus traten in diesen Fällen jedoch nicht auf (Abb. 29 und Tab. A4).

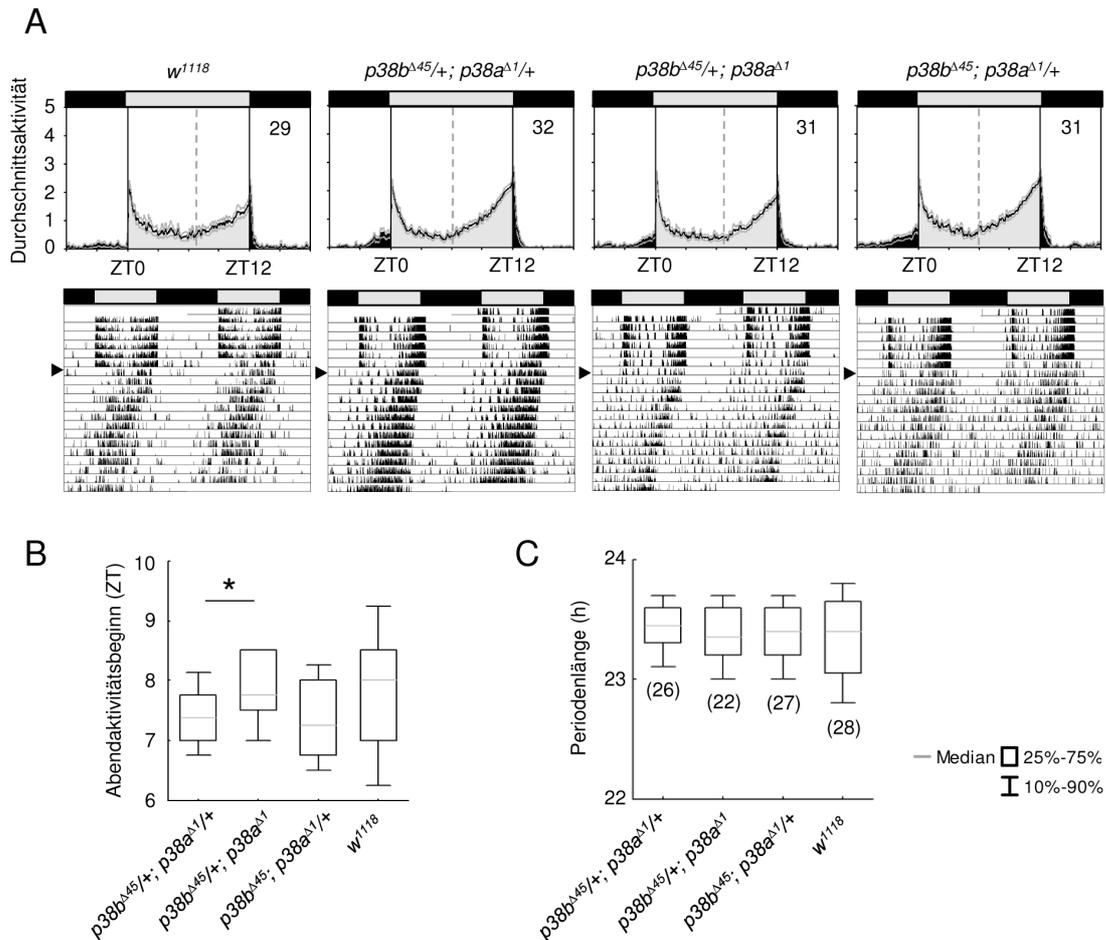


Abbildung 29: Laufaktivitätsrhythmen der heterozygoter Doppel-Knockoutfliegen im Vergleich mit *w¹¹¹⁸*.

Durchschnittstage und repräsentative Aktogramme der Genotypen *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1/+}*, *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1}* und *p38b^{Δ45}; p38a^{Δ1/+}* offenbaren keine signifikanten Verhaltensunterschiede zwischen heterozygoten Doppelknockfliegen und *w¹¹¹⁸* (A). So sind weder Verschiebungen der Abendaktivität in LD (B) noch verlängerte Freilaufperioden in DD (C) innerhalb der Genotypen auszumachen. Lediglich *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1}* Fliegen zeigen im Vergleich zu *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1/+}* zwar einen signifikant verzögerten Abendaktivitätsstart (Wilcoxon; $p < 0,05$), dieser ist jedoch aufgrund des Fehlens von Unterschieden in der Periodenlänge möglicherweise als reines Artefakt oder als phänotypische Variabilität zu interpretieren. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch *, nicht signifikante durch „n.s.“ gekennzeichnet, „n“ gibt die Anzahl der für die Auswertung herangezogenen Tiere wieder. Weitere Details zur Abbildungslegende, Aktivitätsaufzeichnung und Datenauswertung sind der Abbildung 22 zu entnehmen.

Mit Ausnahme von *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1}* Fliegen, welche im Vergleich zu *p38b^{Δ45/+}; p38a^{Δ1/+}* gegen Abend eine leicht verspätete Laufaktivität zeigen (Wilcoxon; $p < 0,05$), unterscheiden sich die Stämme in ihren Aktivitätsphasen ansonsten nicht signifikant von *w¹¹¹⁸*. Ebenso war unter DD-Bedingungen keine Verlängerung der Freilaufperiode erkennbar. Eine mögliche Erklärung für fehlende Phänotypen bei den heterozygoten Doppelknockoutstämmen liefern mRNA-Expressionsdaten der entsprechenden

Stämme. So hat das heterozygote Vorliegen eines Nullallels ($p38b^{\Delta45}/+$ bzw. $p38a^{\Delta1}/+$) kaum Auswirkungen auf die Expressionsrate des entsprechenden Gens und unterscheidet sich im Wesentlichen nicht vom Wildtyp (Abb. 30).

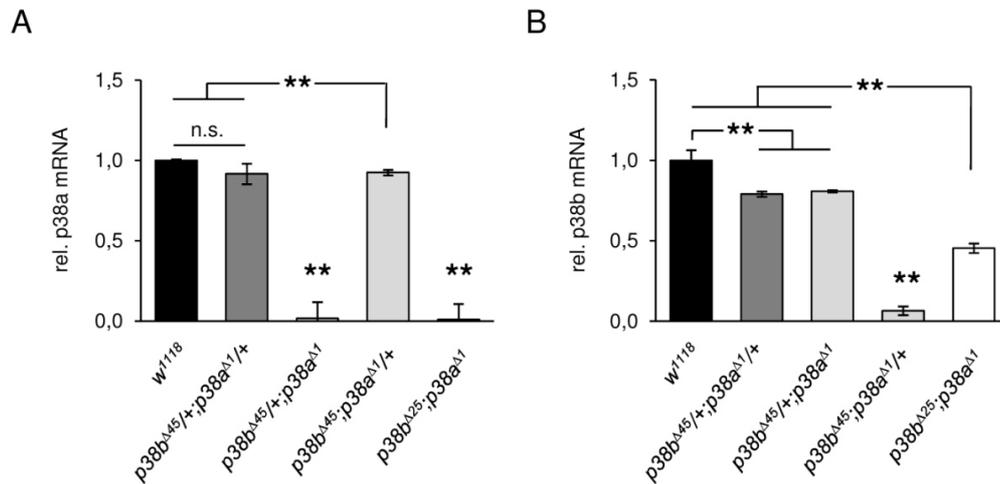


Abbildung 30: Relativer $p38a$ und $p38b$ mRNA Level in Kopfextrakten von heterozygoten Doppel-Knockoutfliegen und w^{1118} .

Zur Untersuchung der $p38$ Transkription in $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}/+$, $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}$, $p38b^{\Delta45}; p38a^{\Delta1}/+$ sowie in $p38b^{\Delta25}; p38a^{\Delta1}$ in Vergleich zu w^{1118} , wurden $p38a$ (A) und $p38b$ (B) mRNA Level mittels quantitativer real-time PCR zu ZT21 bestimmt, zum Haushaltsgen α -Tubulin relativiert und im Anschluss zur Wildtypmenge normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler von jeweils drei Ansätzen mit je fünf Köpfen. Die Expressionsdaten von $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}/+$, $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}$ und $p38b^{\Delta45}; p38a^{\Delta1}/+$ bestätigen den vollständigen Verlust einer Isoform bei Vorliegen eines homozygoten Nullallels. Zudem zeigen sie auch eine geringfügige, aber dennoch signifikante Reduktion der mRNA bei Vorliegen eines heterozygoten Nullallels. Liegt hingegen das hypomorphe $p38b$ Allel $p38b^{\Delta25}$ im Genom homozygot vor, so führt dies zu einer drastischen Reduktion der $p38b$ mRNA auf bis zu 50% des Wildtypspiegels. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) werden durch **, nicht signifikante ($p > 0,05$) durch „n.s.“ wiedergegeben (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Zwar zeigen $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}/+$, $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}$ (beide Abb. 30B) und $p38b^{\Delta45}; p38a^{\Delta1}/+$ (Abb. 30A) Fliegen in geringem Maße signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zu w^{1118} , diese Reduktion der mRNA-Menge scheint jedoch nicht groß genug um Abweichungen im circadianen Laufverhalten nach sich zu ziehen (Abb. 29). Ein gegensätzliches Bild ergibt sich in Fliegen mit hypomorphem $p38b$ Allel im $p38a^{\Delta1}$ Knockouthintergrund ($p38b^{\Delta25}; p38a^{\Delta1}$). Diese offenbaren neben dem vollständigen Fehlen von $p38a$ eine Reduktion ihrer $p38b$ mRNA-Menge auf bis zu 50% des Wildtyplevels (Abb. 30) und infolgedessen lange Freilaufperioden unter konstanten Bedingungen (Abb. 31A). Rund 94% der Versuchstiere starben binnen 1-3 Tage nach

Aufzeichnungsstart. In zwei Fällen überlebten die Tiere jedoch bis Tag 6 in DD und zeigten sichtbar lange Freilauferperioden.

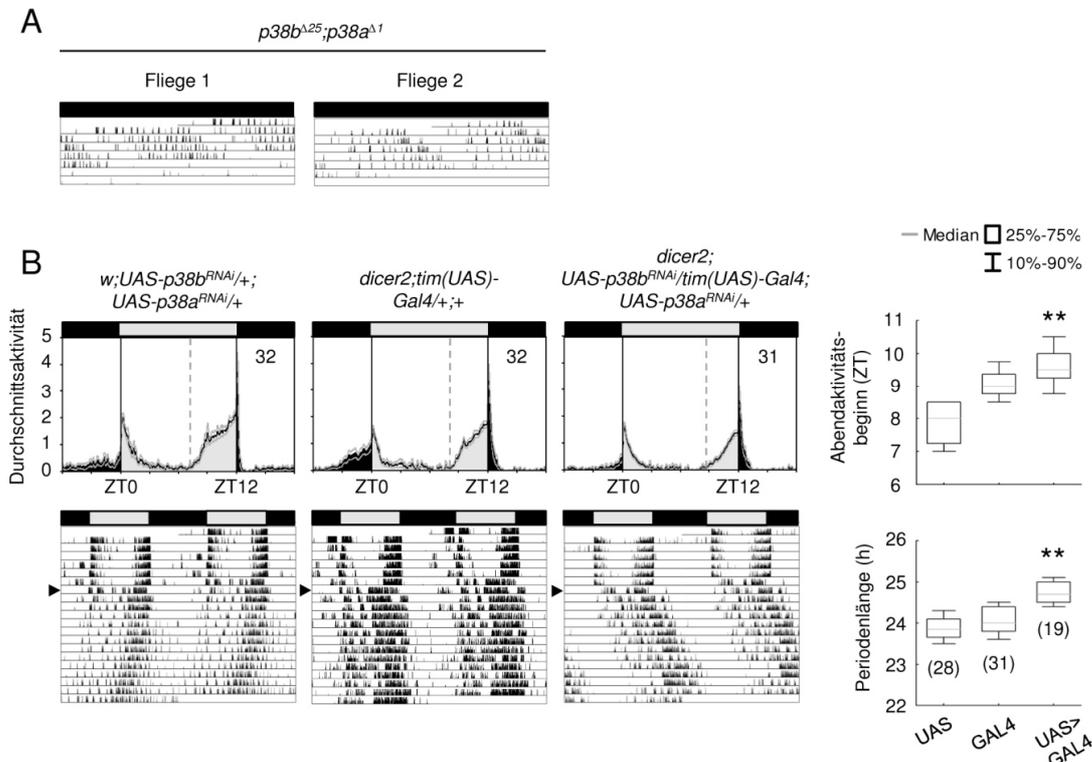


Abbildung 31: Laufaktivitätsrhythmen von $p38b^{\Delta25}$; $p38a^{\Delta1}$ und $dicer2$; $UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4$; $UAS-p38a^{RNAi}/+$ mit entsprechender Kontrolle.

Gezeigt sind die Aktivitätsdaten von zwei $p38b^{\Delta25}$; $p38a^{\Delta1}$ Fliegen (A) in DD sowie von $dicer2$; $UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4$; $UAS-p38a^{RNAi}/+$ mit entsprechender Kontrolle (B) in LD und DD. $p38b^{\Delta25}$; $p38a^{\Delta1}$ lassen trotz des kurzen Aufzeichnungszeitraums von nur 6 Tagen DD, deutlich lange Freilauferperioden erkennen. Ebenso führt der simultante Knockdown von $p38b$ und $p38a$ in TIM-positiven Uhrneuronen zu einem signifikant späteren Start der Abendaktivität in LD sowie langen Freilaufrhythmen in DD und bekräftigt damit die Bedeutsamkeit beider Isoformen für das circadiane System. Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate von $p38b^{\Delta25}$; $p38a^{\Delta1}$, wurden hypomorphe Doppel-Knockoutfliegen bereits während ihres Puppenstadiums für 5-6 Tage an einen LD 12:12 entrainiert und sofort nach dem Schlüpfen in das Verhaltens-Set-up eingesetzt und in DD aufgezeichnet. Die Aufzeichnung von $dicer2$; $UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4$; $UAS-p38a^{RNAi}/+$ und der dazugehörigen Kontrollen erfolgte hingegen nach Standardprotokoll wie in Abb. 22 beschrieben (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Auch wenn eine statistische Auswertung im Falle von $p38b^{\Delta25}$; $p38a^{\Delta1}$ aufgrund der hohen Sterblichkeit und Kürze des Aufzeichnungszeitraums nicht möglich war, bestätigen die DD-Daten eindrucksvoll den Stellenwert von $p38a$ und $p38b$ im circadianen System. Verhaltensaufzeichnungen von $dicer2$; $UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4$; $UAS-p38a^{RNAi}/+$ Fliegen in LD und DD unterstützen zusätzlich diese Hypothese. Eine simultane Reduktion beider Isoformen in allen Uhrneuronen führte zu einem

signifikant späteren Abendaktivitätsbeginn in LD-Zyklen, sowie zu um bis zu 1h längeren Freilaufperioden unter Dauerdunkel-Bedingungen (Abb. 31B; Wilcoxon; $p < 0,001$). Demnach ist weder ausreichend p38a noch p38b in der inneren Uhr vorhanden um das Fortbestehen 24-stündiger Laufrhythmen zu gewährleisten.

4.4 Funktion und Bedeutung von p38 für den molekularen Mechanismus

Nachdem Antikörperfärbungen und Aktivitätsaufzeichnungen sowohl die Expression der p38 MAPK in den Uhrneuronen, als auch deren Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung von 24-Stunden-Aktivitätsrhythmen deutlich belegen, stellt sich die Frage inwiefern die Stress-aktivierte Proteinkinase die innere Uhr auf molekularer Ebene regulatorisch beeinflusst. Alle bis zum jetzigen Zeitpunkt im Uhrnetzwerk der Fliege identifizierte Kinasen, so auch DBT (Kloss et al., 1998; Bao et al., 2001; Cyran et al., 2005), SGG (Ko et al., 2010), CK2 (Lin et al., 2002 und 2005; Akten et al., 2003) und NEMO (Ko et al., 2010; Chiu et al., 2011), stehen in engem Zusammenhang mit Uhrproteinphosphorylierungen und fungieren als Justierer innerhalb des molekularen Uhrwerks. Durch Phosphorylierung von PER und TIM, sowie von deren Interaktionspartnern, regulieren sie den nukleären Transport, den Abbau sowie die Komplexbildungen der Uhrproteine und führen so zur Feinjustierung der Translations-Transkriptions-Rückkopplungsschleife auf einen 24 Stunden-Rhythmus. Mit dem Ziel auch für p38 eine ähnliche regulatorische Rolle aufzudecken, wurden in den folgenden Abschnitten nukleäre PER und TIM Spiegel in den Zellkernen der LN_v unter LD und DD untersucht. Zusätzlich wurden Schwankungen im Phosphorylierungsmuster von PER in p38 Mutanten ausgewertet. Abschließend wurde unter Anwendung von *in vitro* Kinasenassays der Focus auf potentielle p38-Phosphorylierungsstellen des PER-Proteins gelegt.

4.4.1 Nukleäre Translokation der Uhrproteine PER und TIM in Fliegen mit manipulierten p38b Spiegel

Verspätete Abendaktivität und lange Freilaufperioden werden oft mit einer verzögerten Translokation der Uhrproteine PER und TIM in den Zellkern in Verbindung gebracht. Dieses Ereignis des molekularen Zyklus wird zum einen über Phosphorylierung des

Uhrproteins PER durch DBT, Prolin-gerichtete Kinasen und CK2 (Bao et al., 2001; Lin et al., 2002 und 2005; Akten et al., 2003; Cyran et al., 2005; Ko et al., 2010) und zum anderen durch Phosphorylierung von TIM durch SGG gesteuert (Martinek et al., 2001). Um zu überprüfen, ob der Zeitpunkt des Kerneintritts beider Uhrproteine zusätzlich auch durch p38 MAPK reguliert wird, wurden *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* Fliegen und die entsprechende UAS-Kontrolle zunächst 6 Tage auf einen LD 12:12 synchronisiert, in DD überführt und am 4 Tag DD, exakt 96 Stunden nach letztem „Licht-an“ (ZT1) alle 4 Stunden abgesammelt und fixiert. Zeitgleich wurde in einem zweiten, parallelen Set-up der Freilaufrythmus des Experimental- sowie des Kontrollstamms aufgezeichnet, pro Genotyp die durchschnittliche Periodenlänge bestimmt und der Absammelzeitpunkt des Färbeexperiments wie in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben, in CT-Zeitpunkte umgerechnet. Die Messung sowie die Auswertung des nukleären Färbesignals der s-LN_v und l-LN_v erfolgte nach der Methode von Yoshii et al. (2008). In Übereinstimmung mit den Aktivitätsdaten in DD besteht in Fliegen mit reduziertem p38b Spiegel in den PDF-positiven Uhrneuronen auch im Freilauf das circadiane Uhrproteincycling weiter fort und zeigt darüber hinaus eine deutliche Phasenverschiebung gegenüber der Kontrolle (Abb. 32). Zwar steht diese prinzipiell in Einklang mit der langen Freilaufperiode der Tiere, spiegelt jedoch andererseits nicht die gemessene Periodendifferenz von 1,4 h wider (Tab. A4). Besonders deutlich wird diese Diskrepanz zwischen Perioden- und Phasenunterschied bei Betrachtung des nukleären Uhrprotein-Cyclings von PER und TIM unter Freilaufbedingungen in den s-LN_v, den eigentlichen Hauptschrittmacherneuronen zur Kontrolle circadianer Laufaktivität. So zeigen Kontrolltiere ihr Maximum an nukleärem PER am 4. Tag DD gegen CT4. *Dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* Fliegen hingegen weisen drei Maxima an nukleärem PER auf: zwei kleinere zu CT6 und CT21 sowie ein prominentes Maximum zu CT14 (rote Pfeile und rote Kurven in Abb. 32A). Angesichts eines Freilaufperiodenunterschieds von 1,4 h, wäre am 4. Tag DD jedoch eigentlich eine Phasendifferenz von circa 5,6 h im Uhrproteincycling zu erwarten, ein Unterschied zwischen Kontrolle und Experimentalstamm der bei Vergleich zu keinem der drei Maxima auftritt. Ähnlich verhält sich das circadiane TIM-Cycling in den Zellkernen der s-LN_v. Auch hier beträgt mit CT1 und CT8 im Falle der UAS-Kontrolle und CT21 bei *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* die Differenz zwischen den Maxima beider Stämme stets mehr als 5,6 h (blaue Pfeile und blaue Kurven in Abb. 32A).

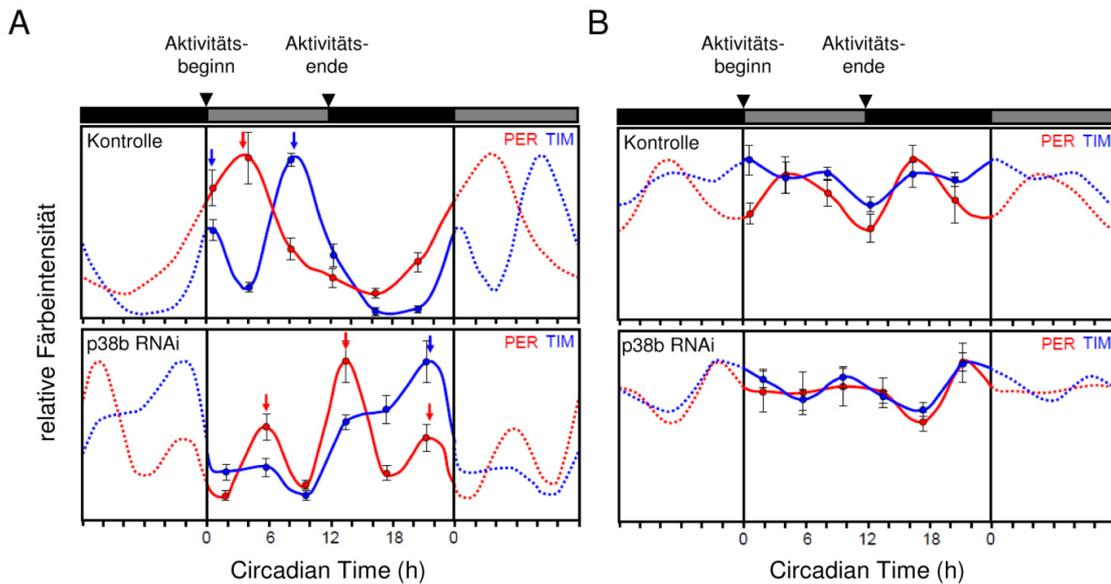


Abbildung 32: Nukleäre PER und TIM Proteinspiegel in s-LN_v und l-LN_v von *dicer2*; *UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4*; + sowie zugehöriger UAS-Kontrolle in DD.

Gezeigt sind Doppelplot-Kurven von nukleärem PER (rot) und TIM (blau) in den s-LN_v (A) und l-LN_v (B) von Fliegen mit herunterreguliertem p38b in den PDF-positiven Uhrneuronen (*dicer2*; *UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4*; +; hier p38b RNAi; untere Graphen in A und B) an Tag 4 in DD. *UAS-p38b^{RNAi}/+* dient als entsprechende Kontrolle (obere Graphen in A und B). Färberegebnisse von *dicer2*; *UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4*; + reflektieren DD-Verhaltensdaten und offenbaren ein Fortbestehen des molekularen Uhrproteincyclings auch unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen - im Vergleich zum Kontrollstamm jedoch mit deutlich verschobener Phase. Eine detaillierte Beschreibungen aller Proteinkurven ist im Fließtext wiedergegeben. Subjektiver Tag (graue Balken) und subjektive Nacht (schwarze Balken) sind durch grau-schwarze Lichtbalken oberhalb der Graphen dargestellt und werden durch Aktivitätsstart (=CT0) und Aktivitätseende (=CT12) der Fliegen definiert. Rote und blaue Pfeile markieren Maxima von nukleärem PER bzw. TIM. Gepunktete rote und blaue Liniedeuten potentielle Uhrproteinspiegel 12 Stunden und nach der Messung an (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Im Gegensatz zu den s-LN_v und in Übereinstimmung mit früheren Studien (Yang und Sehgal, 2001; Shafer et al., 2002) zeigen die l-LN_v von Kontrollfliegen und Fliegen mit herunterreguliertem p38b keine circadianen Schwankungen von nukleärem PER und TIM (Abb. 32B). Vielmehr scheint der nukleare Spiegel beider Uhrproteine in einem ultradianen Rhythmus zu fluktuieren. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass selbst wenn der zu erwartende Phasenunterschied im Proteincycling zwischen *dicer2*; *UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4*; + Fliegen und Kontrollstamm nicht auftritt, das molekulare Uhrproteincycling in Zellkernen der s-LN_v auch bei reduziertem p38b Spiegel in den LN_v weiter fortbesteht. In Übereinstimmung mit den Verhaltensdaten zeigt es zudem eine deutliche Phaseverschiebung, eine Tatsache die auf einen verzögerten Kerneintritt beider Uhrproteine schließen lässt. Darüber hinaus ist, trotz 50% Arrhythmizität in *dicer2*; *UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4*; +, kein Amplitudenunterschied im PER- und TIM-Cycling

zu erkennen. Diese Tatsache legt nahe, dass der *p38b*-Knockdown ausschließlich die Geschwindigkeit des molekularen Cyclings beeinflusst, nicht aber die Robustheit. Der hohe Prozentsatz arrhythmischer Fliegen wäre demnach auf potentielle RNAi „off-target“ Effekte von *p38b* und nicht auf dessen Einfluss auf die molekulare Uhr zurückzuführen. Eine Erklärung für die fehlende Übereinstimmung von Perioden- und Phasenunterschied könnte möglicherweise die angewandte Messmethode nach Yoshii et al. (2008) liefern. So wurde zur Bestimmung des nukleären Färbesignals lediglich ein 5 Pixel großer Messbereich an der hellsten Stelle im Zellkern gemessen, nicht aber der gesamte Nukleus. Im Falle einer heterogenen Proteinverteilung innerhalb des Zellkerns könnte dies zu fehlerhaften Messwerten führen und so möglicherweise das Auftreten mehrerer Maxima sowie die fehlende 5,6 h-Phasendifferenz zwischen den Genotypen erklären. Ebenso erlaubt die oben genannte Methode lediglich Aussagen über Schwankungen in der nukleären Proteinmenge, nicht aber über eine nukleäre Translokation dieser Proteine. Um potentielle Auswirkungen reduzierter *p38b*-Spiegel im circadianen System auf den Kerneintritt von PER genauer beurteilen zu können, wurden deshalb Doppelfärbungen mit anti-PER und anti-PDF durchgeführt. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment wurde diesmal jedoch das PER-Färbesignal des gesamten Zellkerns gemessen und in Relation zum Gesamtfärbesignal der Zelle gesetzt (siehe Abschnitt 3.5.2). Als Experimentalstamm wurde *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* gewählt, eine Fliegenlinie, die eine dominant negative Form von *p38b* in den LN_v exprimiert. Fliegen dieses Genotyps zeigen bereits in LD im Vergleich zu ihren Kontrollen eine deutliche Verschiebung ihrer Abendaktivität (Abb. 24) und lassen demzufolge auch unter synchronisierten Bedingungen einen sichtbaren Effekt von *p38b* auf den molekularen Zyklus erwarten. Um auch kleinere Effekte im Uhrproteincycling zu detektieren, erfolgte die Auswertung des Färbesignals zudem in 1 h-Intervallen. Gemäß den Erwartungen zeigen *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* Fliegen im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle (*UAS-p38b^{DN-S}; +; +*) ein signifikant späteres Maximum an nukleärem PER (Abb. 33). Dieser verspätete Kerneintritt von PER tritt sowohl in den s-LN_v, als auch in den l-LN_v von *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* auf und korreliert zudem mit der verspäteten Abendaktivität in diesen Tieren. Abgesehen davon unterscheiden sich Proteinkurven von Mutante und Kontrolle ansonsten nicht voneinander und bestätigen damit den Anfangsverdacht aus den DD-Daten, dass reduzierte *p38b* Spiegel nur Auswirkungen auf die Geschwindigkeit, nicht aber auf die Stabilität und Robustheit der molekularen Uhr haben. Zusätzlich fällt auf, dass im Gegensatz zum Vorversuch (Abb.

32) in LD keine weiteren „Nebenmaxima“ im PER-Proteincycling auftreten. Zwar wurden beide Färbeversuche unter unterschiedlichen Bedingungen (LD vs. DD) durchgeführt, dennoch sind die auftretenden Nebenmaxima mit großer Wahrscheinlichkeit eher auf die ungeeigneten Messmethode zurückzuführen.

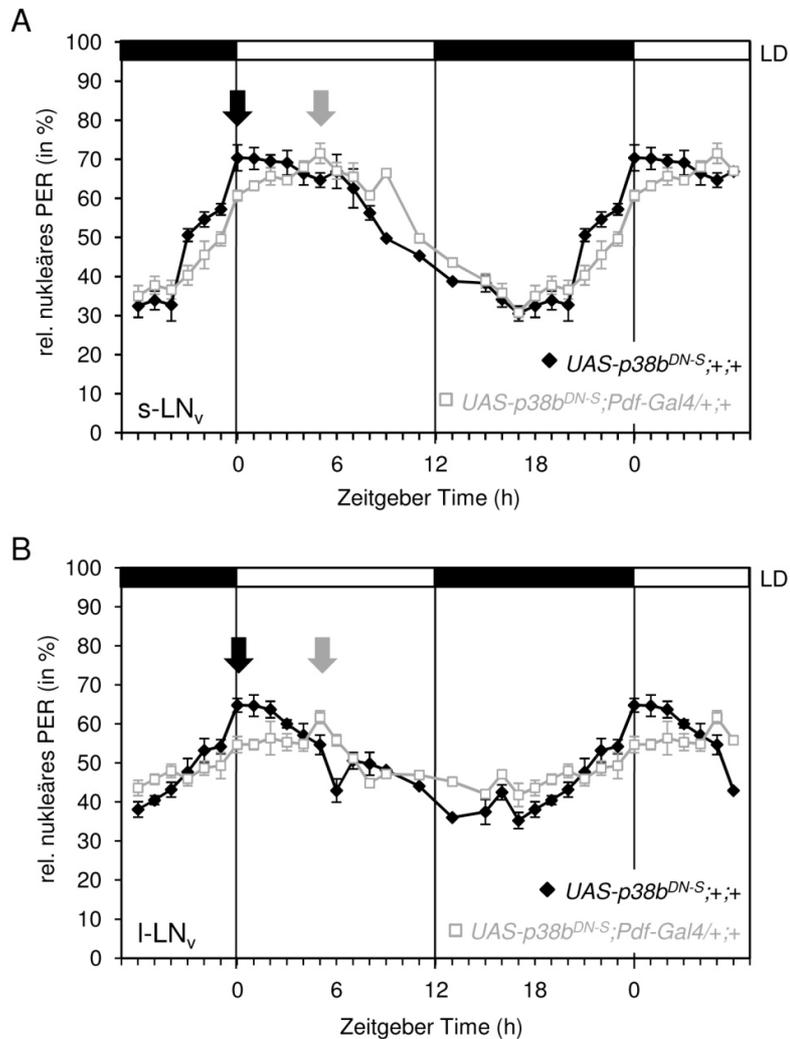


Abbildung 33: Relative nukleäre PER Proteinspiegel in den s-LN_v und I-LN_v von *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* sowie zugehöriger UAS-Kontrolle in LD12:12.

A und B zeigen Schwankungen von nukleärem PER in den s-LN_v (A) und I-LN_v (B) von *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* (graue Kurve) und *UAS-p38b^{DN-S}; +; +* (schwarze Kurve) im Tagesverlauf. Gemäß der verspäteten Abendaktivität in LD-Bedingungen offenbaren *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* im Vergleich zur Kontrolle in beiden LN_v-Gruppen ein sichtbar späteres Maximum in nukleären PER und lassen auf einen verspäteten Kerneintritt des Uhrproteins schließen. Die Auswertung der Färbeergebnisse erfolgte im 1 h-Intervall. Nukleäre Färbeintensitäten der s-LN_v bzw. I-LN_v von 10 Gehirnen pro ZT und Genotyp wurden gemessen zur Gesamtproteinmenge der s-LN_v (bzw. I-LN_v) relativiert und innerhalb des Genotyps gemittelt. Für eine detailliertere Beschreibung der Auswertmethode siehe Abschnitt 3.5.2. Lichtbalken über den Graphen repräsentieren das Lichtregime, schwarze und graue Pfeile die jeweiligen Maxima (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

4.4.2 Auswirkungen reduzierter p38b Spiegel auf das circadiane Phosphorylierungsmuster von PER

Ein Großteil der Komponenten des circadianen System reguliert Phosphorylierung und Stabilität von PER und entscheidet damit über Kerneintritt und Abbau des Uhrproteins. Aufgrunddessen kommt schnell die Frage auf, ob p38 ebenfalls den Phosphorylierungsgrad von PER beeinflusst und wenn ja, auf welche Weise es die Geschwindigkeit und Effizienz des Kerneintritts des Uhrproteins reguliert. Eine Möglichkeit wäre die direkte Phosphorylierung von PER durch p38. Ebenso könnte p38 aber auch bereits bekannte Uhrkinasen oder -Phosphatasen phosphorylieren und (de)aktivieren und damit den Phosphorylierungsgrad des Uhrproteins indirekt steuern. So belegen Studien (Sayed et al., 2000; Kato et al., 2003) die Phosphorylierung und Aktivierung von CK2, einem wichtigen Regulator für den Kernimport des PER-TIM Heterodimers (Lin et al., 2002; Akten et al., 2003), durch p38 und eröffnen damit die Möglichkeit einer p38-vermittelten Verzögerung der molekularen Rückkopplungsschleife via CK2 sowie einer verspäteten nukleären Translokation. Alternativ oder zusätzlich könnte p38 ebenso mittels Phosphatasen interagieren und den Phosphorylierungsgrad der Uhrproteine reduzieren. So wird in Säuger-Fibroblasten die Aktivierung von Proteinphosphatase 2A (PP2A), einer Phosphatase welche PER dephosphoryliert, stabilisiert und infolgedessen die Wanderung in den Zellkern fördert (Sathyanarayanan et al., 2004), nachweislich durch p38 (Westermarck et al., 2001) und CK2 (Hériché et al.; 1997) induziert. Als Folge verminderter PP2A Aktivität zeigen Tiere zudem lange Freilaufperioden, denselben Phänotyp der nach Manipulation der p38 Spiegel im circadianen System zu beobachten ist.

Um unabhängig von der Art der Regulation zunächst einen grundlegenden Einfluss von p38b auf die Phosphorylierung von PER nachzuweisen, wurden Westernblots von Kopfextrakten unter LD 12:12 Bedingungen durchgeführt. Studien der vergangenen Jahre (Edery et al., 1994; Price et al., 1998; Akten et al., 2003; Lin et al., 2005) bestätigen die ausreichende Sensitivität dieses Verfahrens zur Detektion von PER-Phosphorylierungsunterschieden im Tagesverlauf. So führen zusätzliche Phosphatgruppen zu einer Zunahme der Molekülmasse und damit zu einer Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im elektrischen Feld, was letztlich im Fall von PER zu einer sich verbreiternden, nach oben wachsenden Bande führt. Auf Grund der Tatsache, dass Homogenate von Köpfen hauptsächlich das PER-Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Komplexaugen widerspiegeln (PER-

Cycling in 150 PER-exprimierenden Uhrneuronen ist unwesentlich im Vergleich zu nahe 1600 PER-exprimierenden Photorezeptorzellen), wurde mit *UAS-p38b^{DN-S}*, *cry-Gal4/+*; + außerdem ein Fliegenstamm gewählt, welcher das dominant-negative p38b Transgen (*UAS-p38b^{DN-S}*) neben allen Uhrneuronen zusätzlich auch in Photorezeptorzellen exprimiert. Gemäß den Erwartungen, zeigen diese Fliegen ähnlich dem Wildtyp ein circadianes PER-Cycling im Tagesverlauf, jedoch ein zu geringerem Maße phosphoryliertes PER als der zugehörige Kontrollstamm *UAS-p38b^{DN-S}*, +; + (Abb. 34A).

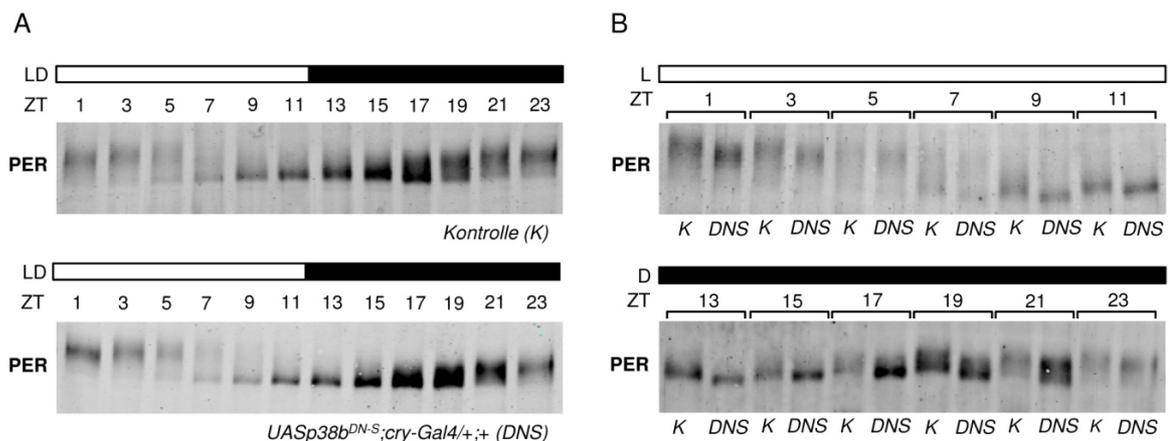


Abbildung 34: Westernblots mit Kopfextrakten von *UAS-p38b^{DN-S}*, *cry-Gal4/+*; + und *UAS-p38b^{DN-S}*, +; + in LD 12:12.

Die Proteinextrakte von *UAS-p38b^{DN-S}*, *cry-Gal4/+*; + (DNS) und *UAS-p38b^{DN-S}*, +; + (K) wurden zum einem pro Genotyp im Tagesverlauf (A), als auch für jeden Zeitpunkt alternierend (B) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Detektion von PER erfolgte auf immunhistochemische Weg nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit anti-PER und unter Verwendung eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers. *UAS-p38b^{DN-S}*, *cry-Gal4/+*; + zeigen ähnlich Kontrollfliegen zyklische Schwankungen von PER im Tagesverlauf (A), sowie in geringerem Maße phosphoryliertes PER. Dieser Effekt auf den Phosphorylierungsgrad wird besonders bei alternierenden Auftragung der Genotypen deutlich (B) und zeigt die stärkste Ausprägung während der Dunkelphase, den Zeitraum mit nachgewiesen vermehrter Aktivität von p38 in den Uhrneuronen (siehe Abb. 16 und 17). Balken oberhalb der Blots symbolisieren das verwendete Lichtregime - schwarz repräsentiert die Dunkel-, weiß die Lichtphase. DNS bezeichnet den Experimentalstamm *UAS-p38b^{DN-S}*, *cry-Gal4/+*; +, K die Kontrolle *UAS-p38b^{DN-S}*, +; +; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Um einen direkteren Vergleich der Genotypen zu ermöglichen und zugleich den visuellen Unterschied im Phosphorylierungsgrad von PER besser hervorzuheben, wurde der Westernblot ein weiteres Mal wiederholt und die Proben von Experimental- und Kontrollstamm pro ZT abwechselnd aufgetragen (Abb. 34B). Ergebnisse bestätigen den Anfangsverdacht und zeigen für Fliegen mit manipulierten p38b Spiegel zu allen ZT über den Tag verteilt deutlich niedrigere bzw. schmalere PER-Banden und somit weniger phosphoryliertes PER, als die Kontrolle. Diese Auswirkungen auf den

Phosphorylierungsgrad von PER sind besonders prägnant in der Dunkelphase (ZT12-ZT0), ein Fakt der insbesondere mit der beobachteten vermehrten Aktivität von p38 während der Nacht in Einklang steht (siehe Abb. 20 und 21).

4.4.3 Nicht-radioaktive *in vitro* Kinasen Assays zur Identifizierung möglicher p38-Phosphorylierungsstellen in PER

Aufgrund des nachweislichen Effekts auf den Phosphorylierungsgrad von PER, drängt sich die Frage auf ob p38 das Uhrprotein direkt phosphoryliert oder vielmehr über zwischengeschaltete Kinasen oder Phosphatasen wirkt. Massenspektrometrische Studien von Garbe et al. (2013) offenbaren zahlreiche Phosphorylierungsstellen in PER, von denen bereits einige als potentielle MAPK Zielsequenzen identifiziert werden konnten (Tab. A5). So phosphoryliert NEMO, eine Prolin-gerichtete und evolutionär konservierte, MAPK-verwandte Kinase, PER an dem erst kürzlich identifizierten pershort Phospho-Cluster, stimuliert dadurch die DBT-vermittelte Phosphorylierung an benachbarten Stellen und fungiert somit als eine Art „Vorreiter-Kinase“ (Chiu et al., 2008 und 2011). Eine ähnlich Schlüsselrolle kommt dem Serin an Position 661 der PER-Aminosäuresequenz zu. So zeigen Mutanten mit blockierter Ser661 Phosphorylierungsstelle eine verzögerten nukleären Translokation von PER und lange Freilaufrythmen unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen (Ko et al.; 2010). *In vitro* Phosphorylierungsassays deuten auf ERK, eine Prolin-gerichtet MAP-KInase als möglichen Verantwortlichen der Phosphorylierung von Ser661 hin, Nachweise *in vivo* fehlen jedoch bis heute. Aufgrund der phänotypische Ähnlichkeiten im Verhalten sowie auf molekularer Ebene von *p38* Mutanten und Fliegen mit mutierter Ser661 Phosphorylierungsstelle, stellt sich die Frage ob neben ERK möglicherweise auch p38, als weiterer Vertreter Prolin-gerichteter MAP-Kinasen, die Fähigkeiten besitzt PER an Ser661 zu phosphorylieren. Internetrecherchen und Sequenzanalysen verstärken den Verdacht und offenbaren mit Ser661 und Ser975 zwei potentielle p38-Phosphorylierungsstellen in PER (Abb 35).

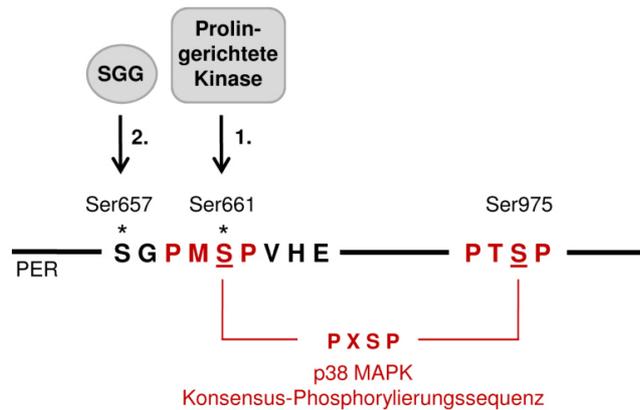


Abbildung 35: Potentielle p38 Konsensus-Phosphorylierungssequenzen in Period.

Abbildung 35 zeigt eine schematische Darstellung der Period Proteinsequenz (PER) mit zwei potentiellen Phosphorylierungsstellen der MAP-Kinase p38 (S). In Period bereits identifizierte phosphorylierte Serine sind zusätzlich mit einem schwarzen Stern (*) gekennzeichnet, die komplette p38 MAPK Konsensus-Phosphorylierungssequenz „PXSP“ hingegen ist in rot wiedergegeben (http://www.kinexus.ca/pdf/graphs_charts/ProteinSerKinaseSpecificity.pdf; modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden nicht-radioaktive *in vitro* Kinasenassays mit eigens hergestellten Hexa-Histidin markierte p38a und p38b MAP-Kinasen (His₆-p38a und His₆-p38b) durchgeführt (Abb. 36). Als Substrate dienten zwei GST-markierte PER-Peptide, mit aminoterminal angehängten GST an Aminosäure 1-700 (GST-PER¹⁻⁷⁰⁰) bzw. Aminosäure 658-1218 (GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸) (beide angefertigt und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Raabe; Dusik et al., 2014), die zeitgleich eine bzw. beide potentielle p38-Phosphorylierungsstellen in ihrer Proteinsequenz tragen. Zur Detektion einer möglichen PER-Phosphorylierung wurden Phosphorylierungsansätze im Anschluss an den Assay in 9% Harnstoff-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung angefärbt. Zur Auftrennung der Ansatzkomponenten wurde das Verfahren der Harnstoff-PAGE gewählt. Im Gegensatz zu SDS maskiert Harnstoff nicht die Eigenladung des Proteins und führt so, aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen zu längeren Laufstrecken phosphorylierter Proteine gegenüber ihrer unphosphorylierten Gegenstücken. Da das PER-Signal des Coomassie-gefärbten Gels zusätzlich bestätigt werden sollte, wurden im Anschluss an die Gelelektrophorese und vor Durchführung der Färbeprozedur, zusätzlich je zwei der aufgetragene Ansätze vom übrigen Gel abgetrennt, auf Nitrozellulosemembran geblottet und immunhistochemisch mittels eines PER-Antikörpers (anti-PER) detektiert. Da *in*

in vitro Kinasenassays mit His₆-p38a in Vorversuchen keine Shifts offenbarten (Abb. 5A), wird im folgenden Abschnitt ausschließlich auf Phosphorylierungsassays mit His₆-p38b eingegangen.

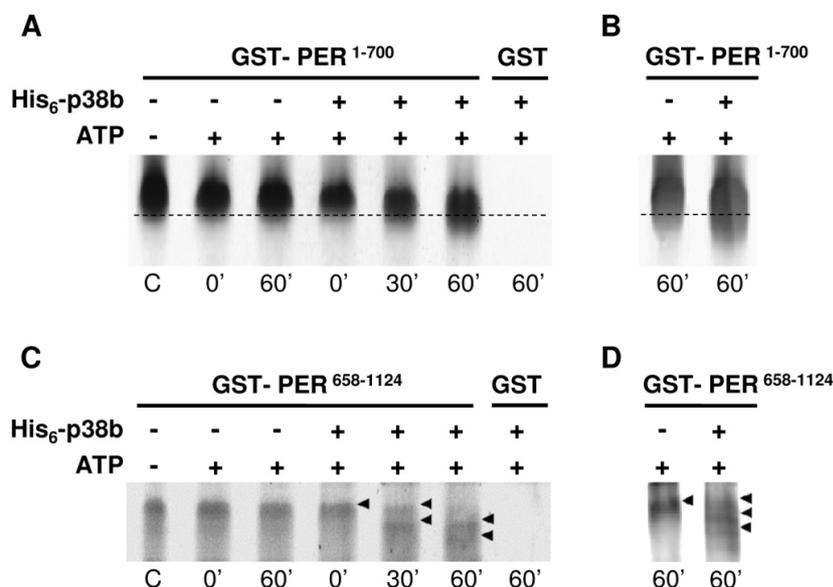


Abbildung 36: In vitro Phosphorylierung von GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ und GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ durch His₆-p38b.

Zur Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von PER durch p38b wurden GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ (A-B) und GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ (C-D) in nicht-radioaktiven Kinasenassays mit His₆-p38b und ATP inkubiert und Stichproben direkt nach, sowie 30 bzw. 60 min nach Zugabe der Kinase zusammen mit einer Negativkontrolle (C) mittels Harnstoff-PAGE nach Ladung und Größe aufgetrennt. Die Visualisierung phosphorylierter PER-Konstrukte erfolgte im Anschluss über Coomassie-Färbung im Harnstoffgel (A und C) und nach Wet-Blot auf Nitrozellulosemembran mittels immunhistochemischer Färbung (B und D). *In vitro* Phosphorylierungsassays zeigen eine offensichtliche Verschiebung der GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ Bande nach 30 min und 60 min Inkubationszeit (A) sowie das Auftreten zusätzlicher Banden im Fall von GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ (C). Letzterer Effekt wird vor allem nach 60 min Inkubationszeit deutlich und äußert sich in zwei nach unten verschobenenden Banden im Vergleich Negativkontroll und 0 min-Ansatz. Parallel durchgeführte Wet-Blots mit anschließender immunhistochemischer Färbung (B und D) bestätigen dieses Ergebnisse und lassen zudem auf eine p38b-induzierte Mehrfachphosphorylierung von PER schließen. Zeitskala unterhalb der Blots repräsentiert Minutenwerte nach His₆-p38b-Zugabe, Pfeile in C und D markieren GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ Bandenshifts, die gestrichelte Linie verdeutlicht die Verschiebung von GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

So zeigen sowohl GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ (Abb. 36A) als auch GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ (Abb. 36C) im direkten Vergleich mit den Phosphorylierungsansätzen kurz nach Kinasenzugabe (0') sichtbare Bandenshifts nach 30 bzw. 60 min Inkubationszeit mit His₆-p38b. Auch wenn diese Bandenverschiebung nicht übermäßig stark ausfällt, so bestätigen zusätzliche durchgeführte Wet-Blots und immunhistochemische Färbungen der 60 min-Ansätze die Spezifität des Signals und bekräftigen den Verdacht der p38b-gesteuerten Phosphorylierung von PER (Abb. 36B und D). Fehlende Bandenshifts in Ansätze ohne

Kinase sowie mehrere auftretende Banden im Fall des GST-PER⁶⁵⁸⁻¹¹²⁴ Konstrukts weisen darüber hinaus auf eine mehrfache Phosphorylierung von PER durch p38b hin.

5 DISKUSSION

5.1 Retinale Expression von p38 gibt keine Aufschlüsse über eine mögliche Rolle im peripheren Oszillator im Komplexauge

Zahlreiche Studien belegen eine Expression von ERK und p38 in Retinas von Vertebraten (Kikuchi et al., 2000; Roth et al., 2003; Hasegawa und Cahill, 2004; Porcnich et al., 2009) und *Drosophila* (Jarvis et al., 1997), setzen dies jedoch stets in Verbindung mit einem programmierten Zelltod, sowie einer oxidativen Stressantwort. Spekulationen die auf einen Zusammenhang von MAPK-Expression und circadianer Uhrproteinoszillation im Auge schießen lassen, kamen erstmals im Jahr 2000 auf. So konnten Harada und Kollegen circadiane *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungsrhythmen von ERK in amakrinen Zellen der inneren nukleären Retinaschicht von *Xenopus laevis* beobachten. Diese rhythmische Schwankungen im Aktivierungsprofil offenbarten ein Maximum an aktivierter ERK während der Nacht und bestanden auch unter konstanten DD-Bedingungen weiterfort. Kurzzeitapplikationen eines MAPKK-Inhibitors führten zu einer deutlichen (4-8h) Phasenverschiebung im Phosphorylierungsrhythmus. Da amakrine Zellen von Vertebraten, ebenso wie Photorezeptorzellen, eine rhythmische Expression von Uhrproteinen aufweisen (Dorenbos et al., 2007; Ruan et al., 2008; Cahill und Besharse, 1993), schlussfolgerten Harada et al. für den ERK-Signalweg eine bedeutende Rolle im peripheren Oszillator des Froschauges. Diese Hypothese konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Retinafärbungen der Reporterlinie *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* sowie weißäugiger *w¹¹¹⁸* Wildtypfliegen auf den ersten Blick nicht bestätigen. Während Froschretinas neben p-ERK-positiven amakrinen Zellen auch eine durchgängige ERK-Färbung aller retinaler Schichten, so auch der Photorezeptoren, aufwiesen (Harada et al., 2000), zeigen Retinas von *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* und *w¹¹¹⁸* lediglich eine deutliche Färbung der sekundären und tertiären Pigmentzellen, sowie der interommatidialen Borste. Eine p38b-getriebene GFP-Expression bzw. p-p38 Färbung in den Photorezeptorzellen R1 - R8, dem eigentlichen Sitz des peripheren Oszillators im Komplexauge von *Drosophila* (Cheng und Hardin, 1998), ist in beiden Fällen nicht zu erkennen. Indes fiel bei Betrachtung von p-p38-gefärbeten Gehirnen des Wildtypstamm CS ein positives Färbesignal im optischen Lobus der Tiere auf (siehe Stern in Abb. 15A und 15D). Hierbei könnte es sich möglicherweise um p-p38-gefärbete Strukturen der

Medulla, wie Neurone oder Endigungen der Photorezeptorzellen R7 und R8, handeln. Zusätzlich treten, ähnlich dem ERK-Phosphorylierungsrhythmus in amakrinen Zellen von *Xenopus*, deutliche Intensitätsunterschiede im p-p38 Färbesignal bei ZT9 und ZT21 auf. Auf eine Interpretation der Färbung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet. Eine eindeutige Identifizierung des Expressionsortes war aufgrund des Fehlens geeigneter Marker nicht möglich, eine Auslegung des Färbesignals wäre demnach rein spekulativ. Zudem fungiert die Medulla als wichtiges Schalt- und Verarbeitungszentrum visueller Informationen beim Farb- und Bewegungssehen (zusammengefasst in Morante und Desplan, 2004). Nachweise für den Sitz einer peripheren circadianen Uhr in der Medulla von *Drosophila* gibt es hingegen keine.

Diese Rolle kommt vielmehr den Photorezeptorzellen im visuellen System der Fliege zu. Diese offenbaren jedoch bei w^{1118} weder anti-p-p38 Färbung noch bei *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* Fliegen eine *p38b*-induzierte Expression des Reporters GFP. Zwar könnte diese Diskrepanz im Färbemuster von *Xenopus* und *Drosophila* auf einen artspezifischer Effekt sowie auf Unterschiede im örtlichen und zeitlichen Expressionsmuster von ERK und p38 zurückzuführen sein, jedoch belegen Studien im Zusammenhang mit Apoptose und oxidativem Stress eine Expression beider MAP-Kinasen in denselben retinalen Strukturen (Roth et al., 2003; Kikuchi et al., 2000). Ebenso gibt es Übereinstimmung im ERK-Phosphorylierungsrhythmus amakriner Zellen von *Xenopus* und der circadianen Aktivierung von p38 in den DN_{1a} von *Drosophila* (Abb. 20). Beide zeigen ein Maximum an phosphorylierter MAP-Kinase während der Nacht und geringe Spiegel am Tag. Der Präparationszeitpunkt der Retinafärbung dürfte mit ZT24 daher gut gewählt sein und sollte bei ausreichender Spezifität der *p38b-Gal4* Treiberline sowie Funktionalität des p-p38 Antikörpers, einen Expressionnachweis von p38 durchaus erbringen.

Stattdessen ist lediglich in den sekundären und tertiären Pigmentzellen von w^{1118} und *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* eine Expression von p38 eindeutig nachweisbar und wird zusätzlich durch Forschungsergebnisse von Pocrnich et al. (2009) bestätigt. Pigmentzellen dienen zur Abschirmung der Ommatidia und sorgen im allgemeinen für eine Reduktion der Lichtempfindlichkeit (Shoup, 1966; Stark und Sapp, 1988), eine rhythmische Expression von Uhrproteinen konnte noch nicht beobachtet werden. Die Expression von p38 sowohl in den sekundären und tertiären Pigmentzellen, als auch in den nicht näher identifizierten Bereichen des optischen Lobus ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit eher auf eine Rolle von p38 im Rahmen des programmierten Zelltod

sowie der oxidativen Stressantwort zurückzuführen. Ein Nachweis in den Photorezeptorzellen R1 – R8 mittels p-p38 Antikörper sowie der Reporterlinie *p38b-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* schlug zwar fehl, muss aber nicht zwangsläufig das Fehlen einer p38-Expression bedeuten. So zeigt der Antikörper anti-p-p38 im Gegensatz zu anti-p38 und anti-p38b in Gehirnen das stärkste Färbesignal, detektiert jedoch nur zweifach phosphorylierte, aktivierte Isoformen von p38. Sollten diese in den Photorezeptorzellen zu ZT24 unterhalb des Detektionsspiegels, sprich in zu geringer Menge, vorliegen, könnte dies die fehlende Färbung erklären. Um eine Lokalisation in den Photorezeptorzellen sowie eine Beteiligung an der rhythmischen Oszillationen im Auge für p38 mit endgültiger Sicherheit ausschließen zu können, wären demnach weitere Retinafärbungen mit zusätzlichen p38-Antikörpern und mehreren Färbezeitpunkten zwingend erforderlich. Ebenso könnten Untersuchungen zum retinalen „Uhrproteincyclings“ in Fliegen mit reduziertem p38 Spiegel in den Photorezeptoren eine mögliche Rolle von p38 in der peripheren Uhr im Komplexauge weiter beleuchten.

5.2 Antikörperfärbungen und Reporterlinien offenbaren p38-Expression in Uhrneuronen von *Drosophila*

Im Gegensatz zur peripheren Uhr im Komplexauge, existieren mehrere unabhängige Studien, die eine Expression von p38 im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) von Hamstern (Pizzio et al., 2003) sowie der Zirbeldrüse bei Vögeln und Ratten (Hayashi et al., 2003; Chik et al., 2004) eindeutig belegen und zugleich eine wichtige Funktion dieser MAP-Kinase für circadiane Schrittmacherzentren postulieren. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Antikörperfärbungen offenbaren nun erstmals auch in der inneren Uhr von *Drosophila* eine Expression von p38. Zwar überlappen die Färbemuster von Reporterlinien und Wildtypfliegen nicht in allen Bereichen, das Vorliegen der Kinase in einzelnen Uhrneuronen ist jedoch mehr als wahrscheinlich.

So lässt eine große Ansammlung lacZ-gefärbte Zellkerne im Bereich der lateralen Neurone in *UAS-nuclacZ⁶⁶⁰/p38b-Gal4* Fliegen eine Expression in den I-LN_v vermuten, Kolo-kalisation von anti-TIM und anti-GFP in den I-LN_v von *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* bestätigen diesen anfänglichen Verdacht. Auch wenn die ektopische Expression eines Reportergens nicht immer die reelle Expression des Gens widerspiegelt, Antikörperfärbungen an wildtypischen Gehirnen bekräftigen weitestgehend die Ergebnisse der Reporterlinien. So offenbaren Dreifachfärbungen mit anti-VRI, anti-PDF

und anti-p38b (einem p38- Antikörper der nach Aussagen von Adachi-Yamada sowohl p38b als auch p38a detektiert) p38-Expression in den l-LN_v von *CS* und zeigten darüber hinaus ein positives Färbesignal in einer weiteren Uhrneurongruppe, den s-LN_v. Dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls um ein reelles Färbesignal handelt, belegen Microarray Studien in Uhrneuronen von Kula-Eversole et al. (2010). Demnach weisen s-LN_v im Vergleich zu anderen Gehirnregionen eine um das Vielfache höhere Menge an *p38a* mRNA auf, eine Tatsache, die nicht nur auf eine Expression von p38a hindeutet, sondern gleichzeitig auch eine mögliche Erklärung für das fehlende Signal der s-LN_v bei *p38b*-getriebener GFP- bzw. nukleärem lacZ-Expression liefern könnte. Zusätzlich sprechen auch Färbeergebnisse des Antikörpers anti-p38 für eine Expression von p38 in den s-LN_v. So traten in zwei Fällen bei Gehirnen des Wildtypstamms *CS* vereinzelt p38-positive s-LN_v auf. Zwar war eine Färbung von Uhrneuronen in den übrigen Präparaten nicht zu erkennen, dies könnte jedoch auf das homogene p38-Grundfärbesignal des gesamten Gehirns zurückzuführen sein. Färbeergebnisse von *UAS-nuclacZ⁸⁶⁰/p38b-Gal4* und *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* bekräftigen diesbezüglich eine über das gesamte Gehirn verteilte, breite Expression von p38b und legen somit eine Spezifität dieses Färbesignals nahe. Der Umstand dass hierbei in Reporterlinien einzeln gefärbte Zellen erkennbar sind, während wildtypische Gehirne, bis auf wenige Ausnahmen, insbesondere eine homogene, großflächige Färbung von Gehirnareale aufweisen, könnte mit einer Eigenschaft des UAS/Gal4-Systems zusammenhängen. So führt die gezielte, konstitutive Expression eines Gens unter UAS-Kontrolle häufig zu einer Verstärkung der Transkription. *CS* Gehirne hingegen repräsentieren stets die reelle Expression des Gens. Eine mögliche Hypothese wäre demnach, dass sich Zellen mit einer mäßigen p38-Transkriptionsrate in ihrer Färbung nicht deutlich vom „Hintergrund“ absetzen und infolgedessen, wie im Falle von *CS*, mit schwach p38-gefärbten Zellen in direkter Nachbarschaft zu einem großflächigen homogenen Färbesignal „verschmelzen“. Darüber hinaus diene bei allen Wildtyp-Färbungen mit *p38b^{Δ25}; p38a^{Δ1}* ein hypomorpher „Doppelknockoutstamm“ als Negativkontrolle. Selbst bei kompletter Abwesenheit der p38a Isoform, zeigt dieser eine Restexpression von p38b und könnte damit fehlende drastische Intensitätsunterschiede im p38-Färbesignal von *CS* Wildtypfliegen und Kontrolle erklären. Ob auf diese Weise auch die einmalige Färbung zweier LN_d in *p38b^{Δ25}; p38a^{Δ1}* erklärt werden kann, bleibt jedoch fraglich. Zumindest sprechen Verhaltensdaten von *dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+* und *dicer2; Pdf-Gal4/UAS-p38b^{RNAi}/+; +* Fliegen eindeutig für eine Expression beider

Isoformen in den s-LN_v und den l-LN_v. So führten reduzierte p38a bzw. p38b Spiegel in PDF-exprimierenden Neuronen zu einer verspäteten Abendaktivität in LD und langen Freilaufrythmen unter konstanten DD-Bedingungen (für eine detaillierte Beschreibung des Verhaltensphänotyp siehe Abschnitt 5.4).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, Verhaltensaufzeichnungen, Reporterlinien sowie p38- und p38b-Antikörperfärbungen deuten eindeutig auf p38-Expression in den LN_v hin und schließen zudem eine Lokalisation in weiteren Uhrneurongruppen nicht aus. So zeigen Reporterlinien neben einer p38-induzierten Expression von GFP bzw. nukleärem lacZ im Übergang von Zentralhirn und optischen Lobus, insbesondere eine breite Expression im Protocerebrum, dem Bereich der dorsalen Neurone. Zwar ist weder in den DN₁ noch in den DN₂ und den DN₃ eine eindeutige Kolo-kalisation mit anti-TIM erkennbar, Nachweise des Transkriptionsfaktors Mef2 - gut untersuchtes Target des p38 Signalweg im Muskel von *Drosophila* (Vrailas-Mortimer et al., 2011) sowie in Myozyten, Lymphozyten und Neuronen von Säugern (Cox et al., 2003; Han et al., 1997; Zhao et al., 1999; Mao et al., 1999) - in allen Uhrneurongruppen unterstützen jedoch die Hypothese einer Expression von p38 in allen Uhrneuronen (Blanchard et al., 2010). Einen weiteren Nachweis liefern Antikörperfärbungen an Wildtypgehirnen mit anti-p-p38. Diese offenbaren ein deutliches Färbesignal in der DN_{1a} zu ZT21, p-p38-Färbung zu ZT9 hingegen trat nicht auf. Dass es sich hierbei um ein spezifisches Färbesignal handelt, zeigen Auswertungen p-p38-gefärbter DN_{1a} von *w;⁺*; *p38a^{Δ1}* und *w;* *p38b^{Δ45}* Knockoutmutanten. Um 50% reduzierte p-p38-Färbeintensitäten der DN_{1a} belegen nicht nur die Authentizität des Färbesignals sondern deuten zugleich auch auf eine Expression beider Isoformen in diesen Neuronen hin. Dennoch bleibt die Frage, weshalb abgesehen von den DN_{1a}, nicht auch andere Uhrneurongruppen aktivierte p38a und p38b MAPK aufweisen. So zeigten auch die s-LN_v und l-LN_v, Uhrneurongruppen für die bereits eine p38-Expression nachgewiesen werden konnte, zu beiden Zeitpunkten kein positives p-p38 Färbesignal. Eine mögliche Erklärung könnte eine zeitlich als auch örtlich unterschiedliche Aktivierung von p38 sein. So lassen auftretende Färbeunterschiede der DN_{1a} zu ZT9 und ZT21 ähnlich circadianer p38-Phosphorylierungsrythmen im SCN von Hamstern (Pizzio et al., 2003) auf eine rhythmische Aktivierung von p38 im circadianen System der Fliege schließen. Dass dieser Prozess in Abhängigkeit vom Expressionsort möglicherweise auch antizyklisch stattfinden kann, zeigen ERK-Phosphorylierungsstudien an Mäusen (Nakya et al., 2003). Dort traten MAPK Phosphorylierung und Aktivierung in verschiedenen Arealen

des SCN zu unterschiedlichen Zeiten auf. Während im zentralen SCN ERK in der subjektiven Nacht bis zu 8 Stunden in seiner aktiven, phosphorylierten Form vorlag, zeigten dorsomediale Areale des SCN am subjektiven Tages nur ein flüchtiges Maximum an p-ERK. In Übereinstimmung hiermit offenbaren DN_{1a} von wildtypischen Fliegen im Tagesverlauf, einen über die gesamte Nacht verteilten erhöhten Spiegel an aktivierter p38 MAPK, p-p38-Färbung während der Lichtphase hingegen ist nicht zu erkennen. Ebenso blieb der Nachweis von aktiver p38 MAPK in weiteren Uhrneurongruppen, wie den s-LN_v und den l-LN_v, leider erfolglos. Sollten diese ähnlich dem dorsomedialen SCN nur flüchtige Maxima an phosphorylierter p38 aufweisen, könnten Färbeabstände mit 4 Stunden zu lang gewählt sein. Eine Wiederholung der Färbezeitreihe mit halb- bis einstündigen Zeitabständen würde sich aus diesen Gründen anbieten. Dennoch, trotz noch ausstehender Nachweise von aktivierter p38 in den ventrolateralen Neuronen der inneren Uhr von *Drosophila*, legen bisherige Färbeergebnisse von CS Wildtypfliegen sowie der Reporterlinien *UAS-nuclacZ⁸⁶⁰/p38b-Gal4* und *p38-Gal4; UAS-GFP^{S65T}* nachdrücklich eine Expression von p38 in allen Uhrneurongruppen nahe.

5.3 Phosphorylierung von p38 im circadianen System unterliegt einer licht- und uhrgesteuerten Regulation

Wie bereits in Abschnitt 5.2 angedeutet, lassen p-p38 Antikörperfärbungen an wildtypischen Gehirnen, circadiane p38-Phosphorylierungsrhythmen in den DN_{1a} erkennen. Dass diese rhythmische Veränderungen in der Färbeintensität tatsächlich auf einer Aktivierung von p38 beruhen und nicht auf zyklischen Schwankungen im p38-Expressionsspiegels zurückzuführen sind, belegen *p38* mRNA Expressionsdaten aus CS Kopffextrakten. So offenbaren Wildtypfliegen im Tagesverlauf konstante *p38a* und *p38b* mRNA Spiegel. Zwar spiegeln Kopffextrakte nicht exakt die Expression der inneren Uhr wieder, sondern repräsentieren vielmehr das Expressionsmuster aller p38-exprimierender Neurone im Gehirn und Komplexauge der Fliege, Westernblots mit SCN- (Pizzio et al., 2003) und Zirbeldrüsenextrakten (Hayashi et al., 2003) bestätigen jedoch eine konstante Expression von p38 in Schrittmacherneuronen. Der Tatsache, dass es sich bei Kopffextrakten um ein Proteingemisch eines „Zellpool“ handelt, könnte auch die Diskrepanz zwischen den in Westernblots beobachteten konstanten p-p38 Spiegeln und den in den DN_{1a} auftretenden rhythmischen Schwankungen in

phosphoryliertem p38 erklären. Letztere konnten bereits im SCN von Hamstern beobachtet werden und sind nach Pizzio und Kollegen (2003) auf eine licht-induzierte sowie uhrgesteuerte Aktivierung von p38 zurückzuführen. Mit einem ansteigenden p-p38 Spiegel bereits ab Mitte Tages bis hin zu einem Abfall gegen Ende der Nacht unterscheidet sich diese Oszillation jedoch vom p38-Phosphorylierungsrhythmus in den DN_{1a} der Fliege (niedrigem p-p38 Level am Tag und hohem Level während der Nacht), eine mögliche Erklärung hierfür könnten Forschungsergebnisse von Nakaya et al. (2003) liefern. So zeichnen sich im SCN von Mäusen Unterschiede im ERK-Phosphorylierungsrhythmus in Abhängigkeit vom Expressionsort hinsichtlich Zeit und Verlauf ab. Während in dorsomedialen Bereichen des SCN die MAP-Kinase ERK zu Beginn des Tages in seiner aktiven Form vorliegt, zeigen das SCN-Zentrum ein rhythmisches Phosphorylierungsmuster ähnlich der DN_{1a} von *Drosophila*. Konträr hierzu untersuchten Pizzio und Kollegen (2003) nur Proteinextrakte aus ganzen SCN-Präparaten, eine Differenzierung in zentralen und dorsomedialen SCN fand nicht statt. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte p-p38-Hirnfärbungen unter konstanten Bedingungen bringen schließlich den endgültigen Nachweis einer Uhr-regulierte Aktivierung von p38 im circadianen System der Fliege. So bestanden auch in DD Phosphorylierungsrhythmen von p38 in den DN_{1a} weiter fort und offenbarten zudem einen signifikant höheren p-p38 Spiegel zu CT18 als gegen Mitte des subjektiven Tages (CT6). Diese nächtliche Aktivität von p38 ebenso wie die über den Tag verteilten niedrigen Spiegel an aktiver p38 MAPK, deuten entgegen Berichten von Pizzio et al. (2003) nicht auf ein zusätzliche lichtinduzierte Phosphorylierung hin. Vielmehr legen 15 Minuten-Lichtpulse zu CT6 und CT18 eine Hemmung der p38-Aktivität durch Licht nahe. Dies steht in Einklang mit einem reduzierten p-ERK Spiegel infolge eines nächtlichen Lichtpulses im zentralen SCN (Nakaya et al., 2003; Sanada et al., 2000) und würde zugleich für ein Nacht-spezifische Funktion von p38 in den DN_{1a} sprechen. Allerdings bleibt an dieser Stelle zu erwähnen, dass 15 Minuten-Lichtpulse zu CT14 in den dorsomedialen Bereichen des SCN auch zu einer Aktivierung von ERK führten. Ein plötzlich auftretendes p-p38-Signal in weiteren Uhrneuronen der Fliege hingegen war zu CT18 nicht zu erkennen. Nichtsdestotrotz kann eine tagaktive p38 MAPK in der inneren Uhr der Fliege neben der in DN_{1a} vorliegenden nachtaktiven Form nicht komplett ausgeschlossen werden, da eine Detektion von phosphorylierter p38 in weiteren Uhrneuronen, wie den s-LN_v und den l-LN_v, bisher fehlschlug.

5.4 Modifizierte p38 Spiegel in Uhrneuronen führen zu Veränderungen in der rhythmischen Laufaktivität

Nachdem die Expression und uhrgesteuerte Phosphorylierung von p38 bereits erste Hinweise auf eine bedeutende Rolle dieser MAPK im circadianen System von *Drosophila melanogaster* lieferten, komplementieren durchgeführte Aktivitätsaufzeichnungen von Fliegen mit modifizierten p38 Level schlussendlich diese Hypothese. Grundsätzlich stellen Laufaktivitätsrhythmen einen zuverlässigen und robusten Output der inneren Uhr dar, Abweichungen lassen daher meist auf Störungen innerhalb des biologischen Chronometers schließen. So deuten auch der verspätete Abendaktivitätsanstieg in LD sowie die verlängerte Freilaufperioden unter DD-Bedingungen in *p38a^{RNAi}* und *p38b^{RNAi}* Fliegen verstärkt auf gestörte Rhythmen im circadianen Schrittmacherzentrum hin. Die Tatsache, dass *p38b^{RNAi}*-Fliegen längere Freilaufperioden als *p38a^{RNAi}*-Fliegen aufweisen und zudem der *p38b* mRNA-Spiegel in CS Kopfextrakten im Vergleich zu *p38a* mRNA deutlich erhöht ist, weist darüber hinaus auf einen bedeutendere Rolle der p38b Isoform für die innere Uhr hin.

Neben der verspäteten Abendaktivität und einer Freilaufperiode von 25,3 h fiel in *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim-Gal4;+* darüber hinaus eine vergleichsweise hohe Anzahl arrhythmischer Fliegen auf. In Anbetracht der Tatsache dass Arrhythmizität grundsätzlich ausschließlich infolge eines RNAi-vermittelten Knockdown nicht aber bei Expression von *p38b^{KD}*- bzw. *p38b^{DN-S}*-Konstrukten auftrat, könnte dies auf einen potentiellen „off-target“ Effekt von *p38b^{RNAi}* hindeuten. Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 kurz erwähnt, können „off-target“ Effekte bei Anwendung der RNAi Technologie nie völlig ausgeschlossen werden. Zudem macht die RNAi Expression in einer großen Anzahl an Zellen, wie zum Beispiel im Falle von *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim-Gal4;+*, das Auftreten dieser Effekte sogar noch wahrscheinlicher. In Übereinstimmung damit sank die Zahl arrhythmischer Fliegen um 50%, als die Expression von *p38b^{RNAi}* auf allein 16 Neurone im Gehirn (*dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+*) beschränkt wurde (χ^2 -test: $\chi^2 = 17.02$; $p < 0.001$). Zusätzlich zeigen *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* Fliegen im Vergleich mit ihrer UAS-Kontrolle nur eine Phasenverschiebung nicht aber Amplitudenunterschiede im PER- und TIM-Cyling der s-LN_v. Der Hohe Prozentsatz arrhythmischer Tiere in *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* und *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4;+* ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen sog. „off-target“ Effekt des *p38b^{RNAi}* Konstrukts zurückzuführen. Periodenverlängerung und verzögerter Abendaktivitätsbeginn hingegen scheinen in der Tat eine Folge reduzierter p38 Leveln in der inneren Uhr zu sein. So ist

in $w; UAS-p38b^{KD3}/timUAS-Gal4$; $UAS-p38b^{KD8}/+$ und $w; UAS-p38b^{KD3}/Pdf-Gal4$; $UAS-p38b^{KD8}/+$ Fliegen der gleiche Verhaltensphänotyp zu beobachten. Ebenso führt die Expression eines dominant-negatives $UAS-p38b$ Transgens in PDF- bzw. TIM-exprimierenden Neuronen ($UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +$ bzw. $UAS-p38b^{DN-S}; tim-Gal4/+; +$) zu einem verzögerten Anstieg der Abendaktivität in LD und verursacht zugleich, im Falle von $UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +$, mit einer Periodenlänge von bis zu 26,5 h unter allen aufgezeichneten p38 Mutanten den stärksten Effekt auf das Freilaufverhalten.

Überraschenderweise zeigen $w; p38b^{\Delta45}; +$ und $w; +; p38a^{\Delta1}$ Singleknockoutmutanten ebenso wie heterozygote Doppel-Knockoutkombinationen ($p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}/+$, $p38b^{\Delta45}/+; p38a^{\Delta1}$ und $p38b^{\Delta45}; p38a^{\Delta1}/+$) wildtypisches Laufverhalten ohne Auffälligkeiten. Dies ist möglicherweise auf die redundante Eigenschaft beider Isoformen zurückzuführen, Spekulation hierzu werden jedoch detaillierter in Abschnitt 5.5 diskutiert. Im gleichen Maße erstaunlich ist die Tatsache, dass ein Überexpression von p38b im circadianen System nicht zu kurzen Freilaufperioden und den somit erwarteten gegenteiligen $p38b^{RNAi}$ Effekt führt.

Zusammen mit den Aktivitätsdaten der $p38a^{RNAi}$, $p38b^{RNAi}$, $p38b^{KD}$ sowie der $p38b^{DN-S}$ Fliegen deutet dies daraufhin, dass die in den Uhrneuronen vorkommende wildtypische Menge an p38 vermutlich einen kritischen Schwellenwert repräsentiert. Wird dieser nicht erreicht, gerät das sensible Zusammenspiel von p38 und innerer Uhr außer Kontrolle und die Folgen werden als verspätete Abendaktivität und lange Freilaufperioden im Verhalten sichtbar.

5.5 Funktionelle Redundanz als möglicher Grund fehlender Verhaltensphänotypen in p38a und p38b Single-Knockoutmutanten

Ein auf den ersten Blick nicht zu erwartendes Ergebnis der Aktivitätsaufzeichnungen war der fehlende Verhaltensphänotyp (verspäteter Abendaktivitätsbeginn, lange Freilaufperiode) in $p38a^{\Delta1}$ und $p38b^{\Delta45}$ Single-Knockoutmutanten. Diese beruhen jedoch vermutlich auf der funktionelle Redundanz beider p38-Isoformen, einer Eigenschaft die insbesondere bei Signalwegproteinen weit verbreitet ist (Cutler and McCourt, 2005). In diesem Fall übernimmt bei Verlust eines Proteins ein gleichwertig anderes dessen Aufgabe und Funktion. Dieser lebensnotwendige, kompensatorische Mechanismus kommt jedoch vermutlich nur zum Tragen, wenn bei Anwesenheit einer p38-Isoform die

anderen komplett fehlt, nicht aber wenn sie in reduzierter Menge vorliegt. So traten in den hier durchgeführten Verhaltensexperimenten lange Freilaufperioden nur dann auf, wenn Uhrneurone, wie beispielsweise im Falle von *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* bzw. *dicer2; Pdf-Gal4/+; UAS-p38a^{RNAi}/+*, entweder einen reduzierten p38a bzw. p38b Spiegel aufwiesen, nicht aber wenn die jeweilige Isoform vollständig im gesamten Organismus fehlte. In diesem Fall zeigten Single-Knockoutmutanten wildtypische Aktivitätsrhythmen. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache liefern, dass p38 MAP-Kinasen als essentielle Regulatoren zahlreicher physiologischer und metabolischer Prozesse schon früh in der Entwicklung (Inoue et al., 2001) und zugleich in vielen Zellen eine entscheidende, überlebensnotwendige Rolle spielen. Fehlt eine Isoform vollständig, ist der Organismus gezwungen diesen Verlust möglichst effizient ausgleichen um so das eigene Überleben zu sichern. Eine Isoform von p38 übernimmt in Anbetracht dessen zusätzlich die Funktion der anderen. Liegt hingegen wie in *dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4;+* Fliegen p38b nur in reduzierter Menge vor bzw. treten reduzierte Expressionsspiegel von p38b nur in den für das Überleben nicht notwendigen Uhrneuronen auf, sind diese Auswirkungen für den Organismus potenziell nicht lebensbedrohlich. p38a „springt“ nicht ein und Auswirkungen reduzierter p38b Spiegel werden auf Verhaltensebene sichtbar.

Die Lebensnotwendigkeit von funktioneller Redundanz wird auch bei Betrachtung der Überlebensrate von Fliegen mit einer homozygoten Kombination beider Nullallele (*p38b^{Δ45}; p38a^{Δ1}*) deutlich. So sind Doppel-Knockoutmutanten nicht überlebensfähig und sterben bereits früh im Laufe ihrer embryonalen Entwicklung (siehe Tab. A4; Craig et al., 2004; Adachi-Yamada et al., 1999; Vrailas-Mortimer et al., 2011). *p38a^{Δ1}* und *p38b^{Δ45}* Single-Knockoutmutanten hingegen offenbaren normale Überlebensraten und wildtypische Verhaltensrhythmen. Da in beiden Fliegenlinien zudem weder *p38b* mRNA Level noch *p38a* mRNA Level erhöht sind, scheint eine wildtypische Proteinmenge an p38b bzw p38a auszureichen, um circadiane Verhaltensrhythmen zu generieren und aufrechtzuerhalten. Ebenso belegen mRNA-Expressionsdaten in Kombination mit Verhaltensdaten von *p38b^{Δ45}/+; p38a^{Δ1}/+*, *p38b^{Δ45}/+; p38a^{Δ1}* und *p38b^{Δ45}; p38a^{Δ1}/+*, dass das Vorliegen eines wildtypischen Allels im heterozygoten Zustand allein schon ausreicht, um eine annähernd wildtypische Menge an mRNA und folglich Protein zu erzeugen und wildtypische Verhaltensrhythmen hervorzurufen. Wird hingegen, wie im Falle von *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4; UAS-p38a^{RNAi}/+* oder der hypomorphen Knockoutmutante *p38b^{Δ25}/+; p38a^{Δ1}*, ein kritischer Schwellenwert an *p38* mRNA

unterschritten, kommt dieser kompensatorische Mechanismus zwischen den Isoformen nicht mehr zum Tragen. Der Verlust auf Proteinebene wird auch im Verhalten sichtbar.

5.6 p38 phosphoryliert PER und steuert dessen Wanderung in den Zellkern

Lange Freilaufperioden im Verhalten werden häufig mit mutierten „Uhr-Kinasen“ (Preuss et al., 2004; Lin et al., 2002; Cyran et al., 2005), Mutationen in Phosphorylierungsstellen des Uhrproteins PER (Lin et al., 2005; Garbe et al., 2013), sowie mit dessen verzögerter Wanderung in den Zellkern (Akten et al., 2003; Cyran et al., 2005; Ko et al., 2010) in Verbindung gebracht. Dreh- und Angelpunkt in allen Fällen ist stets eine fehlende bzw. fehlerhafte Phosphorylierung von PER. Dass dieser Prozess auch in den hier verwendeten p38 Mutanten betroffen ist, bestätigen Westernblots von Kopfextrakten des Stammes *UAS-p38b^{DN-S}, cry-Gal4/+; +*. So zeigen Fliegen mit modifiziertem p38b Spiegel in innerer Uhr und Komplexaugen zwar rhythmische Schwankungen im Protein- wie Phosphorylierungsgrad von PER, der Phosphorylierungsgrad des Uhrproteins bleibt jedoch zu allen Zeitpunkten deutlich unter dem der UAS-Kontrolle. Am stärksten tritt dieser Effekt in der Dunkelphase in Erscheinung. Dieser Umstand korreliert hervorragend mit der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten, auf die Nacht beschränkten Aktivität von p38, und legt zudem die Vermutung nahe, dass p38 die Phosphorylierung von PER in der Nacht begünstigt. Eine Reduzierung von p38 und folglich auch der PER-Phosphorylierung, könnte demzufolge den in der Nacht erfolgenden Kerneintritt des Uhrproteins verzögern und auf diese Weise zu signifikant längeren Freilaufperioden im Verhalten führen.

Einen p38-abhängigen Effekt auf molekularer Ebene bestätigen auch verlängerte Perioden im Uhrproteincycling von kultivierten Säugerzellen nach *in vitro* Applikation eines p38-Inhibitors (Yagita et al., 2009). Ebenso offenbaren s-LN_v von *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* Fliegen in DD, neben zusätzliche „Nebenmaxima“ im PER- und TIM-Cycling insbesondere eine deutliche Phasenverschiebung beider Kurven im Vergleich zum Kontrollstamm. Auch wenn die Phasenverschiebung nicht exakt den Periodenunterschied zwischen *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/Pdf-Gal4; +* und Kontrollstamm wiedergibt, so steht sie doch im Einklang mit der langen Freilaufperiode der Mutante. Dennoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Färbedaten nur das nukleäre Signal der s-LN_v repräsentieren und nicht in Relation zum Gesamtsignal der Zelle gesetzt

wurde. Es kann daher lediglich von einem Effekt auf das Uhrproteincycling, nicht aber auf den Kerntransport der Uhrproteine gesprochen werden. Diesen Nachweis erbringen s-LN_v- und l-LN_v-Daten von *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* in LD 12:12. So zeigt das nukleäre Färbesignal in beiden Fällen, auch nach erfolgter Normalisierung zum zellulären PER-Signal, für *UAS-p38b^{DN-S}; Pdf-Gal4/+; +* Fliegen ein deutlich späteres Maximum an nukleären PER als in der UAS-Kontrolle. Da sich die Kurven beider Stämme ansonsten nicht signifikant voneinander unterscheiden, spricht dies in Anbetracht des verzögerten Kernimports von PER für einen Effekt von p38 auf die Geschwindigkeit, nicht aber auf die Stabilität und Robustheit der molekularen Uhr.

Mit dem Uhrprotein PER konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Phosphorylierungsassays zudem gleichzeitig ein potentiell Target von p38 im molekularen Uhrwerk identifizieren. So lassen GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ und GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Konstrukte nach Inkubation mit Hexa-Histidin markiertem p38b und ATP deutliche Bandenshifts nach 30 und 60 Minuten erkennen. Im Falle von GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ waren, sowohl auf dem Coomassie gefärbeten Harnstoffgel, als auch auf der mit einem PER-Antikörper inkubierten Nitrozellulosemembran, darüber hinaus mehrere definierte Banden auf Höhe des PER-Signals zu erkennen. Eine Tatsache die explizit auf eine Mehrfach-Phosphorylierung von GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ durch p38 schließen lässt. Diese mögliche Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen in der PER-Proteinsequenz könnte PER auf eine Phosphorylierungen durch weitere Kinasen vorbereiten und zugleich die, insbesondere während der Dunkelphase, geringere Menge an phosphoryliertem PER in Fliegen mit veränderten p38b Level erklären (Abb. 34). Als Folge dieser verminderten Phosphorylierung könnte PER verspätet in den Zellkern wandern und so durch Veränderung des molekularen Rhythmus zu einer verspäteten Aktivität unter LD- oder Freilauf-Bedingungen führen.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese einer Mehrfach-Phosphorylierung durch p38, offenbaren Web-Tools zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der Tat mit Ser⁶⁶¹ und Ser⁹⁷⁵ zwei mutmaßliche p38-Phosphorylierungsstellen im GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Peptid. Für erstere konnte bereits eine *in vitro* Phosphorylierung durch ERK nachgewiesen werden (Ko et al., 2010). Da ERK- und p38-Signalwege im Kommunikationsnetzwerk jedoch eng miteinander verschaltet sind (Abb. A1) und Mutanten mit blockierter Ser661 Phosphorylierungsstelle ähnlich der hier getesteten p38-Mutanten eine verzögerte nukleären Translokation von PER sowie lange Freilaufrythmen unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen aufweisen, wäre auch

eine Phosphorylierung von Ser⁶⁶¹ durch p38 durchaus denkbar. Radioaktive Kinasenassays (Abb. 37) mit mutierten GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Peptiden (GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸661G, GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸975G und GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸661/975G) erhärten diesen Verdacht (Dusik et al., 2014).

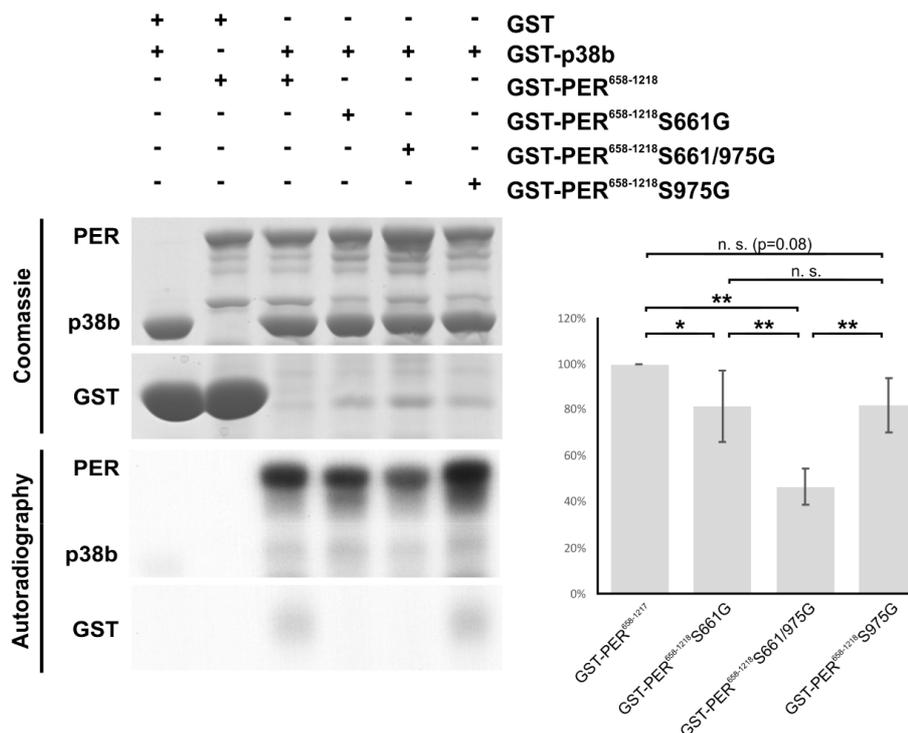


Abbildung 37: Nachweis *in vitro* phosphorylierter mutanter GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Konstrukte mittels radioaktiven Kinasenassays und Autoradiographie.

Radioaktive Kinasenassays wurden mit den angegebenen GST-PER Fusionsproteinen und GST-p38b durchgeführt. Kontrollreaktionen fanden in Abwesenheit von GST-p38b oder mit GST in Verbindung mit GST-p38b statt. Das Coomassie-gefärbte Gel diente als Ladungskontrolle für die angegebenen Proteinkombinationen, Phosphorylierungen von GST-PER hingegen wurden mittels Autoradiographie nachgewiesen. Zur Quantifizierung des Signals (rechte Spalte) wurden 5 unabhängige *in vitro* Kinasenassays durchgeführt und ausgewertet. Für jede Reaktion innerhalb eines Experiments wurde das Autoradiographiesignal zur entsprechenden Coomassie-gefärbten Proteinbande normalisiert. Die Werte im Graph sind als Prozentsatz der GST-PER⁶⁵⁸⁻¹²¹⁸ Phosphorylierung angegeben (100%; * p,0.05, ** p,0.005) (nach Dusik et al., 2010).

So lies die deutliche Reduktion im Phosphorylierungsgrad aller drei Peptide nach Inkubation mit GST-p38b, die Autoren auf eine *in vitro* Phosphorylierung von Ser⁶⁶¹ und Ser⁹⁷⁵ durch p38 schließen. Ob dies auch *in vivo* der Fall ist, müssen weitere Studien zeigen.

Zusammenfassend weisen hier gezeigte Daten auf einen direkten Effekt von p38 auf das circadiane Laufverhalten wie den molekularen Mechanismus der inneren Uhr hin.

Neben Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad von PER sowie dessen Wanderung in den Zellkern, könnte p38 aufgrund der Menge an potentiellen Targets im circadianen System von *Drosophila*, das Uhrwerk jedoch auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Mit das wichtigste Zielprotein von p38 könnte wie hier gezeigt möglicherweise das Uhrprotein PER sein. Alles in allem rückt dies p38 ins Zentrum zahlreicher Signalweg, welche circadiane Rhythmen kontrollieren können. In Anbetracht seiner bekannten Rolle in der Stressantwort, könnte p38 darüber hinaus sogar als eine Art Faktor fungieren, der die Antwort auf externe Stimuli von innerer Uhr und Stresssystems miteinander verrechnet. Weitere Studien sind jedoch nötig um diese interessante mögliche Verbindung beider Systeme im Detail weiter zu entschlüsseln.

6 ANHANG

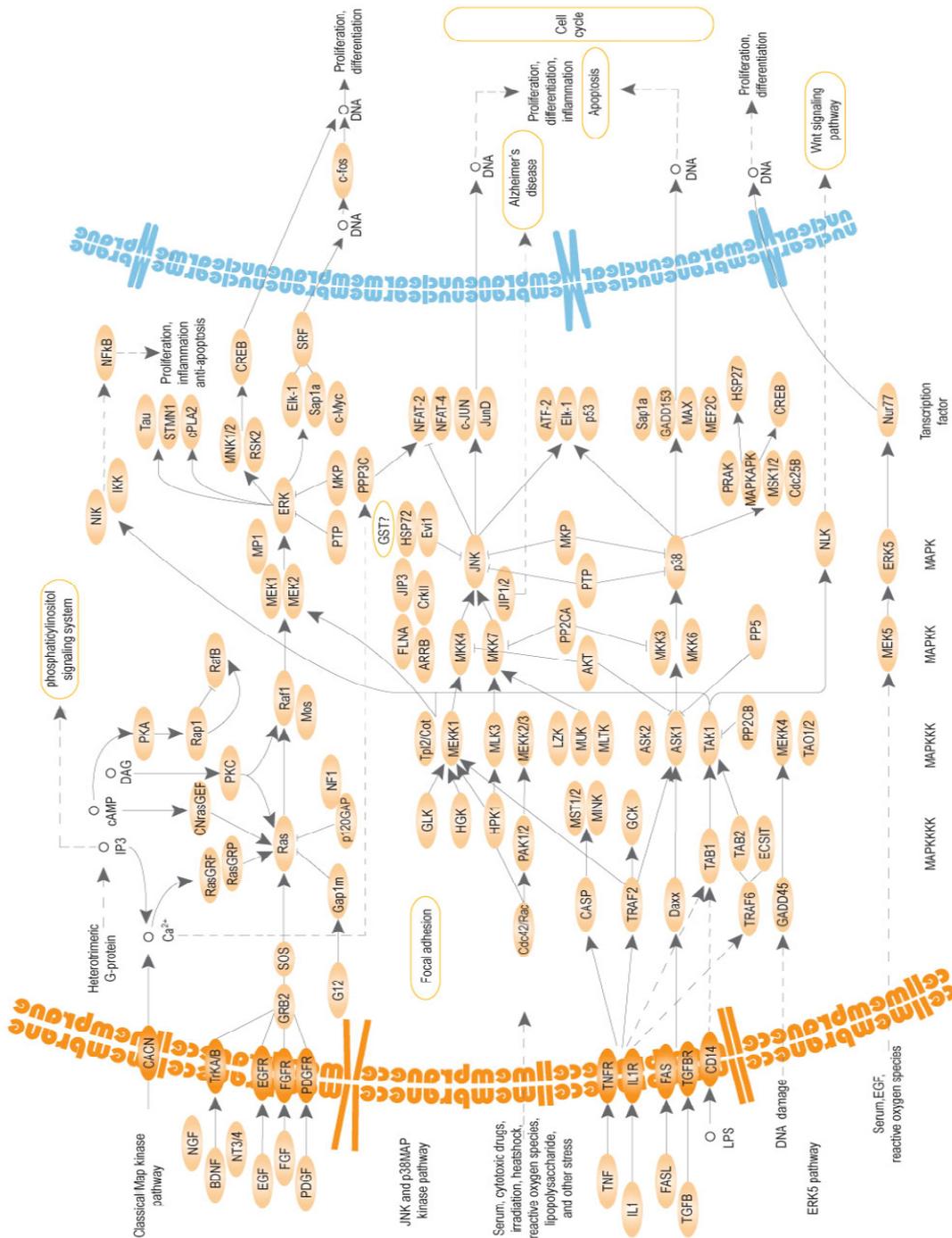


Abbildung A1: MAPK-Signalwege im Säuger (<https://de.wikipedia.org/wiki/MAP-Kinase-Weg>).

Dargestellt sind ERK-, JNK- und p38-Signalweg des Säugers. Gemeinsame Signalwegskomponenten verdeutlichen nicht nur die Komplexität des intrazellulären Kommunikationnetzwerks, sondern lassen auch die Variabilität des Systems und die Möglichkeit zum „Feintuning“ erkennen.

Tabelle A1: Anatomisches Expressionsprofil von *p38a* mRNA in *Drosophila melanogaster* (<http://flyatlas.org>)

Tissue	mRNA Signal	Present Call	Enrichment	Affy Call
Brain	44 ± 2	4 of 4	0.30	Down
Head	96 ± 3	4 of 4	0.60	Down
Eye	86 ± 7	4 of 4	0.56	Down
Thoracoabdominal ganglion	50 ± 1	4 of 4	0.30	Down
Salivary gland	180 ± 18	4 of 4	1.16	None
Crop	441 ± 12	4 of 4	2.90	Up
Midgut	343 ± 12	4 of 4	2.20	Up
Tubule	107 ± 3	4 of 4	0.70	Down
Hindgut	261 ± 11	4 of 4	1.70	Up
Heart	217 ± 15	4 of 4	1.40	Up
Fat body	130 ± 13	4 of 4	0.84	Down
Ovary	260 ± 2	4 of 4	1.70	Up
Testis	165 ± 7	4 of 4	1.10	None
Male accessory glands	98 ± 3	4 of 4	0.60	Down
Virgin spermatheca	81 ± 8	4 of 4	0.53	Down
Mated spermatheca	92 ± 2	4 of 4	0.60	Down
Adult carcass	133 ± 6	4 of 4	0.90	Down
Larval CNS	109 ± 8	4 of 4	0.71	Down
Larval Salivary gland	205 ± 9	4 of 4	1.33	Up
Larval midgut	358 ± 34	4 of 4	2.32	Up
Larval tubule	220 ± 7	4 of 4	1.40	Up
Larval hindgut	344 ± 7	4 of 4	2.23	Up
Larval fat body	190 ± 10	4 of 4	1.20	Up
Larval trachea	311 ± 27	4 of 4	2.01	Up
Larval carcass	241 ± 5	4 of 4	1.56	Up
S2 cells (growing)	365 ± 11	4 of 4	2.37	Up
Whole fly	154 ± 4	4 of 4		

Tabelle A2: Anatomisches Expressionsprofil von *p38b* mRNA in *Drosophila melanogaster* (<http://flyatlas.org>)

Tissue	mRNA Signal	Present Call	Enrichment	Affy Call
Brain	202 ± 4	4 of 4	0.70	Down
Head	221 ± 3	4 of 4	0.80	Down
Eye	267 ± 6	4 of 4	0.99	None
Thoracoabdominal ganglion	214 ± 6	4 of 4	0.80	Down
Salivary gland	540 ± 19	4 of 4	1.99	Up
Crop	468 ± 5	4 of 4	1.70	Up
Midgut	430 ± 16	4 of 4	1.60	Up
Tubule	734 ± 8	4 of 4	2.70	Up
Hindgut	384 ± 7	4 of 4	1.40	Up
Heart	242 ± 4	4 of 4	0.90	Down
Fat body	240 ± 21	4 of 4	0.89	None
Ovary	324 ± 5	4 of 4	1.20	Up
Testis	29 ± 3	4 of 4	0.10	Down
Male accessory glands	288 ± 7	4 of 4	1.10	None
Virgin spermatheca	222 ± 10	4 of 4	0.82	Down
Mated spermatheca	259 ± 9	4 of 4	0.96	None
Adult carcass	276 ± 10	4 of 4	1.00	None
Larval CNS	271 ± 14	4 of 4	1.00	None
Larval Salivary gland	273 ± 6	4 of 4	1.01	None
Larval midgut	504 ± 4	4 of 4	1.86	Up
Larval tubule	574 ± 20	4 of 4	2.10	Up
Larval hindgut	369 ± 16	4 of 4	1.36	Up
Larval fat body	131 ± 10	4 of 4	0.50	Down
Larval trachea	303 ± 7	4 of 4	1.12	Up
Larval carcass	279 ± 7	4 of 4	1.03	None
S2 cells (growing)	346 ± 10	4 of 4	1.28	Up
Whole fly	271 ± 2	4 of 4		

Tabelle A3: Anatomisches Expressionsprofil von *p38c* mRNA in *Drosophila melanogaster* (<http://flyatlas.org>)

Tissue	mRNA Signal	Present Call	Enrichment	Affy Call
Brain	3 ± 0	0 of 4	0.10	Down
Head	20 ± 3	4 of 4	0.60	Down
Eye	8 ± 1	3 of 4	0.25	Down
Thoracoabdominal ganglion	5 ± 0	1 of 4	0.20	Down
Salivary gland	4 ± 2	0 of 4	0.14	Down
Crop	3 ± 1	1 of 4	0.10	Down
Midgut	313 ± 9	4 of 4	9.30	Up
Tubule	319 ± 11	4 of 4	9.50	Up
Hindgut	70 ± 5	4 of 4	2.10	Up
Heart	36 ± 2	4 of 4	1.10	None
Fat body	106 ± 15	4 of 4	3.18	Up
Ovary	3 ± 0	2 of 4	0.10	Down
Testis	2 ± 0	0 of 4	0.10	Down
Male accessory glands	9 ± 2	1 of 4	0.30	Down
Virgin spermatheca	104 ± 3	4 of 4	3.10	Up
Mated spermatheca	147 ± 26	4 of 4	4.38	Up
Adult carcass	38 ± 3	4 of 4	1.10	None
Larval CNS	3 ± 1	2 of 4	0.11	Down
Larval Salivary gland	6 ± 0	0 of 4	0.19	Down
Larval midgut	226 ± 14	4 of 4	6.73	Up
Larval tubule	202 ± 9	4 of 4	6.00	Up
Larval hindgut	71 ± 2	4 of 4	2.12	Up
Larval fat body	169 ± 13	4 of 4	5.00	Up
Larval trachea	2 ± 1	0 of 4	0.06	Down
Larval carcass	5 ± 0	0 of 4	0.16	Down
S2 cells (growing)	191 ± 9	4 of 4	5.68	Up
Whole fly	33 ± 3	4 of 4		

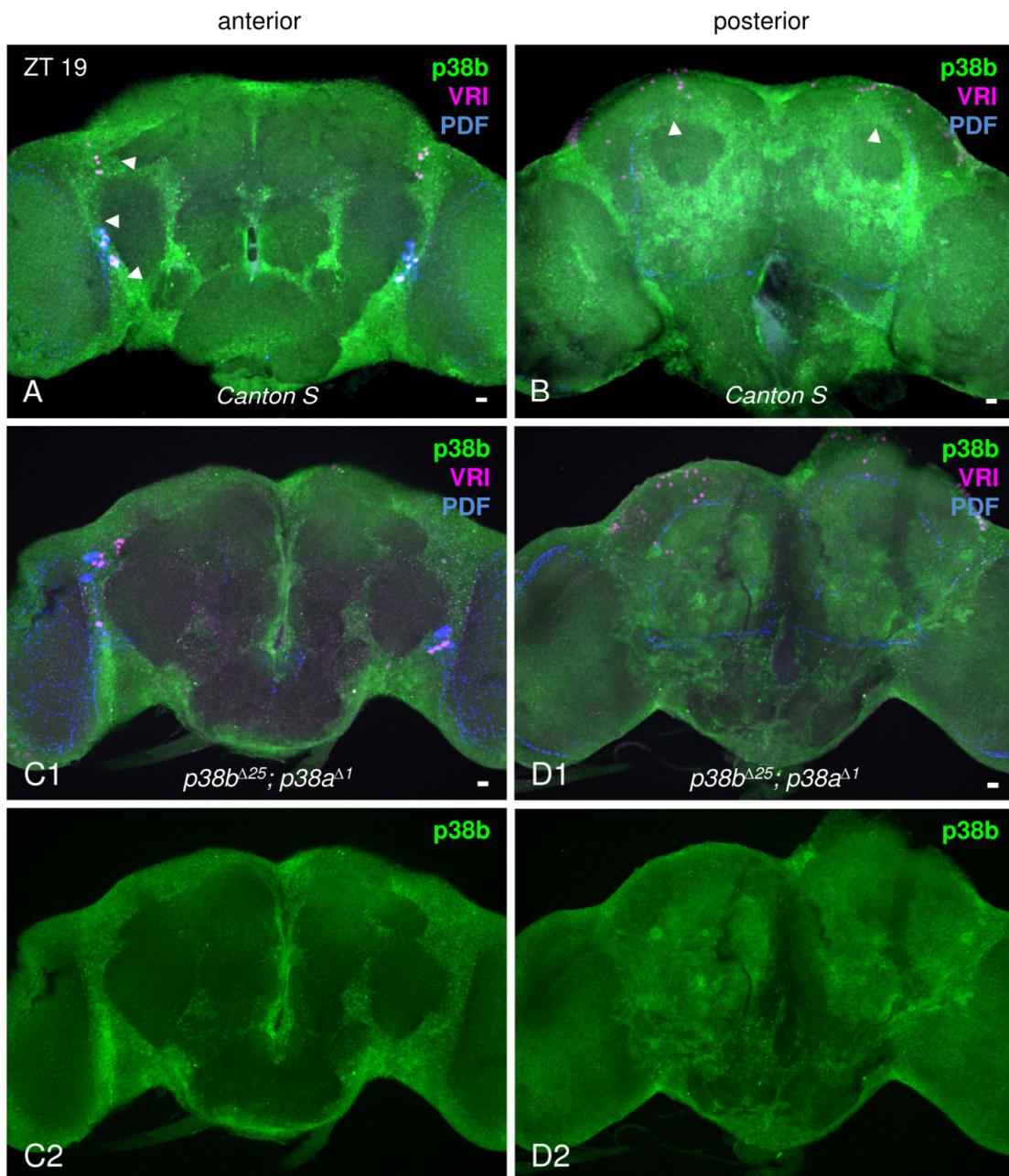


Abbildung A2: p38b-Antikörperfärbung in CS und $p38b^{\Delta 25}; p38a^{\Delta 1}$.

Gezeigt sind repräsentative anteriore (rechts) und posteriore Ansichten von p38b-gefärbten Gehirnen des Wildtyps *Canton S* (A und B) sowie der hypomorphen Doppelknockout $p38b^{\Delta 25}; p38a^{\Delta 1}$ (mittlere C und D) zu ZT19. CS zeigt eine deutliche p38b-Färbung im Bereich zwischen Zentralhirn und optischen Lobus (Pfeile in A) sowie im dorsalen Protocerebrum (Pfeile in B). Diese tritt zu Teilen zwar auch im hypomorphen Kontrollstamm auf, ist aber deutlich weniger schwach ausgeprägt (C und D) und deutet damit auf ein reelles Färbesignal hin. anti-p38b:grün; anti-VRI: magenta; anti-PDF:blau; Maßstab: 10 μ m; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

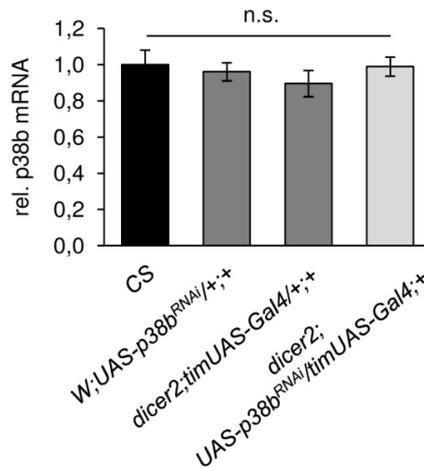


Abbildung A3: *p38b* mRNA Expression in *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/timUAS-Gal4/+;*

Gezeigt sind Standardfehler und zum Wildtyp normalisierte Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten pro Genotyp. Expressionsdaten von *dicer2; UAS-p38b^{RNAi}/timUAS-Gal4/+;* offenbaren keinen sichtbare Reduktion in *p38b* mRNA im Vergleich zum Wildtyp sowie zu den entsprechenden Kontrollen. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind durch „n.s.“ gekennzeichnet.

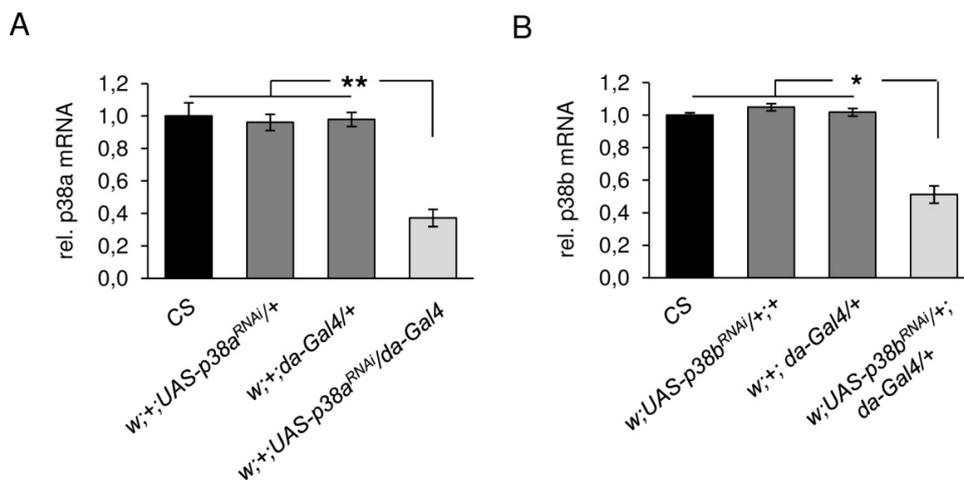


Abbildung A4: *p38a* und *p38b* mRNA Expression in *w; +;UAS-p38a^{RNAi}/da-Gal4* und *w; UAS-p38b^{RNAi}/+; da-Gal4/+;*.

Expressionsdaten von 3 biologischen Replikaten pro Fliegenlinie wurden innerhalb des Genotyps gemittelt und zur wildtypischen Expression normalisiert. Quantitative real-time PCR legen eine hoch signifikante Reduktion in *p38a* mRNA in *w; +;UAS-p38a^{RNAi}/da-Gal4* dar und bestätigen die Effektivität des *p38a^{RNAi}* Transgens (A). Selbes Bild ergibt sich bei Betrachtung *p38b* mRNA in *w; UAS-p38b^{RNAi}/+; da-Gal4/+;* (B). Auch hier spricht die signifikante Reduktion auf 50% der ursprünglichen wildtypischen *p38b* mRNA-Menge eindeutig für die Wirksamkeit des *p38b^{RNAi}* Transgens. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Tabelle A4: Rhythmizität und Freilaufperiode aller in DD aufgezeichneter Genotypen.

Genotyp	<i>n</i>	arrhythmisch ¹ (%)	rhythmisch (%)	Periode (h ± SEM)	Power ² (%V ± SEM)
<i>w;UAS-p38b^{RNAi}/+;+</i>	32	3	97	23,4 ± 0,04	35,4 ± 1,49
<i>dicer2;Pdf-Gal4/+;+</i>	31	0	100	24,3 ± 0,05	38,5 ± 1,84
<i>dicer2;tim(UAS)-Gal4/+;+</i>	32	3	97	24,1 ± 0,06	38,5 ± 1,91
<i>dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/ Pdf-Gal4;+</i>	31	42	58	24,8 ± 0,11	38,3 ± 3,23
<i>dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/ tim(UAS)-Gal4;+</i>	28	93	7	25,3 ± 0,35	42,4 ± 8,00
<i>w;UAS-p38b^{KD3}/+;UAS-p38b^{KD8}/+</i>	31	13	87	23,8 ± 0,04	33,9 ± 1,52
<i>w;Pdf-Gal4/+;+</i>	30	3	97	24,0 ± 0,07	35,6 ± 2,25
<i>w;tim(UAS)-Gal4/+;+</i>	32	0	100	24,1 ± 0,04	40,1 ± 2,05
<i>w;UAS-p38b^{KD3}/ Pdf-Gal4;UAS-p38b^{KD8}/+</i>	32	6	94	25,1 ± 0,07	35,5 ± 1,48
<i>w;UAS-p38b^{KD3}/ tim(UAS)-Gal4; UAS-p38b^{KD8}/+</i>	30	3	97	25,1 ± 0,08	35,6 ± 1,89
<i>UAS-p38b^{DN-S};+;+</i>	32	6	94	24,0 ± 0,04	34,2 ± 1,56
<i>UAS-p38b^{DN-S};Pdf-Gal4/+;+</i>	32	3	97	26,5 ± 0,09	30,0 ± 0,93
<i>UAS-p38b^{DN-S};tim(UAS)-Gal4/+;+</i>	30	3	97	25,9 ± 0,06	34,1 ± 1,93
<i>UAS-p38b⁺;+;+</i>	32	22	78	23,2 ± 0,06	22,2 ± 1,07
<i>UAS-p38b⁺;Pdf-Gal4/+;+</i>	31	0	100	25,3 ± 0,04	35,5 ± 1,85
<i>UAS-p38b⁺;tim(UAS)-Gal4/+;+</i>	29	0	100	25,5 ± 0,06	41,7 ± 2,24
<i>w;+;UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	0	100	23,8 ± 0,05	44,7 ± 2,57
<i>dicer2;Pdf-Gal4/+;UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	0	100	24,6 ± 0,06	47,9 ± 2,62
<i>dicer2;tim(UAS)-Gal4/+;UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	6	94	24,5 ± 0,07	39,1 ± 1,81
<i>dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/+;UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	12	88	23,9 ± 0,05	26,3 ± 1,37
<i>dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/tim(UAS)-Gal4; UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	27	41	59	24,9 ± 0,08	26,3 ± 1,99
<i>w;UAS-p38b^{RNAi}/+; UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	12	88	23,9 ± 0,05	26,3 ± 1,37
<i>dicer2;UAS-p38b^{RNAi}/ tim(UAS)-Gal4; UAS-p38a^{RNAi}/+</i>	32	41	59	24,9 ± 0,08	26,3 ± 1,99
<i>w¹¹¹⁸</i>	32	10	90	23,3 ± 0,07	24,5 ± 1,05
<i>p38a^{Δ1}</i>	29	47	53	23,2 ± 0,10	23,7 ± 1,35
<i>p38b^{pex41}</i>	29	14	86	23,6 ± 0,08	32,4 ± 1,30
<i>p38b^{Δ45}</i>	28	21	79	23,7 ± 0,07	28,3 ± 1,91
<i>p38b^{Δ45}/+; p38a^{Δ1}/+</i>	32	19	81	23,4 ± 0,04	31,2 ± 2,80
<i>p38b^{Δ45}/+; p38a^{Δ1}</i>	32	32	68	23,4 ± 0,07	29,2 ± 2,06
<i>p38b^{Δ45}; p38a^{Δ1}/+</i>	31	13	87	23,4 ± 0,06	25,9 ± 1,03
<i>p38b^{Δ25}; p38a^{Δ1} *</i>	0	-	-	-	-

Pro Genotyp wurden je 32 Fliegen aufgezeichnet. *n* gibt die Anzahl noch lebender Tiere am Ende des Verhaltensexperimentes wieder. Power und Periodenlänge rhythmischer Fliegen wurden mittels χ^2 -Periodogrammanalyse bestimmt, innerhalb eines Genotyps gemittelt und sind mit Standardfehler (SEM).¹ Fliegen mit einer Power < 20 wurden als arrhythmisch deklariert. ² Power ist ein Maß der Rhythmizität und wird als % der Varianz angegeben. * Alle Tiere des hypomorphen Doppelknockoutstamms *p38b^{Δ25}*, *p38a^{Δ1}* verstarben während der Verhaltensaufzeichnungen. Nur insgesamt 2 Fliegen überlebten die ersten 6 Tage in DD – eine Auswertung der DD-Daten war aufgrund des kurzen Aufzeichnungszeitraum jedoch nicht möglich (modifiziert nach Dusik et al., 2014).

Tabelle A5: Mittels Massenspektrometrie identifizierte phosphorylierte Serin- und Threoninreste in der Period Proteinsequenz von *Drosophila melanogaster* (Garbe et al., 2013)

Residue	A-Score	PPase Inhibitor	Predicted Kinase ¹	Residue	A-Score	PPase Inhibitor	Predicted Kinase ¹
S42 ²	<10	PP2A	DBT/CK1	T608 ⁷	10~19	PP2A	Many
S93	>19	PP2A	CK1, AGC, GRK	T610 ^{2,3,5}	>19	None	DBT/CK1
S97 ²	10~19	None	CK1, TKL	S613 ^{3,6}	>19	None	DBT/CK1
S109	>19	PP2A	PKC	T633	10~19	PP2A	GSK3, CDK, MAPK
S149 ²	>19	None	Many, CK1, ATM, IKK	S773 ²	>19	PP2A	Many
S151 ²	>19	None	Many, CK2	T808	>19	PP2A/PP1	Many
S153 ²	>19	None	Many, CK2	S815	>19	PP2A	ATM
S174	>19	PP2A	Many, cdc2, MAPK	S826 ²	10~19	PP2A	Many
S177	>19	PP2A	IKK,	S865	10~19	None	MLK
S199	>19	PP2A	NA	S876 ²	10~19	PP2A	MLK, Wnk
T207	>19	PP2A	MLK, CAMK	T883 ²	>19	PP2A/PP1	Many, cdc2, MAPK, CDK
T219	>19	PP2A	STE,	T1077	>19	PP2A	Many, MAPK
T228	>19	PP2A	STE,	S1080	>19	PP2A	TKL, PKC
S516	>19	PP2A	Many, PKG	S1102	<10	PP2A	Many, CK2
S542	>19	PP2A	Many	S1103 ²	10~19	PP2A	Many, ATM, IKK
T583 ⁴	>19	None	DBT/CK1	S1148	<10	PP2A	AGC, GRK
S585 ^{2,4}	>19	None	DBT/CK1	S1187	>19	None	Many, ATM, MAPK
S596 ^{2,4}	>19	None	NEMO/NLK				

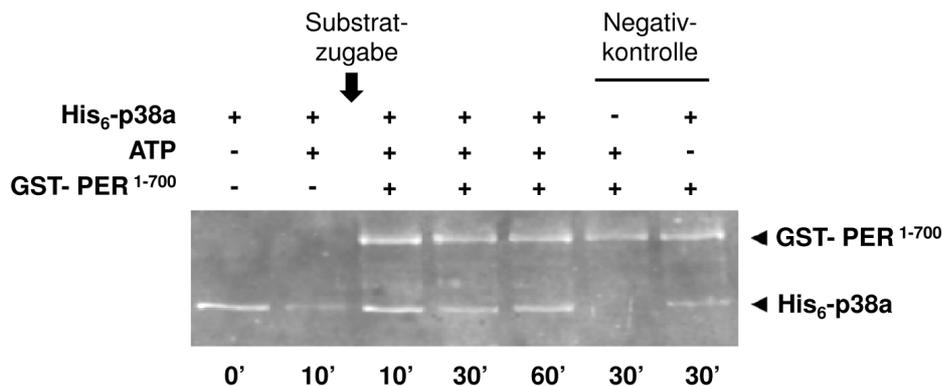


Abbildung A5: *In vitro* Phosphorylierung von GST-PER¹⁻⁷⁰⁰ durch His₆-p38a.

Nicht-radioaktive *in vitro* Kinasensassays mit His₆-p38a und anschließender immunhistochemischer Färbung mit anti-PER und anti-p38 zeigen im Gegensatz zu His₆-p38b keine augenscheinlichen Bandenshifts für GST-PER¹⁻⁷⁰⁰. Durchführung der Phosphorylierungsassays erfolgte wie in Abschnitt 3.4.6 und Abbildung 31 beschrieben. Zahlenwerte unterhalb des Blots repräsentieren Minutenwerte nach Kinasenzugabe bzw. im Fall von Ansatz 2 Minutenwerte nach Zugabe von ATP.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Circadianes und Stress-System sind zwei physiologische Systeme, die dem Organismus helfen sich an Veränderungen ihrer Umwelt anzupassen. Während letzteres spontane und schnelle Antworten auf akute, unvorhersehbare Umweltreize liefert, sagt das circadiane System täglich wiederkehrende Ereignisse vorher und bereitet den Organismus so vorzeitig auf diese nahende Umweltveränderung vor. Dennoch, trotz dieser unterschiedlichen Reaktionsmechanismen agieren beide Systeme nicht komplett autonom. Studien der vergangenen Jahre belegen vielmehr eine Interaktion beider Systeme. So postulieren sie zum einen Unterschiede in der Stressantwort in Abhängigkeit von der Tageszeit zu der der Reiz auftritt und weisen zugleich auf eine Zunahme von gestörten biologischen Tagesrhythmen, wie zum Beispiel Schlafstörungen, in Folge von unkontrollierten oder exzessiven Stress hin. Ebenso liefern kürzlich durchgeführte Studien an Vertebraten und Pilzen Hinweise, dass mit p38, eine Stress-aktivierte Kinase, an der Signalweiterleitung zur inneren Uhr beteiligt ist (Hayashi et al., 2003), sogar durch dieses endogene Zeitmesssystem reguliert wird (Vitalini et al., 2007; Lamb et al., 2011) und deuten damit erstmals eine mögliche Verbindung zwischen Stress-induzierten und regulären rhythmischen Anpassungen des Organismus an Umweltveränderungen an. Molekulare und zelluläre Mechanismen dieser Verknüpfung sind bisher noch nicht bekannt.

Während die Rolle von p38 MAPK bei der Stress- und Immunantwort in *Drosophila melanogaster* gut charakterisiert ist, wurden Expression und Funktion von p38 in der inneren Uhr hingegen bislang nicht untersucht. Die hier vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel mittels immunhistochemischer, verhaltensphysiologischer und molekularer Methoden eine mögliche Rolle der Stress-aktivierten Kinase im circadianen System der Fliege aufzudecken. Antikörperfärbungen sowie Studien mit Reporterlinien zeigen deutliche Färbesignale in den s-LN_v, l-LN_v und DN_{1a} und erbringen erstmals einen Nachweis für p38 Expression in den Uhrneuronen der Fliege. Ebenso scheint die Aktivität von p38 MAPK in den DN_{1a} uhrgesteuert zu sein. So liegt p38 vermehrt in seiner aktiven Form in der Dunkelphase vor und zeigt, neben seiner circadian regulierten Aktivierung, zusätzlich auch eine Inaktivierung durch Licht. 15-Minuten-Lichtpulse in der subjektiven Nacht führen zu einer signifikanten Reduktion von aktivierter, phosphorylierter p38 MAPK in den DN_{1a} von *Canton S* Wildtypfliegen im Vergleich zu Fliegen ohne Lichtpuls-Behandlung. Aufzeichnungen der

Lokomotoraktivität offenbaren zusätzlich die Notwendigkeit von p38 MAPK für wildtypisches Timing der Abendaktivität sowie zum Erhalt von 24-Stunden-Verhaltensrhythmen unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen. So zeigen Fliegen mit reduzierten p38 Level in Uhrneuronen einen verzögerten Beginn der Abendaktivität und stark verlängerte Freilaufperioden. In Übereinstimmung mit Effekten auf das Laufverhalten scheint darüber hinaus die Expression einer dominant-negativen Form von p38b in *Drosophila's* wichtigsten Uhrneuronen eine verspätete nukleäre Translokation von Period zur Folge zu haben. Westernblots legen zusätzlich einen Einfluss von p38 auf den Phosphorylierungsgrad von Period nahe und liefern damit eine mögliche Erklärung für den verspäteten Kerneintritt des Uhrproteins. Abschließende Stützung der Westernblotergebnisse bringen *in vitro* Kinasenassays und deuten auf p38 als eine potentielle „Uhrkinase“ hin, welche auch *in vivo* Period an Serin 661 sowie weiteren potentiellen Phosphorylierungsstellen phosphorylieren könnte. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit eindeutig auf eine bedeutende Rolle von p38, neben dessen Funktion im Stress-System, auch im circadianen System der Fliege hin und offenbaren damit die Möglichkeit, dass p38 als Schnittstelle zwischen beider Systemen fungiert.

8 SUMMARY

The circadian and the stress system are two distinct physiological systems that help the organism to adapt to environmental challenges. While the latter elicits reactive responses to acute environmental changes, the circadian system predicts daily occurring alterations and prepares the organism in advance. However, despite of these differences both responses are not mutually exclusive. Studies in the last years obviously prove a strong interaction between both systems showing a strong time-related stress response depending on the time of day of stressor presentation on the one hand and increased disturbances of daily rhythms, like sleep disorders, in consequence of uncontrolled or excessive stress on the other. In line with this fact, recent studies in vertebrates and fungi indicate that p38, a stress-activated Kinase, is involved in signaling to the circadian clock (Hayashi et al., 2003) and in turn is additionally regulated by this timekeeping system (Vitalini et al., 2007; Lamb et al., 2011) providing an interesting link between stress-induced and regularly rhythmic adaptations of the organism to environmental changes. However, little is known about molecular and cellular mechanisms of this interconnection.

In *Drosophila melanogaster* the role of p38 MAPK is well characterized in terms of immune and stress response, p38 expression and function in the circadian clock has not been reported so far. Therefore, the present thesis aimed to elucidate a putative role of the stress-activated Kinase in the fly's circadian system using an immunohistochemical, behavioral as well as molecular approach. Surprisingly, for the first time antibody as well as reporterline studies clearly prove p38 expression in *Drosophila* clock neurons showing visible staining in s-LN_vs, l-LN_vs and DN_{1a}s. Moreover p38 MAPK in DN_{1a}s seems to be activated in a clock-dependent manner. p38 is most active under darkness and, besides its circadian activation, additionally gets inactivated by light. 15 minutes light pulse applied during the dark phase lead to a significant reduction in phosphorylated and activated p38 MAPK in *Canton S* wildtype flies compared to flies without light pulse treatment. In addition, locomotor activity recordings reveal that p38 is essential for a wild-type timing of evening activity and for maintaining ~24h behavioral rhythms under constant darkness. Flies with reduced p38 activity in clock neurons show delayed evening activity onsets and drastically lengthened the period of their free-running rhythms. In line with these effects on locomotor behavior, the nuclear translocation of the clock protein Period is significantly delayed on the expression of a dominant-

negative form of p38b in *Drosophila's* most important clock neurons. Western Blots reveal that p38 affects the phosphorylation degree of Period, what is likely the reason for its effects on nuclear entry of Period. *In vitro* kinase assays additionally confirm the Western Blot results and point to p38 as a potential "clock kinase" phosphorylating Period at Serin 661 and putative phosphorylation sites.

Taken together, the results of the present thesis clearly indicate a prominent role of p38 in the circadian system of the fly besides its function in stress-input pathways und open up the possibility of p38 MAPK being a nodal point of both physiological systems.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Masumoto K (1999) p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor β superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 19:2322–2329.

Akashi M, Nishida E (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev* 14:645-649.

Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci* 6:251-257.

Akten B, Tangredi MM, Jauch E, Roberts MA, Ng F, Raabe T, Jackson FR (2009) Ribosomal s6 kinase cooperates with casein kinase 2 to modulate the *Drosophila* circadian molecular oscillator. *J Neurosci* 29:466-475.

Allada R, Chung BY (2010) Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 72:605-624.

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93:791-804.

Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y, Fukamizu A (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* 19:519-527.

Bae K, Edery I (2006) Regulating a circadian clock's period, phase and amplitude by phosphorylation: insights from *Drosophila*. *J Biochem* 140:609-617.

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

Bartlang MS, Neumann ID, Slattery DA, Uschold-Schmidt N, Kraus D, Helfrich-Förster C, Reber SO (2012) Time matters: pathological effects of repeated psychosocial stress during the active, but not inactive, phase of male mice. *J Endocrinol* 215:425-437.

Baylies MK, Vosshall LB, Sehgal A, Young MW (1992) New short period mutations of the *Drosophila* clock gene *per*. *Neuron* 9:575-581.

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-1933.

Belozerov VE, Lin ZY, Gingras AC, McDermott JC, Siu KWM (2012) High-resolution protein interaction map of the *Drosophila melanogaster* p38 mitogen-activated protein kinases reveals limited functional redundancy. *Mol Cell Biol* 32:3695-3706.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.

Blanchard FJ, Collins B, Cyran SA, Hancock DH, Taylor MV, Blau J (2010) The transcription factor Mef2 is required for normal circadian behavior in *Drosophila*. *J Neurosci* 30:5855-5865.

Blau J, Young MW (1999) Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99:661-671

Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.

Brown SA, Kowalska E, Dallmann R (2012) (Re)inventing the circadian feedback loop. *Dev Cell* 22:477-487.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18:664-674.

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

Butcher GQ, Lee B, Obrietan K (2003) Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 90:3854-3863.

Butcher GQ, Doner J, Dziema H, Collamore M, Burgoon PW, Obrietan K (2002) The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem* 277:29519-29525.

Chakrabarti S, Poidevin M, Lemaitre B (2014) The *Drosophila* MAPK p38c regulates oxidative stress and lipid homeostasis in the intestine. *PLoS Genet* 10:e1004659

Cheng HY, Obrietan K (2007) Revealing a role of microRNAs in the regulation of the biological clock. *Cell Cycle* 6:3034-3035.

Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, Nakazawa T, Shimizu K, Okamura H, Impey S, Obrietan K (2007) microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 54:813-829.

Chen J, Xie C, Tian L, Hong L, Wu X, Han J (2010) Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20774-20779.

Cheng Y, Hardin PW (1998) *Drosophila* photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without period mRNA cycling. *J Neurosci* 18:741-750.

- Chik CL, Mackova M, Price D, Ho AK (2004) Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 145:5194–5201.
- Chiu JC, Vanselow JT, Kramer A, Edery I (2008) The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock. *Genes Dev* 22:1758-1772.
- Chiu JC, Ko HW, Edery I (2011) NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed. *Cell* 145:357-370.
- Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846.
- Cohen P, Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769-776.
- Cohen P (2002a) The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4:127-130
- Cohen P (2002b) Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309-315.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325:834-840.
- Coogan AN, Piggins HD (2003) Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J Neurosci* 23:3085-3093.
- Cowan KJ, Storey KB (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206:1107-1115.
- Cox DM, Du M, Marback M, Yang EC, Chan J, Siu KW, McDermott JC (2003) Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A. *J Biol Chem* 278:15297-15303.
- Craig CR, Fink JL, Yagi Y, Ip YT, Cagan RL (2004) A Drosophila p38 orthologue is required for environmental stress responses. *EMBO Rep* 5:1058–1063.
- Cully M, Genevet A, Warne P, Treins C, Liu T, Bastien J, Baum B, Tapon N, Leever SJ, Downward J (2010) A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Mol Cell Biol* 30:481-495.
- Cutler S, McCourt P (2005) Dude, where's my phenotype? Dealing with redundancy in signaling networks. *Plant Physiol* 138:558-559
- Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J (2003) vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112:329-441.

Cyran SA, Yiannoulos G, Buchsbaum AM, Saez L, Young MW, Blau J (2005) The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein period. *J Neurosci* 25:5430-5437.

Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* 280:1599-1603.

Davis MM, Primrose DA, Hodgetts RB (2008). A member of the p38 mitogen-activated protein kinase family is responsible for transcriptional induction of Dopa decarboxylase in the epidermis of *Drosophila melanogaster* during the innate immune response. *Mol Cell Biol* 28:4883-4895.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17:4426-4441.

de Paula RM, Lamb TM, Bennett L, Bell-Pedersen D (2008) A connection between MAPK pathways and circadian clocks. *Cell Cycle* 7:2630-2634.

Deuschle M, Schweiger U, Weber B, Gotthardt U, Körner A, Schmider J, Standhardt H, Lammers CH, Heuser I (1997) Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab* 82:234-238.

Dusik V, Senthilan PR, Mentzel B, Hartlieb H, Wülbeck C, Yoshii T, Raabe T, Helfrich-Förster C (2014) The MAP Kinase p38 is part of *Drosophila melanogaster's* circadian clock. *PLoS Genet* 10:e1004565.

Dziema H, Oatis B, Butcher GQ, Yates R, Hoyt KR, Obrietan K (2003) The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 17:1617-1627.

Edey I, Zwiebel LJ, Dembinska ME, Rosbash M (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2260-2264.

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

Engelmann W (2004) Rhythmen des Lebens - eine Einführung anhand ausgewählter Themen und Beispiele. <http://hdl.handle.net/10900/49271>

Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC (1992) Expression of the *period* clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci* 12:3321-3349.

Faux MC, Scott JD (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci* 21:312-315.

- Frisch B, Hardin PE, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC (1994) A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical *per* expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12:555-570.
- Gallego M, Virshup DM (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8:139-148.
- Garbe DS, Fang Y, Zheng X, Sowcik M, Anjum R, Gygi SP, Sehgal A (2013) Cooperative interaction between phosphorylation sites on PERIOD maintains circadian period in *Drosophila*. *PLoS Genet* 9:e1003749.
- Garrington TP, Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:211-218.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schütz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34:245-253.
- Giebultowicz JM, Hege DM (1997) Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature* 386:664.
- Giebultowicz JM (2001) Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1791-1799.
- Glossop NR, Lyons LC, Hardin PE (1999) Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286:766-768.
- Gorka Z, Moryl E, Papp M (1996) Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 54:229-234.
- Grima B, Lamouroux A, Chélot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B, Rouyer F (2002) The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature* 420:178-182.
- Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386:296-299.
- Han SJ, Choi KY, Brey PT, Lee WJ (1998) Molecular cloning and characterization of a *Drosophila* p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:369-374.
- Han ZS, Enslin H, Hu X, Meng X, Wu IH, Barrett T, Davis RJ, Ip YT (1998) A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol* 18:3527-3539.
- Hao H, Allen DL, Hardin PE (1997) A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 17:3687-3693.
- Hardin PE, Hall JC, Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536-540.

Hardin PE (2005) The circadian time-keeping system of *Drosophila*. *Curr Biol* 15:R714-R722.

Hayashi Y, Sanada K, Hirota T, Shimizu F, Fukada Y (2003) p38 mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock. *J Biol Chem* 278:25166-25171.

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

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

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

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

Helfrich-Förster C (2005) Organization of endogenous clocks in insects. *Biochem Soc Trans* 33:957-961.

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

Hériché JK, Lebrin F, Rabilloud T, Leroy D, Chambaz EM, Goldberg Y (1997) Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 276:952-955.

Hermann C, Yoshii T, Dusik V, Helfrich-Förster C (2011) Neuropeptid F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 520:970-987.

Hubbard MJ, Cohen P (1993) On Target with a New Mechanism for the Regulation of Protein Phosphorylation. *Trends in Biochemical Sci* 18:172-177.

Inoue H, Tateno M, Fujimura-Kamada K, Takaesu G, Adachi-Yamada T, Ninomiya-Tsuji J, Irie K, Nishida Y, Matsumoto K (2001) A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *EMBO J* 20:5421-5430.

Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219.

Jarvis BW, Schaefer EM, Miller DT (1997) Detection of JNK, p38 and MAPK enzyme activation using anti-dual-phosphopeptide antibodies: coordinated signaling of the

Extracellular Signal Regulated Protein Kinase (ERK) Superfamily. *Promega Notes Magazine* 63:2-7

Jiang WG, Li SX, Zhou SJ, Sun Y, Shi J, Lu L (2011) Chronic unpredictable stress induces a reversible change of PER2 rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1399:25-32

Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.

Johnson LN, Barford D (1991) The effects of phosphorylation on structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22:199.

Johnson LN (1994) Control by protein phosphorylation. *Nat Struct Biol* 1:657-659.

Johnson LN, Noble MEM, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinase: structural basis for regulation. *Cell* 85:149.

Johnson LN, Richard JL (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical Society Reviews* 101:2209-2242.

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

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

Kato T, Delhase M, Hoffmann A, Karin M (2003) CK2 Is a C-Terminal I κ B Kinase Responsible for NF- κ B Activation during the UV Response. *Mol Cell* 12:829-839.

Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12:186-192.

Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:5037-5044.

Kinoshita C, Miyazaki K, Ishida N (2012) Chronic stress affects PERIOD2 expression through glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation in the central clock. *Neuroreport* 23:98-102

Kivimäe S, Saez L, Young MW (2008) Activating PER repressor through a DBT-directed phosphorylation switch. *PLoS Biol* 6:e183

Klarsfeld A, Malpel S, Michard-Vanhée C, Picot M, Chélot E, Rouyer F (2004) Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci* 24:1468-1477.

- Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, Young MW (1998) The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell* 94:97-107.
- Ko HW, Jiang J, Edery I (2002) Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature* 420:673-678.
- Ko HW, Kim EY, Chiu J, Vanselow JT, 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.
- Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE (1999) Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400:375-378
- Krishnan N, Davis AJ, Giebultowicz JM (2008) Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 374:299-303
- 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 USA* 107:13497-13502.
- Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC (1999) Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 263:825-831.
- Kyriakis JM, Avruch J (1996) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18:567-577.
- Lamb TM, Goldsmith CS, Bennett L, Finch KE, Bell-Pedersen D (2011) Direct transcriptional control of a p38 MAPK pathway by the circadian clock in *Neurospora crassa*. *PLoS One* 6:e27149
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Lee C, Bae K, Edery I (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 19:5316-5325.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867.
- Lee CC (2006) Tumor suppression by the mammalian Period genes. *Cancer Causes Control* 17:525-530.
- Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R (2002) A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420:816-820.

- Lin JM, Schroeder A, Allada R (2005) In vivo circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila* PERIOD. *J Neurosci* 25:11175-11183.
- Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem Sci* 17:114-119.
- Lindsley DL, Grell EH (1968) Genetic variation of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Institution of Washington Publication* 627.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286:785-790.
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105:769-779.
- Miyaji M, Kortum RL, Surana R, Li W, Woolard KD, Simpson RM, Samelson LE, Sommers CL (2009) Genetic evidence for the role of Erk activation in a lympho proliferative disease of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14502-14507.
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR (1995) Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol* 6:682-687.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1:263-273.
- Nakaya M, Sanada K, Fukada Y (2003) Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 305:494-501.
- Obrietan K, Impey S, Storm DR (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci* 1:693-700.
- Otteweller JE, Servatius RJ, Natelson BH (1994) Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. *Physiol Behav* 55:337-340
- Park JH, Hall JC (1998) Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 13:219-228.
- Park JS, Kim YS, Park SY, Yoo MA (2003) Expression of the *Drosophila p38b* gene promoter during development and in the immune response. *Korean J Genetics* 25:243-250.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29:2002-2007.

Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA, Golombek DA (2003) Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 14:1417-1419.

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632-1635.

Pocrnich CE, Liu H, Feng M, Peng T, Feng Q, Hutnik CM (2009) p38 mitogen-activated protein kinase protects human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *Can J Ophthalmol* 44:431-436.

Price JJ, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW (1998) *Double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94:83-95.

Ptacek J, Snyder M (2006) Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet* 22:545-554.

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

Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 19:4337-4348.

Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186.

Roth S, Shaikh AR, Hennelly MM, Li Q, Bindokas V, Graham CE (2003) Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5383-5395.

Rothenfluh A, Abodeely M, Young MW (2000) Short-period mutations of *per* affect a double-time-dependent step in the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol* 10:1399-1402.

Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2:e377.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93:805-814.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY

- Sanada K, Okano T, Fukada Y (2002) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem* 277:267–271.
- Sano Y, Akimaru H, Okamura T, Nagao T, Okada M, Ishii S (2005) Drosophila activating transcription factor-2 is involved in stress response via activation by p38, but not c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Biol Cell* 16:2934-2946
- Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R, Sehgal A (2004) Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116:603-615.
- Sayed M, Kim SO, Salh BS, Issinger OG, Pelech SL (2000) Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 16569-16573.
- Schäfer C, Williams JA (2000) Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *J Gastroenterol* 35:1-9.
- Schieven GL (2009) The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* 9:1038–1048.
- Schmid B, Helfrich-Förster C, Yoshii T (2011) A New ImageJ Plug-in “ActogramJ” for Chronobiological Analyses. *J Biol Rhythms* 26: 464-467.
- Seisenbacher G, Hafen E, Stocker H (2011) MK2-dependent p38b signalling protects hindgut enterocytes against JNK-induced apoptosis under chronic stress. *PLoS Genet* 7:e1002168.
- Sefton BM, Shenolikar S (2001) Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 18:Unit 18.1
- Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R, Ishii S (2011) Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell* 145:1049-1061.
- Shafer OT, Rosbash M, Truman JW (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 22:5946-5954.
- Shafer OT, Helfrich-Förster C, Renn SC, Taghert PH (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol* 498:180-193.
- Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J (2005) Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway. *J Biol Chem* 280:10964-10973.
- Shoup RJ (1966) The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 29:223-249.

Smith JE, Cronmiller C (2001) The *Drosophila* daughterless gene autoregulates and is controlled by both positive and negative cis regulation. *Development* 128:4705-4714.

So WV, Rosbash M (1997) Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO J* 16:7146-7155.

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

Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12:43R-56R.

Stanewsky R, Frisch B, Brandes C, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC (1997) Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene *period* and a lacZ reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. *J Neurosci* 17:676-696.

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

Stark WS, Sapp R (1988) Eye color pigment granules in wild-type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Canadian Journal of Zoology* 66:1301-1308.

Su B, Karin M (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8:402-411

Taghert PH, Shafer OT (2006) Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. *J Biol Rhythms* 21:445-457.

Tangredi MM, Ng FS, Jackson FR (2012) The C-terminal kinase and ERK-binding domains of *Drosophila* S6KII (RSK) are required for phosphorylation of the protein and modulation of circadian behavior. *J Biol Chem* 287:16748-16758.

Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU (2003) Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278:718-723.

Ushijima K, Morikawa T, To H, Higuchi S, Ohdo S (2006) Chronobiological disturbances with hyperthermia and hypercortisolism induced by chronic mild stress in rats. *Behav Brain Res* 173:326-330.

Vanselow K, Vanselow JT, Westermark PO, Reischl S, Maier B, Korte T, Herrmann A, Herzog H, Schlosser A, Kramer A (2006) Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev* 20:2660-2672.

- Vanselow K, Kramer A (2007) Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:167-176
- Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC, Stanewsky R (2003) A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr Biol* 13:1758-1767.
- Vidal S, Khush RS, Leulier F, Tzou P, Nakamura M, Lemaitre B (2001) Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* 15:1900-1912.
- Vitalini MW, de Paula RM, Goldsmith CS, Jones CA, Borkovich KA, Bell-Pedersen D (2007) Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18223-18228.
- Vrailas-Mortimer A, del Rivero T, Mukherjee S, Nag S, Gaitanidis A, et al. (2011) A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in *Drosophila*. *Dev Cell* 21:783–795.
- Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kähäri VM (2001) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol* 21:2373-2383.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.
- Winkler D, Pjrek E, Praschak-Rieder N, Willeit M, Pezawas L, Konstantinidis A, Stastny J, Kasper S (2005) Actigraphy in patients with seasonal affective disorder and healthy control subjects treated with light therapy. *Biol Psychiatry* 58:331-336.
- Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E (1995) Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82:67-76.
- Xu K, Zheng X, Sehgal A (2008) Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*. *Cell Metab* 8:289-300.
- Yagita K, Yamanaka I, Koinuma S, Shigeyoshi Y, Uchiyama Y (2009) Mini screening of kinase inhibitors affecting period-length of mammalian cellular circadian clock. *Acta Histochem Cytochem* 42:89-93.
- Yang Z, Sehgal A (2001) Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29:453-467.
- Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K (2005) Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci* 22:1176-1184.
- Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2008) Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J Comp Neurol* 508:952–966.

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

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J (1999) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 19:21–30.

Zheng X, Yang Z, Yue Z, Alvarez JD, Sehgal A (2007) FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15899-15904.

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Charlotte Förster danken, für das interessante Thema sowie die Möglichkeit diese Arbeit in ihren Arbeitsgruppen an der Universität Regensburg und der Universität Würzburg durchführen zu können. Danke für deine stete Unterstützung, die lehrreichen, wissenschaftlichen Diskussionen, sowie für deinen ansteckenden wissenschaftlichen Enthusiasmus.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Raabe, für die Übernahme des Korreferats sowie seine hilfreichen Tipps bei der Anfertigung meiner Erstpublikation.

Dr. Benjamin Mentzel danke ich herzlich für die PER-Konstrukte und radioaktiven Kinasen-Assays, Dr. Corinna Wülbeck, Dr. Taishi Yoshii und Dr. Pingkalai Senthilan für ihren fachlichen Rat und Hilfestellung in den vergangenen Jahren. Ein weiteres großes Dankschön gilt auch Dr. Subhabrata Sanyal und Dr. Alysia Vrailas-Mortimer für ihre Fliegenlinien und kreativen Anregungen die zu guter Letzt dann doch noch die große Wendung brachten.

Ebenso möchte ich mich bei allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen aus Regensburg und Würzburg für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere Christiane, Mareike, Dennis, Matthias, Pamela, Christa, Flo, Marie, Robin und Irina. Ihr wart nicht nur einmalige Kollegen, sondern seid auch zu richtig guten Freunden geworden. Danke für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors.

Natürlich gebührt mein Dank nicht nur den Kollegen, sondern auch den Freunden und Verwandten, die auch für einen da sind, wenn's mal wieder nicht so läuft. Mein allergrößter Dank gilt daher meinen Eltern, meinen Schwestern und Rudi, weil ihr die komplette Achterbahn der Gefühle miterleben musstet und trotzdem immer für mich da wart.

Zu guter Letzt möchte ich noch Giovanni Trapattoni danken für seine glorreiche Rede die ich an dieser Stelle gerne zitiere...

„Ich habe fertig.“