

Cryptochrom als potentielles Rezeptormolekül für die lichtabhängige Magnetkompassorientierung von Zugvögeln

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Andrea Möller
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2006

D 30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Wiltschko und Prof. Dr. Leo Peichl

Datum der Disputation: 01. Dezember 2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Orientierungsmechanismen beim Vogelzug	1
1.2 Der Magnetkompass der Vögel: ein Inklinationskompass	2
1.3 Der Magnetkompass bei anderen Tieren	3
1.4 Modelle für die Magnetrezeption	4
1.4.1 Magnetrezeption durch biogenes Magnetit.....	4
1.4.2 Magnetrezeption auf der Basis eines Radikalpaar-Mechanismus.....	5
1.4.2.1 Die Retina als Ort der radikalpaar-basierten Magnetrezeption	6
1.4.2.2 Beteiligung der Opsine des visuellen Systems an der radikalpaar-basierten Magnetrezeption	7
1.4.2.3 Cryptochrom als mögliches Rezeptormolekül der radikalpaar-basierten Magnetrezeption.....	8
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	9
2 Molekulargenetische Untersuchungen der Retina von <i>Erithacus rubecula</i> auf mögliches Cryptochrom-Vorkommen.....	11
2.1 Einleitung.....	11
2.1.1 Motivation und Fragestellung	11
2.1.2 Strategie	12
2.1.2.1 Molekulargenetische Methoden	12
2.1.2.2 Sequenzanalysen und Alignment	14
2.1.2.3 Ermittlung der biochemischen Parameter, Analyse der potentiellen Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die Membranständigkeit der CRY-Proteine	14
2.2 Material & Methoden.....	15
2.2.1 Versuchstiere	15
2.2.1.1 Das Rotkehlchen <i>Erithacus rubecula</i> : Lebensdaten und Verbreitung.....	15
2.2.1.2 Das Rotkehlchen <i>Erithacus rubecula</i> : Zugverhalten und Orientierung.....	16
2.2.1.3 Fangdaten und Haltungsbedingungen.....	16
2.2.2 Molekulargenetische Methoden	17
2.2.2.1 Präparation der Retinae.....	17
2.2.2.2 Präparation des Flugmuskels	18
2.2.2.3 DNA-Isolation aus Rotkehlchenflugmuskel.....	18
2.2.2.4 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Erithacus</i> -Retinae und -Flugmuskel.....	19
2.2.2.5 Synthese und Amplifikation der cDNA.....	19
2.2.2.6 Photometrische Analyse der präzipitierten RNA, cDNA und DNA	20
2.2.2.7 PCR-Analysen	20
2.2.2.8 Analyse durch Gel-Elektrophorese	20
2.2.2.9 Aufreinigung der PCR Produkte.....	21
2.2.2.10 Ligation der amplifizierten PCR-Produkte in Transkriptionsplasmidvektoren.....	21
2.2.2.11 Transformation der Vektoren in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Bakterien.....	22
2.2.2.12 Isolation der Plasmide.....	22
2.2.2.13 DNA-Sequenzierung der Produkte	23
2.2.2.14 DNA-Sequenzanalysen und Alignment.....	23

2.2.2.15	First-Round PCR der genomischen DNA zur Gewinnung erster eCRY1 und eCRY2-Produkte	24
2.2.2.16	Synthese von cDNA-Produkten retinaler Cryptochrome durch 5' und 3' RACE.....	24
2.2.2.17	Gesamtamplifikation der zwei eCRY1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b mit Hilfe von <i>Hot Start</i> PCR.....	26
2.2.2.18	Gewinnung genomischer Kodierungs-Regionen von eCRY1a und eCRY1b	27
2.2.3	Methoden der Proteinanalyse	27
2.2.3.1	Ermittlung der biochemischen Parameter der eCRY1-Proteine.....	27
2.2.3.2	Analyse der potentiellen Sekundär- und Tertiärstruktur der eCRY1-Proteine und deren Elemente.....	27
2.2.3.3	Analyse der Membranständigkeit der eCRY1-Proteine mit Hilfe der <i>Dense Alignment Surface</i> -Methode (DAS).....	28
2.3	Ergebnis.....	28
2.3.1	Charakterisierung der retinalen Cryptochromsequenzen	28
2.3.2	Sequenzalignment und Homologieanalysen der C-Termini	29
2.3.3	Charakterisierung der genomischen Kodierungsregionen.....	30
2.3.4	Biochemische Parameter, Sekundär- und Tertiärstruktur, sowie Membranständigkeit der retinalen Cryptochrom-Proteine von <i>Erithacus rubecula</i>	32
2.3.4.1	Biochemische Parameter der eCRY1-Proteine.....	32
2.3.4.2	Potentielle Sekundär- und Tertiärstruktur der eCRY1-Proteine und deren Elemente	33
2.3.4.3	Analyse der Membranständigkeit mit Hilfe der <i>Dense Alignment Surface</i> -Methode	36
2.4	Diskussion.....	37
2.4.1	Existenz von Cryptochrom in der Retina von <i>Erithacus rubecula</i>	37
2.4.2	Das <i>Erithacus</i> -CRY1 Proteinstrukturmodell.....	38
2.4.3	Die spezifische Rolle des CRY C-Terminus	39
2.4.4	Lichtreguliertes intra- und intermolekulares Aktivierungsmodell für <i>Erithacus</i> -Cryptochrom 1.....	40
2.4.5	Ist die C-terminale Domäne von eCRY1b zu kurz für essentielle Funktionen?	43
2.4.6	Die Flexibilität der C-terminalen Domäne spricht möglicherweise für intramolekulares Aktivierungsmodell von eCRY1.....	43
2.4.7	Funktionelle Interaktion zwischen Photolyase-homologer Region und C-Terminus bei Cryptochromen.....	44
2.4.8	Ausblick	45
3	Genexpressionsanalyse von eCRY1a und eCRY1b in der <i>Erithacus</i> - Retina durch quantitative RT-PCR.....	47
3.1	Einleitung.....	47
3.1.1	Motivation und Fragestellung.....	47
3.1.2	Strategie	48
3.1.2.1	Quantitative Reverse-Transkriptions (RT) PCR.....	48
3.1.2.2	Auswahl der Zielfragmente	49
3.1.2.3	Amplifikationsstandard und Kontrolle.....	49
3.1.2.4	Präparatauswahl, -anzahl und Uhrzeiten	49
3.2	Methoden	50
3.2.1	Versuchstiere	50
3.2.2	Präparation der Retinae und des Flugmuskels.....	50
3.2.3	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Erithacus</i> -Retinae und -Flugmuskel	50
3.2.4	Synthese und Amplifikation der cDNA	50
3.2.5	Primersynthese für Cryptochrom- und Aktin-Regionen	51
3.2.6	Quantitative RT-PCR	52
3.2.7	Analyse der quantitativen RT-PCR Daten	52

3.3	Ergebnis.....	54
3.4	Diskussion.....	56
3.4.1	Lateralisation des Magnetkompass beginnt möglicherweise bereits auf Rezeptorebene .	56
3.4.2	Vergleiche mit retinalen CRY1-Expressionsstudien anderer Spezies	58
3.4.3	Ausblick	59
4	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung und immunohistochemische Lokalisation von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von <i>Erithacus rubecula</i>.....	60
4.1	Einleitung.....	60
4.1.1	Motivation und Fragestellung	60
4.1.2	Strategie	62
4.1.2.1	<i>In-situ</i> Hybridisierung	62
4.1.2.1.1	<i>In-situ</i> Hybridisierung mittels mRNA.....	62
4.1.2.1.2	Design der RNA-Sonden.....	62
4.1.2.1.3	Nachweis der mRNA-Sonden im Gewebe.....	63
4.1.2.2	Immunohistochemische Nachweise von eCRY1 in der Rotkehlchen Retina	64
4.1.2.3	Präparatauswahl und Uhrzeiten für mRNA <i>in-situ</i> und Immunohistochemie.....	64
4.2	Material & Methoden.....	65
4.2.1	Versuchstiere	65
4.2.2	Präparation der Retinae	65
4.2.2.1	Retinapräparation und Fixierung für mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung.....	65
4.2.2.2	Retinapräparation und Fixierung für die Immunohistochemie.....	66
4.2.3	Herstellung von Retina-Gefrierschnitten für mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung und Immunohistochemie	66
4.2.4	Material & Methoden für die mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung.....	66
4.2.4.1	Amplifikation der spezifischen Sondenvorlagen mittels PCR.....	66
4.2.4.2	Analyse, Extraktion und Aufreinigung der PCR Produkte aus dem Agarosegel	67
4.2.4.3	Ligation der Sondenvorlage in Transkriptionsplasmidvektoren und Klonierung in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	67
4.2.4.4	Aufreinigung und Sequenzierung der Sondenvorlagen zur Identifikation der Orientierung im Vektor	68
4.2.4.5	<i>In-vitro</i> Transkription und Markierung der RNA mit Digoxygenin zur Synthese von RNA-Sonden	68
4.2.4.6	mRNA <i>in-situ</i> Hybridisierung.....	69
4.2.4.7	Auswertung der Schnitte.....	71
4.2.5	Material & Methoden für die Immunohistochemie.....	71
4.2.5.1	Synthese des polyklonalen Antikörpers	71
4.2.5.2	Spezifitäts- und Eignungstest des Antikörpers.....	72
4.2.5.3	Nachweis von eCRY1b-Protein in der <i>Erithacus</i> -Retina durch Fluoreszenzantikörper (<i>in-situ</i> Protokoll für Immunohistochemie)	72
4.2.5.4	Auswertung der Schnitte.....	73
4.3	Ergebnis.....	73
4.3.1	Aufbau der <i>Erithacus</i> -Retina	73
4.3.2	Retinale Photorezeptoren bei Vögeln	76
4.3.3	mRNA-Expression von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von <i>Erithacus r.</i> am Tag (11 Uhr CET).....	77
4.3.4	mRNA-Expression von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von <i>Erithacus r.</i> in der Dämmerung (17:30 Uhr CET).....	77
4.3.5	Detailvergleich der mRNA-Expression von eCRY1b in den Photorezeptoren von <i>Erithacus r.</i> am Tag und in der Dämmerung.....	78
4.3.6	Lokalisation von eCRY1b-mRNA und -Protein in der Retina von <i>Erithacus r.</i> am Tag (11 Uhr CET) im Vergleich	80

4.3.7	Lokalisation von eCRY1b- <i>mRNA</i> und -Protein in der Retina von <i>Erithacus r.</i> in der Dämmerung (17:30 Uhr CET) im Vergleich	81
4.4	Diskussion	82
4.4.1	Lokalisation der <i>Erithacus</i> -Cryptochrom-1 <i>mRNA</i> und Protein in den Innensegmenten der Photorezeptoren.....	82
4.4.2	Vergleich mit der Cryptochrom 1-Lokalisation in den Retinae anderer Vertebraten	84
4.4.3	Möglicher Interaktionspartner von Cryptochrom in der Vogelretina: Opsin	85
4.4.4	Mögliche Verschaltung der Cryptochromsignale in der Rotkehlchenretina	86
4.4.5	Ausblick	87
5	Gesamtdiskussion	89
5.1	Cryptochrom in der Zugvogelretina weist auf dessen mögliche Beteiligung am Magnetrezeptionsprozess hin	89
5.2	Spezifische Genexpressionsstudien von eCRY1a und eCRY1b weisen auf eine mögliche Lateralisation des Magnetkompass auf Rezeptorebene hin	91
5.3	Lokalisation der <i>Erithacus</i>-Cryptochrom-1 <i>mRNA</i> und Proteine in den Innensegmenten der Photorezeptoren weist auf eine mögliche neuronale Verarbeitung der magnetischen Richtungsinformation analog zum bildverarbeitenden Sehen hin	91
5.4	Cryptochrom als universelles Magnetrezeptormolekül bei der Vermittlung magnetischer Kompassinformation?	92
5.5	Ausblick	95
6	Zusammenfassung	96
7	Summary	98
	Literaturverzeichnis	100
	Abbildungsverzeichnis	111
	Tabellenverzeichnis	113
	Danksagung	114
	Anhang	
	Lebenslauf	
	Publizierte wissenschaftliche Beiträge	
	Versicherung	

Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxy-5-deazaflavin	DIG	Digoxigenin
A	Adenin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Å	Angström	DNase	Desoxyribonuclease
AA	<i>Amino Acid</i>	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Abb.	Abbildung	ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
ACL	<i>Amakrine Cell Layer</i> , Amakrinzellschicht	dTIM	<i>Drosophila</i> TIMELESS-Gen
AK	Antikörper	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
am (#)	Andrea Möller (Nummer des spezifischen Oligonukleotids)	eCRY	<i>Erithacus</i> -Cryptochrom (Cryptochrom des Rotkehlchens <i>Erithacus rubecula</i>)
Amp	Ampicillin	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AP	Alkalische Phosphatase	ELM	<i>External Limiting Membrane</i> ; Äußere Grenzmembran
AS	Aminosäure	EtOH	Ethanol
ATP	Adenosin-Triphosphat	FAD	Flavinadenindinukleotid
atCRY	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Cryptochrom (Cryptochrom der Ackerschmalwand <i>Arabidopsis thaliana</i>)	FCS	Fetales Kälberserum
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	FITC	Fluoreszein (Farbstoff für die Fluoreszenzmikroskopie; emittiert bei Anregung gelb-grünes Licht)
bp	Basenpaar(e)	G	Guanin
C	Cytosin	g	Gramm
cCRY	<i>Chicken</i> -Cryptochrom (Cryptochrom des Haushuhns <i>Gallus Gallus</i>)	GC	<i>Ganglion Cell</i> ; Ganglienzelle
cdNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht	GCL	<i>Ganglion Cell Layer</i> ; Ganglienzellschicht
cds	Codierungssequenz	gCRY	<i>Gallus</i> -Cryptochrom (Cryptochrom des Haushuhns <i>Gallus Gallus</i>)
CET	<i>Central European Time</i> ; Mitteleuropäische Zeit (MTZ)	h	Stunde
COP 1	<i>constitutively photomorphogenic 1</i> (genetischer Locus in <i>Arabidopsis thaliana</i>)	H	hell
COX	Cyclooxygenase (intrazelluläres Enzym der Prostaglandinsynthese)	HCL	<i>Horizontal Cell Layer</i> ; Horizontalzellschicht
CRY	Cryptochrom	HDF	Hydroxy-5-Deazaflavin
C-Terminus	Carboxy-Terminus	ILM	<i>Internal Limiting Membrane</i> ; Epiretinale/Innere Grenzmembran
D	dunkel	INL	<i>Inner Nuclear Layer</i> ; Innere Körnerschicht
Da	Dalton	IPL	<i>Inner Plexiform Layer</i> ; Innere Plexiforme Schicht
DAS	<i>Dense Alignment Surface Method</i>	IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (induziert die Expression am <i>lac</i> -Promotor)
dCRY	<i>Drosophila</i> -Cryptochrom (Cryptochrom der Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i>)	IS	<i>Inner Segment</i> ; Innensegment des Photorezeptors
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser	kb	Kilobasenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat	kDa	KiloDalton
DGC	<i>Displaced Ganglion Cell</i> ; Deplazierte Ganglienzelle		

I	Liter	RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
λ	Wellenlänge	rcf	<i>relative centrifugal force</i> ; relative Zentrifugalkraft
LB	Bakteriennährmedium nach <i>Luria Bertani</i>	RHT	Retirohypothalamischer Trakt
M	mol/l	RNA	Ribonukleinsäure
mCRY	<i>Mouse</i> -Cryptochrom (Cryptochrom der Hausmaus <i>Mus musculus</i>)	rRNA	ribosomale RNA
MgCl₂	Magnesiumchlorid	RNase	Ribonuklease
min	Minute	rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>Messenger RNA</i>)	RPE	<i>Retinal Pigment Epithelium</i> ; Retinales Pigmentepithel
MTHF	Methenyltetrahydrofolat	RT	Raumtemperatur
nBOR	<i>nucleus of the Basal Optic Root</i> ; Kern der basalen Wurzel der optischen Nerven	RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
N-Terminus	Amino-Terminus	sek	Sekunde
NaCl	Natriumchlorid	SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
NBT	Nitroblautetrazolium	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
NFL	<i>Nerve Fibre Layer</i> ; Nervenfaserschicht	T	Thymin
NLS	<i>nuclear localization signal</i>	T_m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
nm	Nanometer	Taq(-Polymerase)	<i>Thermus aquaticus</i> DNA- Polymerase
OD_{260/280}	Optische Dichte bei 260nm bzw. 280nm	TBE	Tris-Borat-EDTA
oligo-dT	Oligodeoxythymidin	TBS(T)	<i>Tris-Buffered-Saline</i> (<i>Triton</i>); Tris-gepufferter Salzlösung (mit Triton versetzt)
ONL	<i>Outer Nuclear Layer</i> ; Äußere Körnerschicht	TE	Tris-EDTA
OPL	<i>Outer Plexiform Layer</i> ; Äußere Plexiforme Schicht	TIM	<i>TIMELESS</i> -Gen
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
OS	<i>Outer Segment</i> ; Außensegment der Photorezeptoren	UTR	nicht translatierte Region (<i>untranslated region</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	UV	Ultraviolett
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	Vol.	Volumen
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D- galactosid (Substrat der β- Galactosidase)
PER	PERIOD-Gen	xCRY	<i>Xenopus</i> -Cryptochrom (Cryptochrom des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>)
PFA	Paraformaldehyd	zCRY	<i>Zebrafish</i> -Cryptochrom (Cryptochrom des Zebrafisches <i>Danio rerio</i>)
PHR	Photolyase Homologe Region	ZT	<i>Zeitgeber Time</i>
pl	Isoelektrischer Punkt (am pl ist das Protein neutral geladen)		
PRL	<i>Phororeceptor Layer</i> ; Retinale Photorezeptoren		

1 Einleitung

Die Umweltbedingungen der meisten Lebewesen unserer Erde sind charakterisiert durch den ständigen Einfluss zweier geophysikalischer Zyklen: Tages- und Jahresperiodik. Eine der zahlreichen Reaktionen auf diese Periodizitäten ist die saisonale Wanderung. Diese kommt bei nahezu allen Gruppen von Lebewesen vor, von Einzellern bis hin zu Vertretern aller Wirbeltierklassen. Orientierungsmechanismen sind die Grundlage für diese Art von Ortswechseln. Die weitaus größte Orientierungsleistung wird in diesem Zusammenhang von Vögeln während ihrer periodisch saisonalen Pendelzüge verlangt.

1.1 Orientierungsmechanismen beim Vogelzug

Die großräumigen Ortsbewegungen im Zusammenhang mit dem Phänomen des Vogelzugs stellen besonders hohe Anforderungen an das Orientierungssystem der Vögel. Alljährlich sind weltweit Zugvögel in der Größenordnung von 50 Milliarden unterwegs, die teilweise Einzelzugstrecken von bis zu 15 000 km zurücklegen (BERTHOLD 1990). Die Mechanismen, die diesen Orientierungsleistungen zugrunde liegen, sind trotz intensiver Forschung bis heute weitgehend ungeklärt.

Im Gegensatz zur Orientierung im Nahbereich, wo lokale Gegebenheiten wie z. B. Landmarken direkt mit dem Ziel assoziiert werden können, muss bei längeren Strecken der Bezug zwischen Aufenthaltsort und Zielort indirekt mit Hilfe externer Referenzsysteme hergestellt werden (vgl. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1999).

Zugvögel verfügen über mindestens drei Kompassse, die ihnen helfen, mit Hilfe externer Bezugssysteme über sinnesphysiologische Prozesse konstante (Soll-)Richtungen einzuhalten: Sonnen-, Stern- und Magnetkompass. Supplementär wird über eine mögliche Rolle von Polarisationsmustern diskutiert, die bei Sonnenauf- bzw. -untergang zur Orientierung genutzt werden können. Die einzelnen Mechanismen stehen jedoch nicht isoliert nebeneinander, sondern müssen als integrierte Komponenten eines multifaktoriellen Systems zur Richtungsorientierung betrachtet werden (Zusammenfassung R. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1999).

Im Gegensatz zu den anderen Kompassmechanismen ist die Orientierung am Magnetfeld der Erde ein angeborener Mechanismus (WILTSCHKO & GWINNER 1974). Diese genetische Veranlagung erscheint sinnvoll, da das Erdmagnetfeld im Vergleich zur Sonne oder Sternen eine zuverlässige omnipräsente Informationsquelle darstellt, für deren Verwendung keine tages- und jahreszeitlichen Bewegungen der Referenzgröße erlernt oder verrechnet werden müssen. Es liegt daher nahe, im Magnetkompass ein besonders

geeignetes System für die unmittelbare Realisierung angeborener Sollrichtungen des Vogelzugs zu vermuten. Aus den oben genannten Gründen ist der Magnetkompass ebenso für Interaktionen mit anderen Kompassen und deren Eichung prädestiniert.

Mittlerweile ist die Rolle des Magnetkompass bei der Erstellung des Sonnenkompass und beim Neueichen des Sternkompass und der Sonnenuntergangsfaktoren belegt (W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1975, R. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1981, BINGMAN 1987, BINGMAN & WILTSCHKO 1988, WILTSCHKO et al. 1998). Ebenso wirkt der Magnetkompass mit der Himmelsrotation bei der Umsetzung der angeborenen Richtungsinformation zusammen (WEINDLER et al. 1997, 1998). Innerhalb des Orientierungssystems adulter Vögel nimmt der Magnetkompass demnach die zentrale Stellung ein (siehe Abb. 1.1). Er kontrolliert die Richtungsbedeutung der Himmelsfaktoren und stellt somit das grundlegende Referenzsystem für die astronomischen Kompassmechanismen dar (ABLE & BINGMAN 1987, WILTSCHKO & WILTSCHKO 1988).

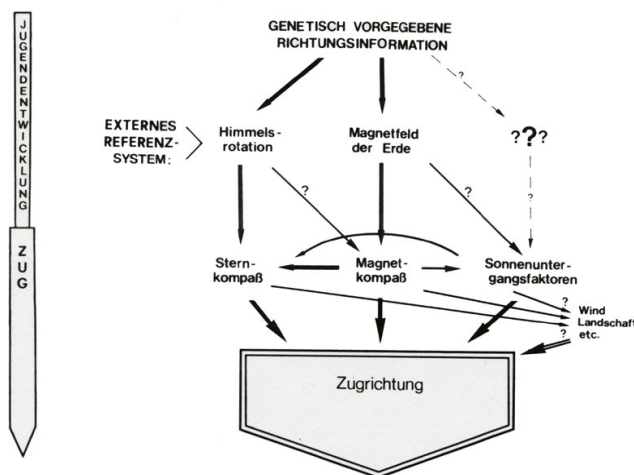


Abb. 1.1: Modell zur Zugorientierung (aus: W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1988). Pfeile geben an, von welchem System auf welche Faktoren Richtungsbedeutung übertragen wird.

1.2 Der Magnetkompass der Vögel: ein Inklinationskompass

Das Funktionsprinzip des Magnetkompasses der Vögel beruht im Gegensatz zu einem technischen Kompass nicht auf der Polarität des Erdmagnetfelds, sondern auf dessen Inklination. Das Magnetfeld der Erde ist ein Vektorfeld, dessen detaillierte Eigenschaften sowie räumliche und zeitliche Variationen in der Arbeit von SKILES (1985) ausführlich beschrieben sind. Für die Kompassorientierung ist letztlich von Bedeutung, dass die Feldlinien, die die Erde in der Südhalbkugel am südlichen magnetischen Pol verlassen und in der Nordhalbkugel am nördlichen magnetischen Pol wieder erreichen, charakteristische,

sich mit der geographischen Breite systematisch ändernde Inklinationwinkel aufzeigen, die an den Polen 90° und am Äquator 0° betragen (siehe Abb. 1.2).

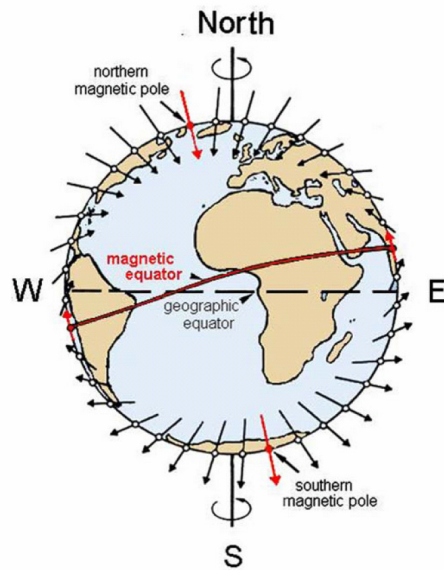


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Magnetfelds der Erde. Die Pfeile geben die jeweilige Richtung der Inklination an, ihre Länge symbolisiert die Totalintensität. Die zwei magnetischen Pole, sowie der magnetische Äquator sind rot gekennzeichnet (aus: R. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1995).

Vögel verwenden diese Neigungswinkel der Feldlinien und deren Verlauf zur Orientierung, weshalb man von einem Inklinationskompass spricht (W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1972, 1995, W. WILTSCHKO et al. 1993). Der Inklinationskompass unterscheidet somit nicht zwischen „Nord“ und „Süd“, sondern liefert den Vögeln die Information „polwärts“ oder „äquatorwärts“, wobei der magnetische Pol bzw. der magnetische Äquator gemeint ist. Vogelarten der Nordhalbkugel und der Südhalbkugel haben aus diesem Grund das gleiche Zugprogramm, das sie veranlasst, im jeweiligen Herbst „äquatorwärts“ zu ziehen (W. WILTSCHKO et al. 1993).

1.3 Der Magnetkompass bei anderen Tieren

Die Verwendung eines biogenen Magnetkompasses bzw. einer Orientierung am Erdmagnetfeld zur Navigation ist außer bei Vögeln für eine Vielzahl von Tiergruppen beschrieben (Zusammenfassung KIRSCHVINK et al. 1985 sowie R. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1995). Allerdings stellt der Magnetkompass zumindest bei den verschiedenen Wirbeltiergruppen offenbar kein einheitliches System dar. Während sich Vögel (W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1972, 1995) und Meeresschildkröten (LOHMANN & LOHMANN 1992, LIGHT et al. 1993) mit Hilfe eines Inklinationskompass orientieren, besitzen Fische (QUINN et al. 1981) und subterrane Säugetiere (MARHOLD et al. 1997) einen Polaritätskompass. Amphibien scheinen sogar beide Mechanismen parallel zu verwenden (PHILLIPS 1986). Bei wandernden Walen wird eine Orientierung nach dem Magnetfeld diskutiert, die auf der magnetischen Topographie beruhen soll (KLINOWSKA 1988).

1.4 Modelle für die Magnetrezeption

Noch immer ist die sensorische Basis des Magnetkompass ungeklärt. Um die Funktionsweise des „Magnetsinns“ zu verstehen, müssen zunächst drei wesentliche Fragen beantwortet werden: 1) Welche Primärprozesse liegen der Rezeption von magnetischer Information zugrunde? 2) Existiert ein „Magnetsinnesorgan“? Falls ja, wie sieht seine Struktur aus, wo ist es lokalisiert und wie ist es nervös verschaltet? und 3) Welche Areale im Gehirn sind für die Verarbeitung der magnetischen Information zuständig?

Für die Wahrnehmung des Erdmagnetfelds müssen zunächst spezielle oder speziell ausgerüstete Rezeptoren im betreffenden Organismus vorhanden sein. Haie und Rochen beispielsweise scheinen das Magnetfeld über ihre Elektrorezeptoren zu perzipieren (KALMIJN 1978). Ein solch vergleichsweise einfaches, leicht lokalisierbares „Magnetsinnesorgan“ ist bei anderen Tiergruppen jedoch offenbar nicht existent.

Im Hinblick auf die Primärprozesse der Magnetfeldwahrnehmung werden zur Zeit zwei Mechanismen maßgeblich diskutiert. Zum einen sind Prozesse im Gespräch, die von permanent-magnetischen Partikeln aus biogenem Magnetit abhängen, zum anderen Reaktionen, die von angeregten Photopigmenten in der Retina ausgelöst oder gesteuert werden (LEASK 1977, YORKE 1979, KIRSCHVINK & GOULD 1981, KIRSCHVINK et al. 1985, SCHULTEN & WINDEMUTH 1986). Im Folgenden werden beide Theorien und bisher dazu durchgeführte Untersuchungen vorgestellt.

1.4.1 Magnetrezeption durch biogenes Magnetit

In der Magnetit-Hypothese werden Primärprozesse angenommen, die auf kleinen Partikeln von Magnetit, einer biogenen Form des Fe_3O_4 , beruhen. Es wird vermutet, dass sich die Magnetitpartikel wie eine Kompassnadel am Magnetfeld ausrichten und so Information auf den Wahrnehmungsapparat übertragen. YORKE (1979) und KIRSCHVINK & GOULD (1981) stellten Hypothesen auf, wie auf solchen Magnetitpartikeln beruhende Rezeptoren arbeiten könnten. Die meisten Modelle beziehen sich auf Einbereichsteilchen (Single-Domain Particles); es gibt aber auch Überlegungen, die kleinere superparamagnetische Partikel vorschlagen (SHCHERBAKOV & WINKLHOFFER 1999).

Bei Vögeln wurde Magnetit erstmals von WALCOTT et al. (1979) nachgewiesen. Eisenreiches Material wurde inzwischen sowohl bei der Taube (HOLTKAMP-RÖTZLER et al. 1997, HANZLIK et al. 2000, FLEISSNER et al. 2003) als auch bei Singvögeln (BEASON & NICHOLS 1984) im Bereich des Oberschnabels gefunden. Bei Forellen konnten in der

entsprechenden olfaktorischen Region des Kopfes ebenfalls Magnetit-Partikel nachgewiesen werden (WALKER et al. 1997).

Elektrophysiologische Untersuchungen an Fasern des ophthalmischen Nervs eines Zugvogels, der die Region um die Magnetit-Ablagerungen innerviert, zeigten, dass diese auf magnetische Reize antworteten (BEASON 1986, SEMM & BEASON 1990). Allerdings reagierten die Neurone nur auf Intensitäts- und nicht auf Richtungsänderungen des Magnetfelds. Ableitungen am korrespondierenden Nerven bei der Forelle zeigten ebenfalls Antworten auf Intensitätsänderungen (WALKER et al. 1997). Versuche, einen auf Magnetit arbeitenden Rezeptor zu beeinflussen, zielten darauf, die Magnetisierung der entsprechenden Partikel zu verändern. Pulsomagnetisierung bewirkte bei Zugvögeln eine Änderung der Vorzugsrichtung, die von der Richtung des Pulses abhing (BEASON et al. 1995). Nach Anästhesie des ophthalmischen Nerven blieben die Vögel vom Pulsen unberührt und zeigten normale Magnetorientierung beim Aufsuchen der Zugrichtung (BEASON & SEMM 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pulsomagnetisierung keinen Effekt auf den Kompassmechanismus hat. Die Ergebnisse der Versuche lassen darauf schließen, dass Vögel und vermutlich auch Fische auf Magnetit basierende Rezeptoren besitzen, die Informationen über die Intensität des Magnetfelds, jedoch keine Kompassinformation liefern. Mit Hilfe solcher Information über Intensitätsunterschiede könnten Vögel im Laufe der Zeit eine „Navigationskarte“ erstellen, mit deren Hilfe sie in der Lage sind, ihre Position zu bestimmen und bekannte Orte erneut aufzusuchen.

1.4.2 Magnetrezeption auf der Basis eines Radikalpaar-Mechanismus

Die Radikalpaar-Hypothese geht von Resonanzphänomenen angeregter Photopigmente im optischen System aus. Sie wurde zunächst von LEASK (1977, 1978) vorgeschlagen und später von SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) sowie RITZ et al. (2000) erweitert und ergänzt. Es wird angenommen, dass die Magnetperzeption über biochemische Prozesse erfolgt, bei denen Makromoleküle im visuellen System (z. B. Rhodopsin oder Iodopsin) in angeregtem Triplett-Zustand in Abhängigkeit von ihrer relativen Lage zur Magnetfeldrichtung reagieren. In Folge dessen werden spezielle Rezeptorstrukturen auf der Retina spezifisch gereizt. Alle Hypothesen gehen davon aus, dass ein Photopigment durch Aufnahme eines Photons in einen angeregten Zustand versetzt wird. Magnetrezeption wäre somit ein lichtabhängiger Vorgang.

LEASK (1977, 1978), der sein Modell „Optical Pumping Model“ nennt, vermutet in erster Linie einen Resonanzeffekt zwischen Schwingungen der jeweiligen Triplettform eines Moleküls im optischen System und der Schwingung des umgebenden Magnetfeldes. Das

optical pumping ist ein Nebenprodukt des normalen Sehprozesses und würde die nicht-polaren Reaktionen auf das Erdmagnetfeld erklären.

Der von SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) und RITZ et. al. (2000) beschriebene Mechanismus ist dem von LEASK ähnlich, nur gehen diese von einer Radikalpaarreaktion aus, die mit dem umgebenden Magnetfeld in Wechselwirkung tritt. Durch Aufnahme eines Photons werden spezialisierte Photopigmente in einen angeregten Zustand versetzt und bilden Singlett-Radikalpaare mit je einem ungepaarten Elektron. Durch Singlet-Triplett-Interkonversion werden angeregte Singlett-Paare in antiparallelem Spin in angeregte Triplett-Paare in parallelem Spin überführt. Das Erdmagnetfeld beeinflusst die Dynamik dieser Umwandlung zwischen antiparallelem und parallelem Spin. Die Ausbeute an Triplets ist abhängig von der Ausrichtung der beteiligten Makromoleküle am Erdmagnetfeld (Abb. 1.3).

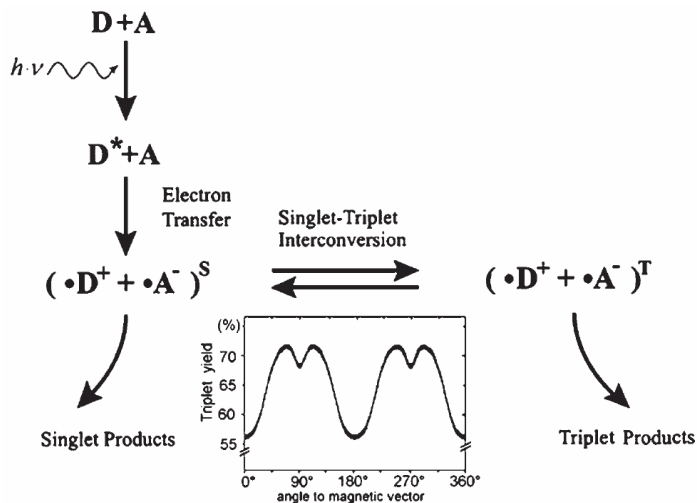


Abb. 1.3: Reaktionsschema des Radikalpaarmechanismus. Nach Anregung durch ein Photon wird durch einen Elektronentransfer von einem Donormolekül (D) zu einem Akzeptormolekül (A) ein Singlett-Radikalpaar (S) gebildet. Letzteres kann durch Singlett-Triplett-Interkonversion in einen Triplett-Zustand (T) übergehen. Dabei ist die Interkonversion und damit die Ausbeute an Triplets abhängig vom umgebenden Magnetfeld. Triplett-Produkte besitzen andere chemische Eigenschaften als Singlett-Produkte und könnten eine Rolle bei der Rezeption der Magnetfeldrichtung spielen (aus: W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 2006)

Da Singlett- und Triplettprodukte unterschiedliche chemische Eigenschaften besitzen, kann über einen Vergleich der Triplettausbeuten in verschiedenen Raumrichtungen magnetische Kompassinformation gewonnen werden. Dieser Mechanismus setzt jedoch voraus, dass entsprechende Rezeptoren in einer bestimmten Anordnung sphärisch fixiert sind.

1.4.2.1 Die Retina als Ort der radikalpaarbasierten Magnetrezeption

Aufgrund ihrer sphärischen Struktur schlagen LEASK (1977) sowie SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) und RITZ et al. (2000) die Retina als Ort der Magnetperzeption vor. Dort könnte sich in Abhängigkeit von der Richtung des Magnetfeldes ein spezifisches Erregungsmuster ergeben, aus dem der Vogel dann die axiale Richtung des Magnetfeldes ableiten könnte (RITZ et al. 2000; vgl. Abb. 1.4).

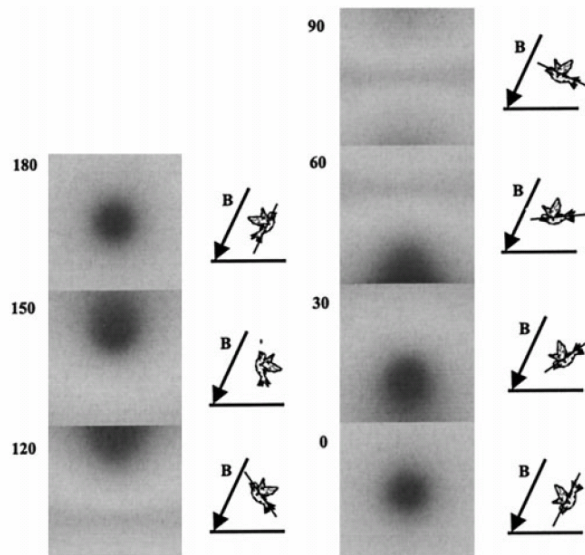


Abb. 1.4: In Abhängigkeit vom Erdmagnetfeld durch Radikalpaarprozesse möglicherweise generierte Erregungsmuster auf der Vogelretina (aus: RITZ et al. 2000). Gezeigt sind die berechneten Muster, die der Vogel „sehen“ könnte, wenn er sich in unterschiedlichen Winkeln (0° , 30° , 60° , 90° , 120° , 150° und 180°) zur magnetischen Inklination (B) befände.

Mit dieser Hypothese in Einklang stehen Befunde elektrophysiologischer Untersuchungen, die zeigen, dass Neurone in bestimmten Bereichen des visuellen Systems von Vögeln, und zwar in den Kernen der basalen Wurzel der optischen Nerven (*nucleus of the basic optic root*, nBOR) und im *tectum opticum* auf Richtungsänderungen des Magnetfelds antworteten (SEMM et al. 1984, SEMM & DEMAINE 1986, BEASON & SEMM 1987). Diese Befunde konnten nur bei Licht und bei intakter Retina erzielt werden. Es ist deshalb nicht unwahrscheinlich, dass Photorezeptoren oder andere retinale Zelltypen im Auge gleichzeitig Magnetfeldrezeptoren sind und dass nBOR und *tectum opticum*, die als visuell richtungsspezifisch identifiziert sind, Informationslieferanten für die Richtung des Magnetfelds sein könnten.

1.4.2.2 Beteiligung der Opsine des visuellen Systems an der radikalpaar-basierten Magnetrezeption

Bei Vögeln finden die entscheidenden Prozesse der Magnetrezeption tatsächlich im Auge statt. Interessanterweise scheinen sie jedoch auf das rechte Auge beschränkt zu sein (WILTSCHKO et al. 2002, 2003). Ob diese starke Lateralisation bereits auf Rezeptorebene oder erst im Gehirn auftritt, ist noch nicht bekannt. Neben dem Beweis für das (zumindest rechte) Auge als Ort der Magnetrezeption gilt mittlerweile auch die Beteiligung eines Radikalpaar-Mechanismus als bewiesen (RITZ et al. 2004).

Trotz dieser Befunde sprechen Verhaltensversuche zur Wellenlängenabhängigkeit der Magnetorientierung gegen eine Beteiligung der normalen Sehpigmente in der Vogelretina (WILTSCHKO & WILTSCHKO 2001, 2002). In diesen Versuchen wurde untersucht, ob Zugvögel unter monochromatischen Lichtern, die den Absorptionsmaxima ihrer vier

Zapfenopsine entsprechen, in der Lage sind, sich am Magnetfeld zu orientieren und ihre angestammte Zugrichtung aufzusuchen. Unter kurzwelligem Licht konnten Vögel dem Erdmagnetfeld Richtungsinformation entnehmen und zeigten orientiertes Verhalten. Im Gegensatz dazu brach ihre Orientierung unter langwelligem Licht zusammen (vgl. Abb. 1.5)

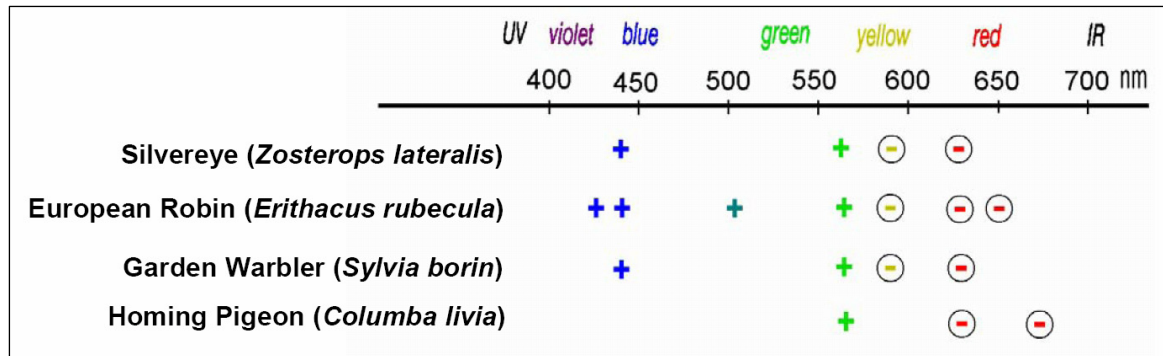


Abb. 1.5: Orientierungsverhalten von vier Vogelarten unter monochromatischen Lichtern unterschiedlicher Wellenlänge (aus: W. WILTSCHKO & WILTSCHKO 2002). Unter dem Spektrum sind die jeweiligen Verhaltensantworten der Arten aufgezeigt: „+“ = in Zugrichtung orientiert, „-“ = desorientiert.

Singvögel besitzen in der Retina jedoch einen Rotlichtrezeptor mit einem Absorptionsmaximum von 620 nm (MAIER 1992, MAIER & BOWMAKER 1993). Sollte die Magnetperzeption direkt an das System der Farbrezeptoren im visuellen System der Vögel gebunden sein, so erscheint fragwürdig, weshalb nachgewiesene Farbrezeptoren im blauen und grünen Bereich Orientierung ermöglichen, ein roter Rezeptor jedoch nicht.

1.4.2.3 Cryptochrom als mögliches Rezeptormolekül der radikalpaarbasierten Magnetrezeption

Aufgrund der offensichtlichen Widersprüche, die eine Beteiligung von Opsinen des visuellen Systems bei der Magnetkompassorientierung aufzeigen, werden Cryptochrome, eine erst kürzlich entdeckte Klasse photoaktiver Pigmente, als potentielle Kandidaten für die radikalpaarbasierte Magnetrezeption diskutiert (RITZ et al. 2000). Obwohl schon seit über einem Jahrhundert Blaulichtantworten von Pflanzen bekannt sind, war die Natur des vermittelnden Photorezeptors bis zur Entdeckung von CRY1 aus Arabidopsis (AHMAD & CASHMORE 1993) „kryptisch“. Dieser Tatsache verdanken Cryptochrome ihren Namen. Cryptochrome haben sich in der Evolution vermutlich aus Photolyasen entwickelt, deren Fähigkeit zur DNA-Reparatur jedoch verloren. Cryptochrome zeigen in weiten Teilen bis heute eine hohe Sequenz-Homologie zu Photolyasen auf, besitzen im Gegensatz zu diesen jedoch C-terminale Extensionen von 22-250 Aminosäuren, für die es keine Entsprechung bei den Photolyasen gibt. Innerhalb der Cryptochrom-Familie sind diese Extensionen wenig konserviert; sie scheinen hauptverantwortlich für die Funktion der einzelnen Cryptochrome zu sein. Cryptochrome wurden bisher hauptsächlich mit der Regulation circadianer

Rhythmen in Verbindung gebracht und sind mittlerweile bei einer Vielzahl von Pflanzen und Tieren nachgewiesen (Zusammenfassung: CASHMORE et al. 1999, SANCAR 2003).

Für die Magnetrezeption sind Cryptochrome deshalb interessant, weil sie chemische Eigenschaften besitzen, die für die Funktion des Radikalpaarmodells entscheidend sind. Erstens können sie im Gegensatz zu Opsinen Radikalpaare bilden (GIOVANI et al. 2003). Zweitens absorbieren sie Licht im kurzwelligen Bereich des Spektrums (SANCAR 1994), unter dem Zugvögel in Verhaltensversuchen in ihre angestammte Zugrichtung orientiert waren (siehe 1.4.2.2). Drittens gelang erst vor einiger Zeit der Erstnachweis von Cryptochrom in der Retina der Maus (MIYAMOTO & SANCAR 1998), seitdem konnte das Pigment auch in der Retina von zwei weiteren Vertebraten nachgewiesen werden (ZHU & GREEN 2001, BAILEY et al. 2002, HAQUE et al. 2002). Die Retina wird aufgrund ihrer sphärischen Struktur als möglicher Sitz des Magnetrezeptors diskutiert (siehe 1.4.2.1). Alle genannten Eigenschaften sprechen für eine mögliche Beteiligung von Cryptochrom als Lieferant von Richtungsinformation für den Magnetkompass.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Noch immer ist nicht geklärt, wie Tiere Richtungsinformationen aus dem Erdmagnetfeld wahrnehmen und verarbeiten, da das Wissen um die mit der Magnetrezeption assoziierten physiologischen und neurobiologischen Prozesse noch zu gering ist. Vor kurzem wurden bei subterranean Nagern jedoch erstmalig Gehirnregionen beschrieben, die vermutlich verantwortlich für die Verarbeitung der Magnetinformation sind (NĚMEC et al. 2000). Auf der Rezeptorebene ist dagegen bis jetzt noch für keine Tierart ein Befund vorzuweisen. Fände man den sensorischen Rezeptor für das Magnetfeld, so wäre man vielleicht in der Lage, einen zusammenhängenden Prozess von der Rezeptorzelle bis hin zur Verhaltensantwort zu beschreiben und so die bisher bekannten neurowissenschaftlichen und funktionell morphologischen mit den ethologischen Ergebnissen zu verknüpfen.

Existiert darüber hinaus ein allgemeiner „Magnetsinn“ für Vertebraten, so würde man ähnliche Perzeptionsmechanismen innerhalb dieser Tiergruppe erwarten. Die bisher beobachteten unterschiedlichen Verhaltensweisen weisen jedoch möglicherweise auf unterschiedliche Rezeptortypen hin. Es wäre also dringend erforderlich, zumindest einen Typus zu beschreiben. Da der Magnetkompass bei Vögeln mit Abstand am besten untersucht ist, erscheint die Suche eines Rezeptortyps bei dieser Tiergruppe am meisten Erfolg versprechend. Eine Vielzahl von Verhaltensexperimenten mit Zugvögeln weist auf einen retinalen Rezeptor hin, der im kurzwelligen Bereich des Spektrums aktiv ist.

Meine Dissertation soll einen wesentlichen Beitrag zur Identifikation und Lokalisation eines lichtabhängigen Rezeptors für die Perzeption des Erdmagnetfelds bei der Wirbeltierklasse der Vögel leisten.

Erstmals soll Cryptochrom, das als Rezeptormolekül für die Radikalpaarbasierte Magnetperzeption diskutiert wird, in der Retina eines Zugvogels nachgewiesen werden. Falls der Nachweis glückt, sollen anschließend mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden erstmals sowohl die Gene als auch die Proteine der in der Zugvogelretina vorkommenden Cryptochrome charakterisiert und auf mögliche Magnetrezeptoreigenschaften hin analysiert werden. Diese Analyse beinhaltet die Erstellung von Proteinstrukturmodellen der putativen Zugvogel-Cryptochrome, die Diskussion möglicher Interaktionspartner und die Ausarbeitung eines lichtregulierten Aktivierungsmodells (siehe Kapitel 2).

Im dritten Kapitel meiner Arbeit diskutiere ich anhand einer von mir durchgeführten Genexpressionsstudie der gefundenen Cryptochrome erstmals, ob die in den Verhaltensexperimenten gezeigte Lateralisation der Magnetrezeption möglicherweise bereits auf Rezeptorebene vorliegt. Darüber hinaus soll die zeitliche Expression der Zugvogel-Cryptochrome über den Tag untersucht werden. Eine verstärkte Produktion von Cryptochrom zur Zeit der Dämmerung, wenn nachziehende Vögel ihre Richtungsentscheidung für den Zug treffen, wäre möglicherweise ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Cryptochrom am Magnetperzeptionsprozess.

Abschließend beschreibe ich im vierten Kapitel die erste Studie zur genauen Lokalisation von Cryptochrom in der Zugvogelretina. Dabei sollen die Zelltypen und möglicherweise deren Kompartimente ermittelt werden, in denen sich die Cryptochrome befinden. Da nicht geklärt ist, ob Cryptochrom-Proteine von ihrem Produktionsort noch weitertransportiert werden, soll sowohl eine Lokalisation der Cryptochrom-*mRNA* als auch des Proteins erfolgen. Mithilfe der genauen Lokalisation kann anschließend die im zweiten Kapitel begonnene Diskussion über mögliche Interaktionspartner von Cryptochrom wieder aufgegriffen werden. Darüber hinaus werden in diesem Kapitel Modelle für die mögliche Verschaltung der Cryptochromsignale in der Zugvogelretina entwickelt.

2 Molekulargenetische Untersuchungen der Retina von *Erithacus rubecula* auf mögliches Cryptochrom-Vorkommen

2.1 Einleitung

2.1.1 Motivation und Fragestellung

Das aktuell diskutierte Modell der Magnetperzeption bei Vögeln schlägt vor, dass die Richtung des Erdmagnetfelds durch Radikalpaarprozesse in spezialisierten Photorezeptoren wahrgenommen wird. Während jedoch der Beweis für das (zumindest rechte) Auge als Ort der Magnetperzeption erbracht werden konnte (W. WILTSCHKO et al. 2002, 2003) und auch die Beteiligung eines Radikalpaar-Mechanismus als bewiesen gilt (RITZ et al. 2004) spricht die in Verhaltensversuchen beobachtete Wellenlängenabhängigkeit der Magnetorientierung gegen eine Beteiligung der vier Opsine in den Zapfen der Vogelretina (WILTSCHKO & WILTSCHKO 2001, 2002).

Stattdessen werden Cryptochrome, eine Klasse photoaktiver Pigmente, die Licht aus dem kurzwelligen Bereich absorbieren, als potentielle Kandidaten für das Radikalpaarmodell und damit als mögliche Magnetrezeptoren diskutiert (RITZ et al. 2000). Cryptochrome zeigen in weiten Teilen eine hohe Sequenz-Homologie zu Photolyasen auf, besitzen im Gegensatz zu diesen jedoch C-terminale Extensionen von 22-250 Aminosäuren, für die es keine Entsprechung bei den Photolyasen gibt. Innerhalb der Cryptochrom-Familie sind diese Extensionen wenig konserviert; sie scheinen hauptverantwortlich für die Funktion der einzelnen Cryptochrome zu sein.

Sollte das Auge tatsächlich der Ort der Magnetperzeption sein, würde man Cryptochrome in erster Linie in der Netzhaut der Vögel vermuten, da sich dort bereits geeignete Rezeptorstrukturen und nachfolgend eine entsprechende neuronale Reizweiterleitung befinden.

Der Erstdnachweis von Cryptochrom in der Retina von Vertebraten gelang 1998 bei Mäusen (MIYAMOTO & SANCAR 1998), seither ist das Pigment auch bei einigen anderen Vertebraten nachgewiesen (ZHU & GREEN 2001, BAILEY et al. 2002, HAQUE et al. 2002). Allerdings beschränkten sich diese Untersuchungen auf die Eigenschaft von Cryptochrom als Teil des circadianen Oszillatorsystems.

Ein Nachweis von Cryptochrom bei Zugvögeln oder anderen wandernden Tieren und damit ein Zusammenhang von Cryptochrom und einer Perzeption des Erdmagnetfelds bei der Magnetkompassorientierung konnte bisher nicht erbracht werden. Aus diesem Grund ist der Erstdnachweis von Cryptochrom in der Zugvogelretina, dessen Beschreibung mit Fokus

auf den C-terminalen Bereich und eine Interpretation möglicher sekundärer und tertiärer *Erithacus*-CRY-Strukturmodelle Gegenstand der Untersuchungen in diesem Kapitel. Sollte Cryptochrom tatsächlich als Magnetrezeptormolekül fungieren, so beschränkt sich seine Funktion allerdings nicht ausschließlich auf Wanderungen über große Entfernungen oder auf den Langsteckenzug, sondern dient ebenfalls der Orientierung im Heimbereich.

Im Rahmen dieses Teils der Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist Cryptochrom in der Retina von *Erithacus rubecula* existent?
2. Falls ja, findet sich sowohl CRY1 als auch CRY2?
3. Finden sich eventuell andere noch unbeschriebene Cryptochromformen in der *Erithacus*-Retina?
4. Handelt es sich im Falle mehrerer Varianten eines CRY-Gens um eigenständige Gene mit unterschiedlichen Loci oder um zwei (oder mehr) Transkripte des gleichen Locus?
5. Wie groß sind die einzelnen Gene oder ihre Varianten und inwiefern unterscheiden sie sich?
6. Wie sind die C-Termini der gefundenen *Erithacus*-Cryptochrome organisiert?
7. Bestehen Homologien zu anderen bereits beschriebenen Cryptochromen?
8. Wie könnten die translatierten Proteine der gefundenen *Erithacus* CRY-Gene aussehen?
9. Ist zu erkennen, ob die *Erithacus*-CRY-Proteine im Zellkern lokalisiert sind?
10. Liegen die CRY-Proteine zytosolisch oder membranassoziiert vor?

2.1.2 Strategie

2.1.2.1 Molekulargenetische Methoden

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden untersucht, ob Cryptochrom in der Retina eines Zugvogels, dem Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*), vorkommt. Dabei wurde zunächst sowohl Gesamt-DNA aus dem Flugmuskel (*Musculus pectoralis*) des Rotkehlchens als auch Gesamt-RNA aus der Retina des Vogels isoliert. Anschließend wurden aus der Gesamt-RNA alle mRNA Moleküle selektiv in stabile Vollängen-cDNA umgeschrieben. Mithilfe eines so entstandenen Pools von rotkehlchenspezifischer retinaler cDNA konnte untersucht werden, welche Cryptochrom-Gentranskripte in den Zellen dieser speziellen Gewebe vorliegen.

Mit Hilfe der in der internationalen Gendatenbank verzeichneten hoch konservierten Teile der Cryptochrom1- und Cryptochrom2-Sequenzen von *Mus*, *Xenopus*, *Gallus* und *Corturnix* wurden degenerierte Cryptochrom-Primersets für CRY1 und CRY2 erstellt. Mit diesen Primern konnten erste CRY1- und CRY2-PCR Produkte aus genomischem *Erithacus*-Cryptochrom amplifiziert werden. Nach einer Optimierung der PCR wurden die Cryptochrom-Produkte kloniert und sequenziert.

Anhand der so ermittelten primären Gensequenzen wurden anschließend rotkehlchenspezifische Cryptochrom-Primer für CRY1 und CRY2 designt. Mit diesen spezifischen *Erithacus*-Primern sowie synthetischen GeneRacer™ 5'/3' Primern (Invitrogen) erfolgte anschließend die Synthese von Vollängen-PCR-Produkten auf cDNA Ebene mit Hilfe einer 5' und 3' RACE-PCR (siehe 2.2.2.16 und Abb. 2.1).

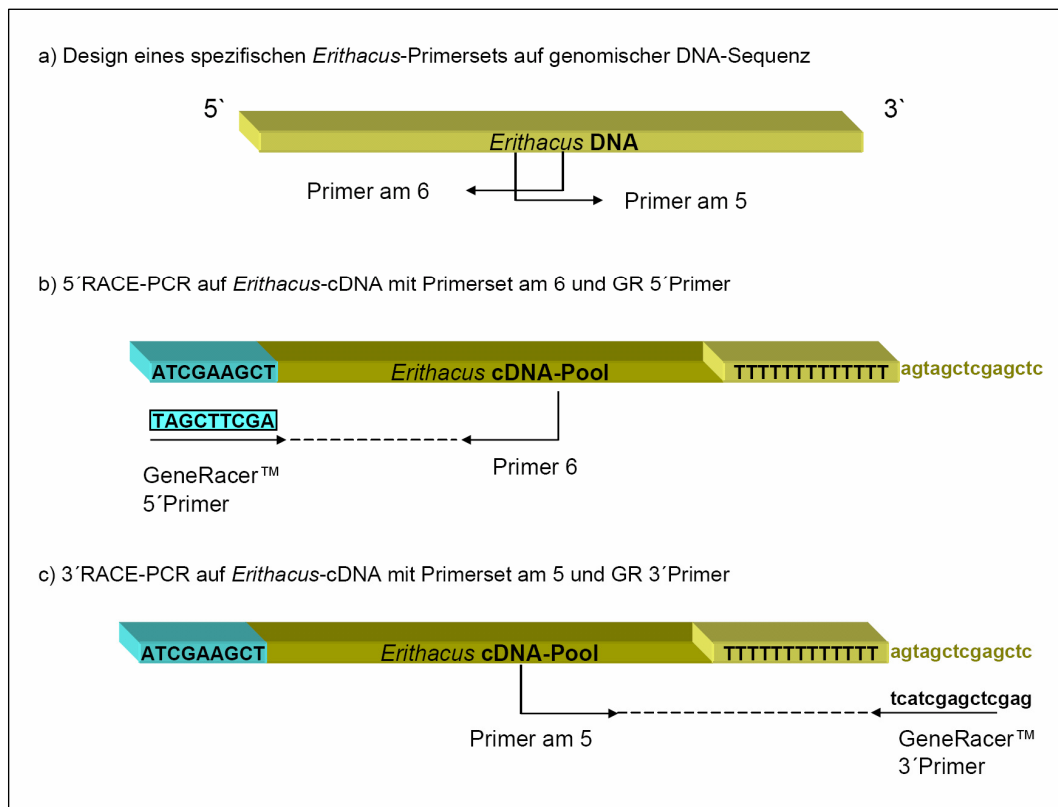


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der 3' und 5' RACE-PCR des *Erithacus* cDNA-Pools mittels genspezifischer Primer am5 und am6 (GR = Gene Racer).

RACE-Fragmente wurden auf Agarosegelen analysiert und anschließend aus diesen extrahiert. Zur Bereitstellung uniformer Sequenziervorlagen wurden die einzelnen RACE PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen der Produkte wurden analysiert, ggf. korrigiert und zu einer Gesamt-Kodierungssequenz (cds) zusammengefügt. Im Anschluss daran wurde zur möglichen Proteinsynthese im Insektenexpressionssystem eine Gesamtamplifikation der gefundenen CRY1-

Spleißvarianten mit Hilfe einer *Hot Start*-PCR durchgeführt (siehe 2.2.2.17). Die ermittelten Sequenzen der gefundenen *Erithacus*-Cryptochromvarianten wurden in die internationale Gendatenbank eingestellt.

Die genomische Kodierungs-Region der isolierten Cryptochrom-Gene wurde mit Hilfe eines *Genome Walker™ Kit (Clontech)* ermittelt. Mit der genomischen DNA konnte überprüft werden, ob es sich bei den gefundenen Cryptochrom 1-Varianten um eigenständige Gene mit unterschiedlichen Loci handelt (vgl. 2.2.2.18).

2.1.2.2 Sequenzanalysen und Alignment

Eine Analyse der unterschiedlichen Cryptochrom-Sequenzen und ein Sequenzalignment konnte Aufschluss über mögliche Homologien der *Erithacus*-CRY1 und 2 Varianten zu anderen bereits beschriebenen Cryptochromen geben (vgl. 2.2.2.14). Dabei wurde der Fokus insbesondere auf die bei Cryptochromen charakteristischen C-terminalen Regionen gelegt.

2.1.2.3 Ermittlung der biochemischen Parameter, Analyse der potentiellen Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die Membranständigkeit der CRY-Proteine

Im Hinblick auf eine zukünftige Produktion sowie Aufreinigung möglicher *Erithacus*-CRY1 und -CRY2 Proteinvarianten wurden die jeweiligen proteinbiochemischen Eigenschaften (z.B. Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt) ermittelt (vgl. 2.2.3.1). Um zu überprüfen, ob die Proteine im Zellkern lokalisiert sind, erfolgte eine Analyse der Aminosäuresequenzen der CRY-Proteine auf etwaige Kernlokalisierungssignale. Des Weiteren wurde ein Proteinmodell erstellt, um die mögliche Sekundär- sowie Tertiärstruktur und deren Elemente aufzuklären (vgl. 2.2.3.2). Anschließend erfolgte eine Analyse der Hydrophathie zur Ermittlung potentieller transmembraner Regionen der einzelnen Proteine (vgl. 2.2.3.3).

2.2 Material & Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Das Rotkehlchen *Erithacus rubecula*: Lebensdaten und Verbreitung



Abb. 2.2: Rotkehlchen
Erithacus rubecula (Foto: C. Noll)

Das Rotkehlchen *Erithacus rubecula* ist systematisch in die Ordnung *Passeriformes* (Sperlingsvögel), die Familie der *Turdidae* (Drosselvögel) und die Unterfamilie *Erithacinae* einzuordnen (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988). Kennzeichen des Vogels ist die satte orangerote Färbung von Stirn, Zügel und Augengegend bis zur Hinterbrust (vgl. Abb. 2.2). Rotkehlchen sind nicht geschlechtsdimorph. Die Gesamtlänge des Vogels beträgt durchschnittlich 138 mm, die Flügelspannweite etwa 22 cm und die Flügellänge beim Männchen liegt zwischen 67 und 79 mm (PÄTZOLD 1995). Das Gewicht des Vogels ist starken jahreszeitlichen und sogar tageszeitlichen Schwankungen unterworfen, es variiert in der Literatur zwischen 12 und 25 g (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988).

Erithacus rubecula besiedelt die westpaläarktische Faunenregion in der borealen, gemäßigten und mediterranen Zone. Das Brutgebiet umfasst Nordafrika von Tunesien bis Marokko, die Inseln im Ostatlantik, ganz Westeuropa einschließlich Britische Inseln, Fennoskandien bis über den Polarkreis, Osteuropa und Westsibirien bis 85°O, sowie Südeuropa, die Türkei, das Kaukasusgebiet bis Nordiran und Gebiete südöstlich vom Kaspischen Meer (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988) (vgl. Abb. 2.3).



Abb. 2.3: Brutareal des Rotkehlchens
Erithacus rubecula (grün markiert)
(verändert nach GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988)

2.2.1.2 Das Rotkehlchen *Erithacus rubecula*: Zugverhalten und Orientierung

Im größten Teil seines Brutgebietes ist das Rotkehlchen ein typischer Teilzieher, in winterkalten Gebieten wie in Skandinavien ziehen alle Vögel. Der Anteil der Standvögel nimmt in Europa nach Süden und Westen zu (BEZZEL & WEIK 1992). Die ziehenden Populationen von *Erithacus rubecula* sind wenig ausgeprägte Zugvögel, deren Wegzug mehr durch Umwelteinflüsse als durch endogene Rhythmen gesteuert wird (BERTHOLD & DORKA 1969).

Erithacus rubecula legt den größten Teil des Zuges nachts zurück. Im Herbst setzt der Zug etwa 2 Stunden nach Sonnenuntergang ein und dauert bis fast zum Sonnenaufgang (PÄTZOLD 1995). Die mittlere Zugleistung pro Nacht liegt zwischen 40-60 km, wobei durchaus auch längere Rastperioden von bis zu 2 Wochen eingelegt werden können (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988). Der Herbstzug beginnt ab Ende August und erreicht Ende September/Anfang Oktober seinen Höhepunkt. Jungvögel ziehen früher als adulte Tiere. Aus Ringwiederfunden lässt sich eine Zugrichtung rekonstruieren, die bei Süd-West (SW) bis Süd-Süd-West (SSW) liegt (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988). Ab Anfang März treffen die Tiere wieder in Mitteleuropa ein, Nachtzügler erreichen ihre Brutplätze im Norden Anfang bis Mitte Mai. Die Zugrichtung für den Frühlingszug liegt bei Nord-Ost (NO) bis Nord-Nord-Ost (NNO) (GLUTZ v. BLOTZHEIM 1988). Die mittlere Zugrichtung freilebender Rotkehlchen im Frühjahr konnte mit Hilfe von Ringwiederfunden mit 16°-18° bestimmt werden (W. WILTSCHKO, pers. Mitt.). Das Zugverhalten mitteleuropäischer Rotkehlchen ist mindestens teilweise genetisch fixiert. Züchtungsexperimente zeigen, dass sich unter den Nachkommen von reinen Zieherpaaren wesentlich mehr Zugvögel befinden, als unter denen von Nichtzieher- oder Mischpaaren. Der Erblichkeitswert des Zugverhaltens bei *Erithacus rubecula* liegt bei 0,52% (BIEBACH 1983).

Bei der Orientierung während des Zuges wirken bei *Erithacus rubecula* Erdmagnetfeld und Sterne zusammen (W. WILTSCHKO 1976). Die Existenz eines Magnetkompasses wurde erstmals beim Rotkehlchen nachgewiesen (MERKEL & WILTSCHKO 1965, WILTSCHKO 1968).

2.2.1.3 Fangdaten und Haltungsbedingungen

Die in dieser Arbeit untersuchten Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) stammen aus drei unterschiedlichen Populationen, die jeweils im September 2001, 2002 und 2003 im Botanischen Garten der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main (50°08'N, 8°40'O) mit Japannetzen gefangen wurden. Die gefangenen Rotkehlchen waren ausnahmslos Jungvögel bzw. diesjährig und befanden sich auf ihrem ersten Zug. Ihre

Entnahme aus der Natur wurde von der unteren Naturschutzbehörde des Landes Hessen genehmigt. Eine detaillierte Aufstellung der Fangdaten und Zuordnung der Vögel zu den einzelnen Versuchen findet sich im Anhang (Seite I-V).



Abb. 2.4: Rotkehlchen im Tierhaus des Biologecampus der J. W. Goethe-Univ.
(Foto: W. Gnatzy)

Alle für diese Arbeit verwendeten Rotkehlchen wurden im Tierhaus des Biologecampus der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Einzelkäfigen gehalten (siehe Abb. 2.4), da *Erithacus rubecula* über ein stark ausgeprägtes Revierbewusstsein verfügt. Der Haltungsraum ist von äußeren Lichteinflüssen abgeschirmt. Temperatur und Luftfeuchtigkeit lagen konstant bei 18°C, bzw. 30%. Die ersten Wochen nach dem Fang wurden die Vögel weiterhin der natürlichen Photoperiode der Jahreszeit ausgesetzt. Im Dezember

wurde die Lichtphase in regelmäßigen Schritten auf acht Stunden verkürzt, so dass das Verhältnis Hell:Dunkel bei 8h H:16h D lag. Im Januar wurde bei den Tieren verfrühte Zugunruhe ausgelöst, indem die Lichtphase in zwei Schritten auf 13 Stunden erhöht wurde 13h H:11h D (13H:11D). Die Lichtphase begann um 4 Uhr früh und endete um 17 Uhr, so dass die zugunruhigen Vögel anschließend ab 17:30 Uhr circa eine Stunde lang in Orientierungsversuchen getestet werden konnten. Um ihr normales Zugverhalten zu verifizieren, nahmen alle in dieser Arbeit untersuchten Vögel an Verhaltensversuchen zur Zugorientierung unter monochromatischen Lichtern in Herbst 2001 und Frühjahr 2002, Herbst 2002 und Frühjahr 2003 sowie Herbst 2003 und Frühjahr 2004 teil (vgl. z.B. WILTSCHKO et al. 2004). Nach Abschluss der jeweiligen Versuchsreihen erfolgten im März die Probenentnahmen für die molekulargenetischen Analysen, die *mRNA in situ*-Hybridisierungsanalysen sowie die immunohistochemischen Untersuchungen.

Alle Rotkehlchen erhielten eine Futtermischung aus handelsüblichem Grasmückenfutter, das mit Kalk, Vitaminen, Eifutter sowie frisch geriebenen Äpfeln und Karotten versetzt wurde. Zusätzlich wurden je nach Gewicht des Rotkehlchens ca. 5 Mehlwürmer dem Futter beigefügt.

2.2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.2.1 Präparation der Retinae

Die Retinaentnahme erfolgte jeweils um 11:00, 17:30, 22:30 und 3:30 Uhr (CET) am 26. März 2002, am 31. März 2003 und am 02. März 2004. Um 11:00 Uhr wurden insgesamt vier Tiere bei Tageslicht mit Ketavet® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid; Curamed/Bayer) betäubt

und anschließend dekapitiert. Die anschließende Präparation der Retina erfolgte ebenfalls unter Tageslichtbedingungen. Alle Arbeitsoberflächen, Präparierbesteck und sonstige Geräte wurden mit Chloroform/Hitzebehandlung oder RNase AWAY® (Molecular Bio-Products) von Ribonukleasen dekontaminiert. Das Auge wurde aus dem Schädel freipräpariert, am Rand des Augenbechers entlang aufpräpariert und Linse sowie Glaskörper entfernt. Anschließend wurde die Retina aus dem Augenbecher herausgeschält, in ein RNase/DNase-freies 1,5ml Plastikreaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingetaucht, bis das Gewebe vollständig durchgefroren war. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Betäubung, Präparation und Dekapitation von vier Tieren um 17:30, und jeweils drei Tieren um 22:30 und 3:30 erfolgte nach demselben Prinzip, nur wurden alle Schritte in völliger Dunkelheit durchgeführt. Die Präparation der Retinae erfolgte unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²). Zur detaillierten Beschreibung der Bedingungen, ausgewählten Vogelnummern, Lagerung der Präparate etc. siehe auch Probenliste im Anhang dieser Arbeit (Seite I-V).

2.2.2.2 Präparation des Flugmuskels

Zur Gewinnung von Rotkehlchen Gesamt-DNA sowie zur cDNA Kontrolle in nachfolgenden Teilen der Arbeit wurde Rotkehlchen-Flugmuskel (*Musculus pectoralis*) verwendet. Zu diesem Zweck wurde im Anschluss an die Retinapräparation bei vier zufällig ausgewählten Rotkehlchen zusätzlich der Brustkorb freipräpariert und ein Stück Flugmuskel des jeweiligen Tieres entnommen. Dieses wurde in ein RNase/DNase-freies 1,5ml Plastikreaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingetaucht, bis das Gewebe vollständig durchgefroren war. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 DNA-Isolation aus Rotkehlchenflugmuskel

Die DNA-Extraktion erfolgte nach einem Standardprotokoll (ENDER UND SCHIERWATER 2003). Ca. 50µg Muskelgewebe aus dem Flugmuskel (*M. pectoralis*) des Rotkehlchens wurden in 500 µl Lysispuffer (100mM Tris pH8.0, 10mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS), versetzt mit 50 µl Proteinase K (Endkonz.: 0.5mg/l) mit Hilfe eines Pistills homogenisiert und 30 min unter Schütteln bei 60°C inkubiert. Die Isolation der DNA von organischen Bestandteilen erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Isomylalkohol-Extraktion (25:24:1). Die genomische DNA wurde mit 2 1/2 Volumen Isopropanol bei 4°C für 30 min präzipitiert, anschließend zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm bei 4°C) und zweimal mit 80% kaltem Ethanol gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 20 µl ddH₂O mit RNase A (Endkonz.: 0.5 mg/ml).

2.2.2.4 Isolation von Gesamt-RNA aus *Erithacus*-Retinae und -Flugmuskel

Gesamt-RNA, d.h. ribosomale RNA (*rRNA*), Transfer-RNA (*tRNA*) und messenger RNA (*mRNA*), wurde mit Hilfe von TRIzol[®] (Gibco BRL/Life Technologies) aus den präparierten Retinae der unterschiedlichen Vögel und Uhrzeiten isoliert. Gleichzeitig erfolgte eine Isolation von Gesamt-RNA aus *Erithacus*-Flugmuskel (*Musculus pectoralis*). Mit TRIzol[®] können RNA, DNA und Proteine aus derselben Probe gewonnen werden, indem die nach CHOMCZYNSKI & MACKEY 1995 beschriebene „single-step“ Methode der RNA-Isolierung angewandt wird.

Auf Trockeneis wurden mit Hilfe von sterilen Rinder-Infusionskanülen Retina- und Flugmuskelstücke von ca. 2 mm³ aus den vorliegenden Gewebeproben herausgebrochen und in ein neues RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Während des Auftauens wurden die Proben in je 1ml TRIzol[®] homogenisiert, bis das Gewebe komplett gelöst war. Anschließend wurde das Homogenat mit 200 µl Chloroform überschichtet und 15 sek gut geschüttelt. Nach darauf folgender Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 15 min mit 12.000 rcf bei 4°C zentrifugiert und die obere RNA-Phase (wässrig) in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte unter Zugabe von 500 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur und nachfolgender Zentrifugation bei 12.000 rcf für 10 min bei 4°C. Anschließend wurde die RNA mit 1ml 70% EtOH in DEPC-H₂O gewaschen und 5 min mit 7500 rcf bei 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das entstandene RNA-Pellet vollständig getrocknet. Resuspendierung erfolgte mit 15 µl DEPC-H₂O mit RNase Out[®] (Invitrogen).

Um eine DNA-Kontamination der Gesamt-RNA Proben auszuschließen, wurde im Anschluss ein 15 minütiger DNase-Verdau mit DNase I (Roche) bei 37°C durchgeführt. Die Integrität der 18S und 28S *rRNA*-Banden als Qualitätskriterium der Gesamt-RNA wurde auf nicht-denaturierenden Agarosegelen (120 V Spannung) überprüft (vgl. 2.2.2.8).

2.2.2.5 Synthese und Amplifikation der cDNA

Da RNA sehr instabil ist und leicht abgebaut werden kann, wurden aus der Gesamt-RNA alle *mRNA* Moleküle (2-4% der Gesamt-RNA) selektiv in stabile Vollängen-cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkription der *mRNA* aus DNaseI (Roche) behandelte Gesamt-RNA der rechten und linken *Erithacus*-Retina der unterschiedlichen Uhrzeiten sowie aus *Erithacus*-Flugmuskelproben erfolgte nach einem Standardprotokoll: Retinale cDNA und Flugmuskel-cDNA wurden mittels 1 µg RNA, oligo-dT(18) Primer (Gene Racer[™], Invitrogen) und 150 U Avian Myeloblastosis Virus (AMV)-Reverse Transkriptase (RT) bzw. SuperScript III (beide: Invitrogen) gemäß Herstellerangaben (Invitrogen) synthetisiert.

2.2.2.6 Photometrische Analyse der präzipitierten RNA, cDNA und DNA

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines GeneQuant Pro Photometers (Pharmacia Biotech) photometrisch bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Von der resuspendierten RNA wird ein Absorptionsspektrum (230-280nm) aufgenommen. Mithilfe der Extinktion bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration (ng/ μ l) bestimmt (SAMBROOK et al. 1989). Einer OD_{260} von 1 entspricht demnach einer Menge von 40 μ g einzelsträngiger RNA. Dasselbe Verfahren wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm ebenfalls zur Analyse der hergestellten retinalen cDNA, sowie der Rotkehlchen-DNA verwendet. Einer OD_{280} von 1 entspricht in diesem Fall eine Menge von 50 μ g doppelsträngiger DNA.

2.2.2.7 PCR-Analysen

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, SAIKI et al. 1988) repräsentiert eine *in vitro*-Amplifikation zur selektiven Anreicherung von Nucleinsäure-Bereichen einer definierten Sequenz. Man nutzt hierfür die Eigenschaften einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*. Der zu amplifizierende DNA-Bereich wird durch die Auswahl von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (*Primern*) bestimmt und mit Hilfe eines Thermocyclers durchgeführt (in dieser Arbeit überwiegend: GeneAmp 9600, Perkin Elmer). Das Protokoll der PCR-Experimente variierte locusspezifisch in der Wahl der verwendeten Primer (*forward* = *f* sowie *reverse* = *r*) und deren spezifischen Hybridisierungstemperaturen (*Annealing*-Temperatur) mit der entsprechenden DNA-Vorlage. Eine Liste aller verwendeten Primer (spezifisch, degeneriert sowie synthetisch) findet sich im Anhang (Seite XXIII - XXIV). Falls nicht anders aufgeführt beinhaltete der Standardreaktionsansatz aller PCR-Reaktionen dieser Arbeit in einem Gesamtvolumen von 25 μ l: 1x Amplifikationspuffer (Roche), 2mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs (Roche), 3-5 pmol Primer (Oligonukleotide), 0.5 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Roche) und 1-10 ng DNA- oder cDNA-Vorlage. Die Reaktion erfolgte in der Regel mit einer zweiminütigen Vordenaturierung bei 94°C, darauf folgen 30-35 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 50-70°C (je nach spezifischem Primer-Schmelzpunkt), 30 sek- 7 min (je nach erwarteter Länge des Produkts) Polymerisierung und Elongation bei 72°C. Allgemeine Standardmaßnahmen zur Vermeidung von Fremd-DNA-Kontamination wurden eingehalten.

2.2.2.8 Analyse durch Gel-Elektrophorese

Zur DNA-Mengenabschätzung sowie zur Auftrennung spezifischer PCR- und Restriktionsprodukte aus genomischer DNA und gewebespezifischer cDNA wurden 0.8-2.0%ige nichtdenaturierende Agarosegele verwendet (Agarose NEEO, Roth), die mit 0.1 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer

(15% Ficol; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylenxyanol) versetzt und in Geltaschen pipettiert. Sämtliche Gel-Elektrophoresen wurden in horizontalen Flachbrettagarosegelen mit 1x TBE-Laufpuffer (100mM Tris, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8.3) durchgeführt. Analog dazu wurde zur Auftrennung von RNA statt TBE ein TAE-Laufpuffer verwendet (100mM Tris, 100 mM Essigsäure, 2 mM EDTA; pH 8.5). Die Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe erfolgte in einem elektrischen Feld von 80 Volt.

Ethidiumbromid interkaliert in DNA bzw. RNA und ermöglicht die Detektion der Nucleinsäuren unter UV-Lichtanregung (312 nm) durch seine orangerote Fluoreszenz. Im Vergleich mit *Hind* III-hydrolysiertes λ -DNA bekannter Konzentration (Gibco BRL) kann eine isolierte DNA-Menge abgeschätzt werden. Die Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen erfolgte über einen Vergleich mit den DNA-Längenstandards 100bp Leiter und 1kb Leiter (Roche). Die elektrophoretische Trennung der DNA mittels angelegter Spannung (Standard: 6Volt/cm) und die photographische Dokumentation der Agarosegele auf einem UV-Transilluminator mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Geldoku, BioRad) ist das Standardverfahren aller in dieser Arbeit verwendeten DNA-Visualisierungen.

2.2.2.9 Aufreinigung der PCR Produkte

Die Aufreinigung der PCR Produkte von überschüssigen Primern und dNTPs erfolgte nach dem Prinzip des Molekularsiebs entweder über Säulenreinigung (Millipore® PCR Produktaufreinigung, Millipore) oder durch Eluation aus ausgeschnittenen Agarosegelstückchen (QIAquick® Gel Extraction Kit, Quiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.10 Ligation der amplifizierten PCR-Produkte in Transkriptionsplasmidvektoren

Alle in dieser Arbeit gewonnenen PCR-Produkte aus genomischer DNA sowie retinaler cDNA des Rotkehlchens wurden zur Bereitstellung uniformer Sequenzvorlagen und zur möglichen Proteinsynthese im Insektenexpressionssystem in Plasmide kloniert. Jeweils 20 ng des über ein gelelektrophoretisches DNA-Eluationsverfahren (QIAquick® Gel Extraction Kit, Quiagen, siehe 2.2.2.9) gereinigten PCR-Produktes wurden gemäß Herstellerangaben (Invitrogen bzw. Promega) in 50 ng pCR-II-Topo®, pCR-4-Topo® (beide Invitrogen) oder pGem T-easy® (Promega) ligiert. Bei den Klonierungs-Systemen beider Hersteller wird statt einer Ligase ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I aktivierter TA-Vektor verwendet. Die Vorteile liegen erstens in der Schnelligkeit der Ligationsreaktion (ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur) und zweitens der Verhinderung der Selbstligation. Alle in dieser Arbeit

verwendeten Transkriptionsvektoren besitzen eine multiple Klonierungssequenz, die von den Promotoren für die Bakteriophagen-RNA-Polymerasen SP6 (*Salmonella*) und T7 (*E.coli*) flankiert wird. Die spezifischen Vektorkarten sind im Anhang dieser Arbeit zu finden (Seite XXVI - XXIX). Darüberhinaus sind alle in dieser Arbeit entstandenen Plasmide, ihre insertierten PCR-Produkte sowie die verwendeten Vektoren der Plasmidliste im Anhang zu entnehmen (Seite XXV - XXVI).

2.2.2.11 Transformation der Vektoren in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien

Die Transformation der Plasmide erfolgte in chemisch kompetenten DH5 α -Bakterien des Stammes *E. coli* (Top10[®] One Shot, Invitrogen). Das Ausplattieren der Zellen auf sterilen Agarplatten (LB-Agar, Firma Roth) unter Zugabe von Ampicillin (1 μ l/ml) X-Gal (80 μ l/ml) und IPTG (0.5 mM) ermöglichte die Blau-Weiß Selektion rekombinanter Bakterienkolonien. Die rekombinanten Kolonien (weiß) wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und über Nacht in autoklaviertem LB-Medium (2g Casein, 1g Hefeextrakt, 1g NaCl pro 200ml, Ampicillin (1 μ l/ml); pH 7.5) bei 37°C vermehrt.

2.2.2.12 Isolation der Plasmide

Die Plasmidisolierung der so erzeugten Übernachtskulturen („Mini-Präparation“, vgl. SAMBROOK et al. 1989) erfolgte mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden jeweils 1 μ l isolierte Plasmid-DNA mit Hilfe eines Restriktionsverdau über Nacht mit dem Enzym *EcoR*1, das die Insertionsstelle einschließt, auf erfolgreiche Insertion überprüft.

Alternativ zu der Mini-Präparation wurden die klonierten DNA-Fragmente mittels einer Bakterien-PCR mit den Plasmidprimern T7 und Sp6 (ggf. M13F-R) direkt vom Plasmid reamplifiziert. Dazu wurden 8-32 rekombinante Bakterienkolonien gepickt, in jeweils 50 μ l ddH₂O für 5 min bei 99°C lysiert und die Bakterienhülle anschließend abzentrifugiert (1500 rpm/5 min). Die Bakterienkolonie-PCR erfolgte mit jeweils 5 μ l Lysatüberstand in 30 Zyklen (siehe Tabelle 2.1). Nach einer Kontrolle über eine Gelelektrophorese wurden die jeweils gewünschten Fragmente über eine Säulenreinigung für die DNA-Sequenzierung aufbereitet.

Tabelle 2.1: PCR-Reaktionsansatz (a) und Zyklus Parameter (b) für eine in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Bakterien-PCR.

a) PCR Reaktionsansatz für Bakterien-PCR (Bac-PCR)	b) PCR Programm Bac-PCR (Zyklus Parameter)
13µl ddH ₂ O	1 Zyklus: 2 min bei 94°C
2,5µl 10x Puffer Mix	35 Zyklen:
2µl MgCl ₂	0:30 min bei 94°C
0,5µl Forward Primer T7/M13f (Invitrogen)	0:30 min bei 50°C
0,5µl Reverse Primer Sp6/M13r (Invitrogen)	0:50 min bei 72°C
1µl dNTPs	1 Zyklus: 5 min bei 72°C
0,25µl Taq Polymerase	∞ bei 10°C
Vorlage: blau-weiss selektierte Bakterienkolonien	

2.2.2.13 DNA-Sequenzierung der Produkte

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von SANGER (1977) jeweils an beiden DNA-Strängen eines Fragments. Unter Verwendung von fluoreszenzmarkierter dNTP wurde das *Cycle Sequencing*-Verfahren in einem Thermocycler durchgeführt. Die Molaritäten der Reaktionskomponenten, sowie Sequenzierungsansatz und PCR-Bedingungen erfolgten gemäß der vom Hersteller (Amersham) empfohlenen Angaben. Die Sequenzierung erfolgte in einem automatischen 96-Kapillarsequenzierer (Amersham, MEGABASE 500). Isolation und Aufreinigung der Sequenzierungsansätze erfolgten ebenfalls gemäß den Vorgaben des Herstellers.

2.2.2.14 DNA-Sequenzanalysen und Alignment

Die gewonnenen DNA-Sequenzen wurden computergestützt mit Hilfe des Programmes SeqMan™ (DNASTar) ausgewertet. Vorhandene Sequenzen wurden mit unterschiedlich stringenten Parametern untereinander ausgerichtet und anschließend manuell editiert. Der erste Sequenzvergleich (*Alignment*) der Rotkehlchencryptochrom-Sequenzen erfolgte mit der zu dieser Zeit in der Genbank vorhandenen Cryptochrom-Sequenzen von *Gallus gallus* (GenBank Accession-Nr.: AAK61385), *Mus musculus* (NM007771, NM009963) und *Xenopus laevis* (BC076838). Vollständige Cryptochrom-Sequenzen wurden mit dem gleichen Verfahren auf mögliche Homologien mit Cryptochrom-Genen anderer Organismen aus der internationalen Gendatenbank (*GenBank* unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen.

2.2.2.15 First-Round PCR der genomischen DNA zur Gewinnung erster eCRY1 und eCRY2-Produkte

Mit Hilfe der in der internationalen Gendatenbank verzeichneten hoch konservierten Teilen der Cryptochrom 1- und Cryptochrom 2-Sequenzen von *Mus* (CRY1:NM007771, CRY2:NM009963), *Xenopus* (BC076838, BC077381), *Gallus* (AAK61385, AAL46564) und *Coturnix* (AF363632, AF363633) wurden degenerierte Cryptochrom-Primersets für CRY1 und CRY2 entwickelt (siehe Tabelle 2.2). Mit diesen Primern konnten erste PCR Produkte aus genomischem *Erithacus*-Cryptochrom (siehe 2.2.2.3) amplifiziert, kloniert und sequenziert werden (siehe auch Plasmidliste im Anhang Seite XXV - XXVI).

Tabelle 2.2: Degenerierte Primersets für CRY 1 und CRY 2 für die First-Round PCR genomischer DNA

Degeneriertes Primerset für CRY 1	
Forward Primer: am1 5- GAC CTS TGG ATY AGY TGG GAA GAA GGR ATG AAG GT -3	Reverse Primer: am2 5- GCA TGG TTY ACC ATT GGT TGG GAT ART TRA CTC -3
Degeneriertes Primerset für CRY 2	
Forward Primer: am34 5- GGC CMT CRT BAG CCG HAT GGA -3	Reverse Primer: am35 5- ATC CAB CCY TCC TGH CTC AGT TG -3

2.2.2.16 Synthese von cDNA-Produkten retinaler Cryptochrome durch 5' und 3' RACE

Die Methode der *rapid amplification of cDNA ends* oder auch RACE-PCR ermöglicht die Vervollständigung der Sequenzen von Transkripten mit unbekanntem Sequenzen am 5' oder 3'-Ende, ausgehend von einer bekannten spezifischen Sequenz (vgl. FROHMANN 1988).

Die 3' RACE-PCR beginnt mit einer cDNA-Erststrangsynthese, bei der ein bestimmter oligo(dT)-Primer (hier: GeneRacer™, Invitrogen) zur Verwendung kommt, der im Bereich des poly(A)-Schwanzes der mRNA-Moleküle hybridisiert. Nach Abbau des RNA-Stranges durch das Enzym RNase H wird durch eine zweite PCR, in der ein sequenzspezifischer Primer verwendet wird, selektiv der DNA-Bereich zwischen dem oligo(dT)-Schwanz und der spezifischen Sequenz amplifiziert. Auf diese Weise können unbekannte Sequenzbereiche einer mRNA, die in 3'-Richtung von der bekannten spezifischen Primer-Sequenz liegen, analysiert werden. Ähnlich wird bei der 5' RACE-PCR vorgegangen, mittels derer Sequenzbereiche in 5' Richtung von einer bereits bekannten mRNA-Sequenz analysiert werden können (siehe Abb. 2.5).

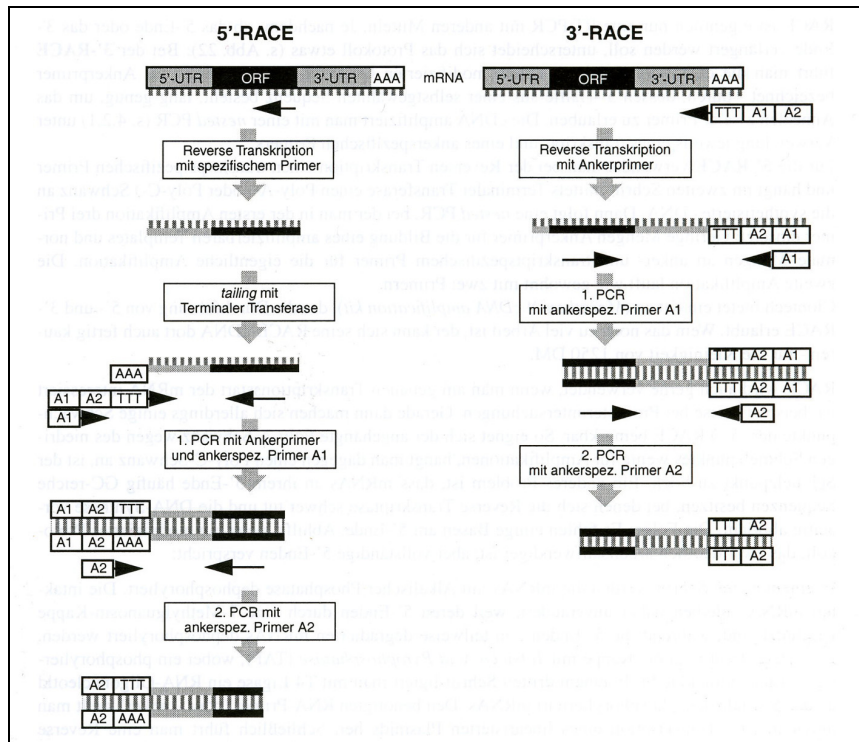


Abb. 2.5: Prinzip der 3' und 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends)
 (aus: MÜLHARDT 2002)

Nach Auswertung der unter 2.2.2.15 gewonnen spezifischen *Erithacus*-DNA Sequenzen wurden erste *Erithacus*-Cryptochromprimersets für eCRY1 und eCRY2 entwickelt. Unter Verwendung dieser sowie dem entsprechenden synthetischen GeneRacer™ Primersset (Invitrogen) wurden beide beschriebenen RACE-Techniken nach Angaben des Herstellers auf *Erithacus* cDNA angewandt (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Primersets zur Verwendung bei 5' und 3' RACE-PCR auf retinaler *Erithacus*-cDNA

Spezifisches Primersset für CRY 1	
Forward Primer: am5 5-AGA GCT GTT ACT TGA TGC AGA TTG GA-3	Reverse Primer: am6 5-TTG CAG CCT TCT GGA TGC TCT CTG-3
Spezifisches Primersset für CRY 2	
Forward Primer: am39 5-CCA AAG AAG CCA GTC AGC A-3	Reverse Primer: am40 5-GGA AAG CCC AGC TCT TCC A-3
GeneRacer™ Primersset (Invitrogen)	
Forward Primer: GeneRacer 5'Primer 5-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3	Reverse Primer: GeneRacer 3'Primer 5-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3

Die aus den RACE-PCR entstandenen cDNA Produkte der eCRY1-Spleißvarianten und eCRY2 wurden zur Bereitstellung uniformer SequenzierVorlage und zur möglichen

Proteinsynthese im Insektenexpressionssystem kloniert und sequenziert. Die Sequenzen der einzelnen Produkte wurden wie unter 2.2.2.14 angegeben analysiert, ggf. korrigiert und zu einer Gesamt-cds (*cds*= Coding Sequence) zusammengefügt. Einige Klone wurden anschließend beispielsweise zur Synthese von RNA-Sonden zur *in-situ* Hybridisierung der Retina verwendet (vgl. Kapitel 4).

2.2.2.17 Gesamtamplifikation der zwei eCRY1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b mit Hilfe von *Hot Start* PCR

Für eine mögliche Proteinsynthese beispielsweise im Insektenexpressionssystem der beiden eCRY1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b ist idealerweise die Amplifikation der Vollängen-cDNA der entsprechenden Gene nötig. Dies gelang erst mit Hilfe einer speziellen *Hot Start*-Technik und einer entsprechenden Polymerase (*Hot Start*TM, Roche).

Zu Beginn einer PCR kommt es aufgrund der anfänglich noch niedrigen Temperaturen möglicherweise zu unerwünschten Effekten, wie einer Fehlhybridisierung der Primer oder Primerdimerbildung, die im weiteren Verlauf zu schlechten Ausbeuten oder unspezifischen Produkten führen. Durch einen *Hot Start* kann diesen entgegengewirkt werden, indem eine oder mehrere wichtige Komponenten erst zugefügt werden, wenn die Arbeitstemperatur erreicht ist. In dem hier verwendeten Ansatz wurde zunächst die cDNA der PCR-Mix zunächst 3 Minuten bei 96°C denaturiert, anschließend auf Eis gelagert, um dann direkt in den auf Eis gekühlten Reaktionsansatz pipettiert zu werden (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: *Hot Start* PCR-Reaktionsansatz für Vollängen-Amplifikation der zwei Cryptochrom 1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b

PCR Reaktionsansatz für Vollängen-Amplifikation eCRY1a	PCR Reaktionsansatz für Vollängen-Amplifikation eCRY1b	PCR Programm (Zyklus Parameter)
16,2µl ddH ₂ O	16,2µl ddH ₂ O	1 Zyklus: 4 min bei 96°C
2,5µl 10x Puffer Mix	2,5µl 10x Puffer Mix	45 Zyklen:
2µl MgCl ₂	2µl MgCl ₂	0:30 min bei 96°C
1µl Forward Primer am16 (Möller)	1µl Forward Primer am18 (Möller)	0:33 min bei 60°C
1µl Reverse Primer am17 (Möller)	1 µl Reverse Primer am19 (Möller)	5:00 min bei 72°C
1µl dNTPs	1 µl dNTPs	1 Zyklus: 7 min bei 72°C
0,3µl <i>Hot Start</i> TM Taq Polymerase (Roche)	0,3µl <i>Hot Start</i> TM Taq Polymerase (Roche)	∞ bei 10°C
Vorlage: 1 µl cDNA-Pool <i>Erithacus</i> -Retina 17:30	Vorlage: 1 µl cDNA-Pool <i>Erithacus</i> -Retina 17:30	

2.2.2.18 Gewinnung genomischer Kodierungs-Regionen von eCRY1a und eCRY1b

Die genomischen Kodierungsregionen von eCRY1a und eCRY1b wurden mit Hilfe eines Genome Walker™ Kits (Clontech) und vier rotkehlchenspezifischen Primern nach Herstellerangaben ermittelt (siehe Tabelle 2.5). Die *Genome Walker*-Methode ermöglicht es, ausgehend von einer bekannten Sequenz wie z.B. einer cDNA, auf einer ungeklonten DNA eines Organismus *upstream* oder *downstream* zu „wandern“, d.h. PCR-Produkte zu erzeugen (vgl. SIEBERT et al. 1995). Auf diese Weise erzeugte PCR-Produkte der überlappenden „Walks“ wurden kloniert und sequenziert.

Tabelle 2.5: Primäre- und Nested Primersets zur Verwendung bei *Genome Walk* auf *Erithacus*-DNA

Verwendete spezifische Primersets für <i>Genome Walk</i> auf genomischer <i>Erithacus</i> -DNA	
Forward Primer: am5 5-AGA GCT GTT ACT TGA TGC AGA TTG GA-3	Reverse Primer: am6 5-TTG CAG CCT TCT GGA TGC TCT CTG-3
Forward Nested Primer: am1061 5-GCC AGT ACT CAG AGG TTT CCC TGC AA-3	Reverse Nested Primer: am1064 5-ATT TTG CAG GGA AAC CTC TGA GTA CTG G-3

2.2.3 Methoden der Proteinanalyse

2.2.3.1 Ermittlung der biochemischen Parameter der eCRY1-Proteine

Aufgrund der vorliegenden DNA-Sequenzen der CRY1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b (siehe 2.2.2.14) konnten die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine ermittelt werden. Mithilfe des Programmes *ProtParam* (ProtParam-Server unter www.expasy.org) wurden die folgenden biochemischen Parameter bestimmt: Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt, Formel und Atomanzahl.

2.2.3.2 Analyse der potentiellen Sekundär- und Tertiärstruktur der eCRY1-Proteine und deren Elemente

Um die mögliche Sekundärstruktur und deren Elemente aufzuklären, wurde mit Hilfe der internationalen *SwissProt*-Database (SwissProt-Server unter www.swissmodel.expasy.org, Stand: Juli 2006) ein Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b vorausgesagt. Bei diesem Vorgang werden die eCRY1 Aminosäuresequenzen mit ähnlichen Aminosäuresequenzen verglichen, deren Sekundärstruktur bereits durch Kristallographie ermittelt wurde.

2.2.3.3 Analyse der Membranständigkeit der eCRY1-Proteine mit Hilfe der Dense Alignment Surface-Methode (DAS)

Um herauszufinden, ob die eCRY1-Proteine membrangebunden oder zytosolisch vorliegen, wurde mit Hilfe der *Dense Alignment Surface*-Methode (nach CSERZO et al. 1997) eine Analyse der Hydropathie durchgeführt.

2.3 Ergebnis

2.3.1 Charakterisierung der retinalen Cryptochromsequenzen

In dieser Arbeit konnten drei Cryptochromgene aus der Retina von *Erithacus rubecula* isoliert werden. Dabei handelt es sich um zwei Cryptochrom 1 Gene (CRY1) und ein Cryptochrom 2 Gen (CRY2). Aufgrund der Ähnlichkeit der Gene zum cCRY1- und gCRY2-Gen des Haushuhns (*Gallus gallus*) (HAQUE et al. 2002; BAILEY et al. 2002) sowie in Anlehnung an die vorherrschende Nomenklatur wurden die Gene eCRY1a (GenBank Accession Nr. AY585716), eCRY1b (GenBank Accession Nr. AY585717) und eCRY2 (GenBank Accession Nr. AY772689) genannt, wobei „e“ für *Erithacus* steht (vgl. MÖLLER et al. 2004).

Bei eCRY1a und eCRY1b konnte jeweils die komplette Gensequenz amplifiziert und charakterisiert werden. Während die eCRY1a cDNA-Sequenz eine Gesamtlänge von 1863 bp aufweist, ist die Sequenz von eCRY1b mit 1764 bp um 99 bp bzw. das Protein um 33 Aminosäuren kürzer.

Beide eCRY1-Proteinvarianten besitzen eine 557 Aminosäuren große homologe Amino (N)-terminale Region, ähnlich der bereits beschriebener Vertebraten-Cryptochrome. Wie bei allen bekannten Cryptochromen finden sich dort die konservierten Regionen der Flavin- (FAD) und Pterin- (MTHF) Bindedomänen (MIYAMOTO & SANCAR 1998; CASHMORE et al. 1999; ZHU & GREEN 2001; HAQUE et al. 2002; SANCAR 2003). An diesen homologen Bereich schließen sich sechs weitere homologe Aminosäuren an, denen im Fall von eCRY1a 57 spezifischen Aminosäuren (AS 564-620) und im Fall von eCRY1b 24 spezifischen Aminosäuren (AS 564-587) folgen (siehe auch Abb. 2.8).

Bei eCRY2 gelang eine partielle Amplifikation des Gens von 647 bp. Hier wurde auf die Amplifikation des Carboxy (C)-terminalen Teils fokussiert, da dieser Sequenzbereich für zelluläre Interaktionen entscheidend ist (vgl. 2.4.3). Aufgrund von Homologien zur *Gallus*-Sequenz wurde in dieser Region ein bekanntes Kernlokalisierungssignal (Nuclear localization Signal: NLS) vermutet, das auch tatsächlich nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei um die Aminosäurenabfolge „PKRKHE“ (vgl. Abb. 2.6).

Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen *Erithacus*-Cryptochromsequenzen mit den verwendeten spezifischen Primersets sowie den Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme findet sich im Anhang (eCRY1a Seite VI - IX; eCRY1b Seite XII - XV; eCRY2 Seite XIX - XX). Ebenfalls im Anhang finden sich die Aminosäuresequenzen der translatierten Proteine der einzelnen Gene und deren biochemische Parameter (Seite X, XVI und XXI; siehe auch Abschnitt 2.3.4), sowie Kopien der Einträge in der internationalen Gendatenbank (*GenBank*) (vgl. Anhang Seite VI - XXII).

2.3.2 Sequenzalignment und Homologieanalysen der C-Termini

Abb. 2.6 zeigt das Alignment der C-terminalen Aminosäuren der retinalen Cryptochrom-Proteine von Huhn (*Gallus gallus*) und Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*). Homologe Aminosäuren sind durch Striche angedeutet. Im oberen Teil der Abbildung ist das Alignment der 66 C-terminalen Aminosäuren des *Gallus gallus* Cryptochrom 1 (cCRY1) mit den *Erithacus*-spezifischen Cryptochromen eCRY1a und eCRY1b zu sehen.

Während die zunächst isolierte eCRY1a-Genvariante des Rotkehlchens bis auf wenige Aminosäureaustausche homolog zum cCRY1-Gen des Huhns (vgl. HAQUE et al. 2002) ist, verfügt die zweite kürzere Variante, eCRY1b, stattdessen über eine noch unbeschriebene C-terminale Domäne aus 24 Aminosäuren, mit vermutlich besonderen Bindungseigenschaften (vgl. Abb. 2.6 gelber Kasten).

Organism	Gene	GenBank Accession #	
<i>Gallus gallus</i>	cCRY1	GVQQQGYCQASSILRYAHGDNQQSHLMQPGRASLGTGISAGKRPNPEEETQSVGPKVQRQSTN*	AAK61385
<i>Erithacus rubecula</i>	eCRY1a	-I-----G-----L-P-T-----*	AY585716
<i>Erithacus rubecula</i>	eCRY1b	-I---- IMAVPVCRGSPNACNYGKPKDTSK*	AY585717
Organism	Gene	GenBank Accession #	
<i>Gallus gallus</i>	gCRY2	STSTAVRLPQSDQAS PKRKHE GAEELCTEELYKRAKVTGLPAPEIPGKS*	AAL46564
<i>Erithacus rubecula</i>	eCRY2	-----S-AE-----P-P-----D---S-----*	AY772689

Abb. 2.6: Alignment der C-terminalen Aminosäuren der retinalen Cryptochrom-Proteine von Huhn (*Gallus gallus*) und Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) beginnend von der letzten gemeinsamen Aminosäure. Homologe Aminosäuren sind durch Striche gekennzeichnet. Sterne identifizieren das translatierte Ende der Gene (Stopcodon). Die bislang unbeschriebene C-terminale Domäne von eCRY1b ist gelb hinterlegt. Das identifizierte Kernlokalisierungssignal, die Aminosäureabfolge „PKRKHE“ im unteren Teil der Abbildung, ist fett gedruckt und blau hinterlegt (verändert nach MÖLLER et al. 2004).

Der untere Teil der Abbildung zeigt das Alignment des Vergleichs der letzten 49 Aminosäuren des *Gallus gallus*-Cryptochrom 2 (*gCRY2*) mit dem *Erithacus*-spezifischen Cryptochrom *eCRY2* und das in dieser Sequenz identifizierte Kernlokalisierungssignal. Der C-terminale Teil des isolierten *eCRY2* ist bis auf sieben Aminosäureaustausche homolog zum *cCRY1*-Gen des Huhns (vgl. BAILEY et al. 2002).

2.3.3 Charakterisierung der genomischen Kodierungsregionen

Die Charakterisierung der genomischen Cryptochrom 1-Sequenzen von *Erithacus* zeigte zwei Intronabschnitte auf dem Chromosom: ein Intron mit 1148 bp Größe, das zweite mit 99 bp (vgl. Abb. 2.8). Zusätzlich zu Sequenzvergleichen von genomischer und cDNA konnte die Länge der Intronsequenzen über PCR mit spezifischen Primersets bestätigt werden: Abb. 2.7 zeigt als Beispiel das Agarosegelbild einer PCR unter Verwendung des spezifischen Primersets am5 und am6 mit genomischer und retinaler cDNA als Vorlage. Ein Größenunterschied von ca. 100 bp zwischen den Banden der einzelnen Produkte ist klar erkennbar und beweist die Existenz des beschriebenen 99 bp Introns. Auf der retinalen cDNA ist das Intron bereits durch Spleißen entfernt worden.

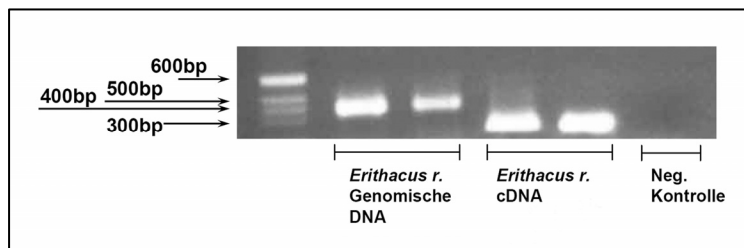


Abb. 2.7: Agarose-Gelbild einer PCR unter Verwendung der Primer am5 (*Erithacus* CRY forward) und am6 (*Erithacus* CRY reverse) auf genomischer DNA und cDNA der linken Retina (Retinaentnahme um 11:00 Uhr). Die Produkte sind jeweils zweifach nebeneinander aufgetragen, um evt. Lauffehler auszugleichen.

Mithilfe der Charakterisierung der genomischen Cryptochromsequenzen konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass es sich bei *eCRY1a* und *eCRY1b* nicht um zwei eigenständige Cryptochrom-Gene handelt. Stattdessen liegen zwei Transkripte des gleichen Locus und somit Spleißprodukte des gleichen Gens vor. Die unterschiedlichen C-Termini der *eCRY1a* und *eCRY1b*-Proteinsequenzen sind auf unterschiedlichen Exonen codiert (vgl. Abb. 2.8).

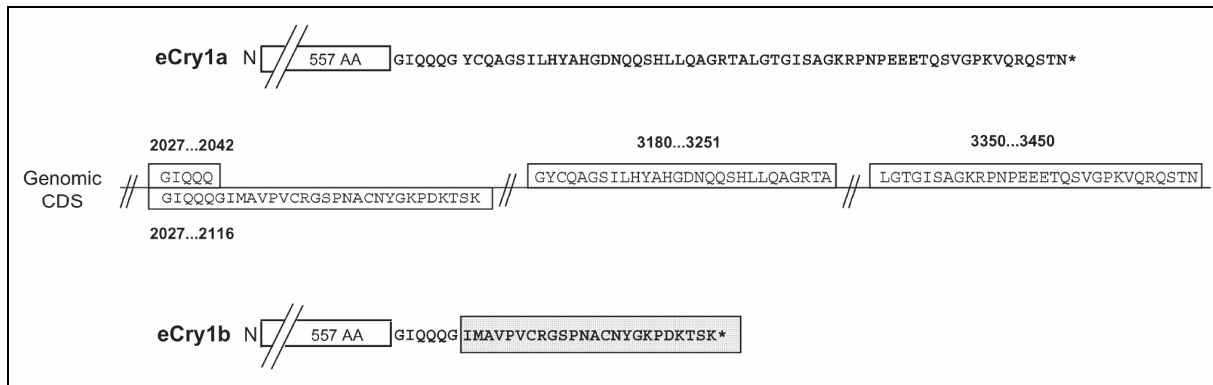


Abb. 2.8: In der Retina des Rotkehlchens sind zwei Arten von Cryptochrom 1 zu finden: eCRY1a und eCRY1b. Beide sind Spleißprodukte des gleichen Gens und besitzen eine konservierte N-terminale Region von 557 Aminosäuren (=AA), ähnlich der anderer Vertebraten-Cryptochrome (weiße Kästen). Gezeigt sind jeweils die C-terminalen Regionen beider eCRY1-cDNA Varianten, beginnend von den letzten gemeinsamen Aminosäuren. Sterne identifizieren das translatierte Ende der Gene (Stopcodon). In der Mitte befindet sich die genomische CDS. eCRY1a-cDNA ist homolog zur cCRY1-cDNA des Huhns und ist aus den genomischen DNA Regionen 2027-2042, 3180-3251 sowie 3350-3450 zusammengesetzt. Stattdessen kodiert eCRY1b-cDNA mit der genomischen Region 2027-2116 für einen neuen C-Terminus (grauer Kasten) (aus: MÖLLER et al. 2004).

Durch die Codierung der C-Termini auf unterschiedlichen Exonen sind beim Ablesen der genomischen CDS zwei alternative Produkte möglich, die in Abb. 2.9 verdeutlicht werden. Durch alternatives Spleißen kann nach den letzten gemeinsamen Aminosäuren „GIQQQG“ (bp 2027-2042) entweder eCRY1b als Produkt 1 oder eCRY1a als Produkt 2 entstehen. eCRY1b wird dann generiert, wenn der gesamte hintere Teil ab Beginn des 1148 bp großen Introns durch Spleißing abgetrennt wird. Diese *Erithacus*-CRY1-Variante wird demnach in einem Exon codiert und besitzt lediglich einen kodierenden Bereich oder ein offenes Leseraster (*Open Reading Frame*, ORF) für die Synthese des entsprechenden Proteins. eCRY1a hingegen entsteht, wenn zunächst das eCRY1b-Exon sowie dann die beiden Introne herausgespleißt werden. Die *Erithacus*-CRY1-Variante eCRY1a wird demnach in zwei Exonen codiert und besitzt zwei kodierende Bereiche bzw. offene Leseraster (ORFs) (vgl. Abb. 2.9).

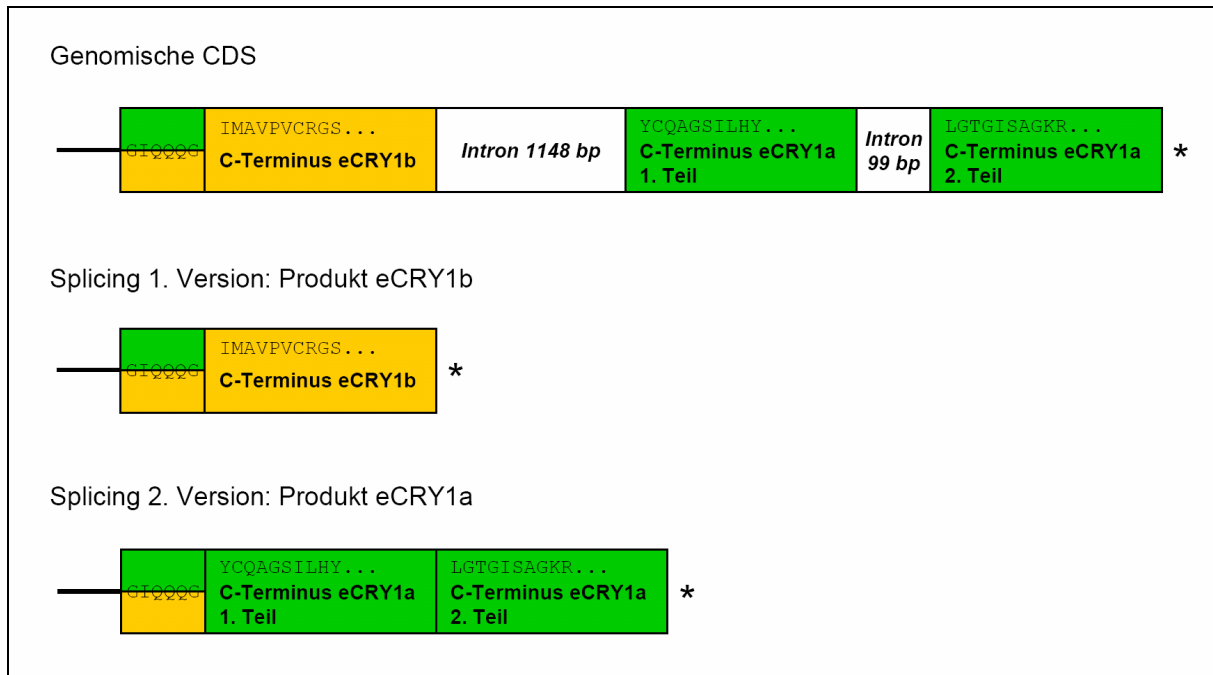


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Entstehung der unterschiedliche eCRY1-Varianten eCRY1a und eCRY1b durch alternatives Spleißen nach den letzten gemeinsamen Aminosäuren „GIQQQG“. Gezeigt sind jeweils die ersten 10 Aminosäuren. Sterne kennzeichnen das Ende des offenen Leserasters und den Beginn der nicht kodierenden Bereiche (3' UTR).

2.3.4 Biochemische Parameter, Sekundär- und Tertiärstruktur, sowie Membranständigkeit der retinalen Cryptochrom-Proteine von *Erithacus rubecula*

2.3.4.1 Biochemische Parameter der eCRY1-Proteine

Mit Hilfe des Programmes *ProtParam* (<http://www.expasy.org>) wurden für eCRY1a, eCRY1b und - soweit für die partiell vorliegende Aminosäuresequenz von eCRY2 möglich - die folgenden biochemischen Parameter bestimmt: Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt, Formel und Atomanzahl (vgl. Tabelle 2.6). Der Isoelektrische Punkt beschreibt, wann das Protein neutral geladen ist und ausfällt. Er ist somit insbesondere für potentielle Aufreinigungsschritte des produzierten Proteins interessant.

Tabelle 2.6: Biochemische Parameter der eCRY1 und eCRY2-Proteine (ermittelt mit Hilfe von *ProtParam*)

Name Protein	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht kDa (g/mol)	Isoelektrischer Punkt (pI)	Formel	Atomanzahl
eCRY1a	620	ca. 70 kDa (69637.2 g/mol)	8.25	$C_{3112}H_{4802}N_{870}O_{898}S_{27}$	9709
eCRY1b	587	ca. 66 kDa (66055.5 g/mol)	8.47	$C_{2962}H_{4568}N_{818}O_{843}S_{29}$	9220
eCRY2 (partial)	128	<i>noch nicht zu ermitteln</i>	<i>noch nicht zu ermitteln</i>	<i>noch nicht zu ermitteln</i>	<i>noch nicht zu ermitteln</i>

2.3.4.2 Potentielle Sekundär- und Tertiärstruktur der eCRY1-Proteine und deren Elemente

Trotz einer relativ niedrigen aber typischen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzhomologie von 28% konnte eine hohe strukturelle Übereinstimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur von fast 90% zwischen *Erithacus*-CRY1 und der DNA-Photolyase von *Anacystis nidulans* (Protein Data Base (PDB) Code: 1QNF, TAMADA et al. 1997) vorausgesagt werden (vgl. Diskussion 2.4.2). Auf dieser Basis wurde mit Hilfe des Programms *swissmodel* ein Proteinmodell für *Erithacus*-CRY1a und b erstellt (SwissProt-Server unter www.swissmodel.expasy.org) (Abb. 2.10), wobei die Aminosäuren 8-491 verglichen werden konnten.

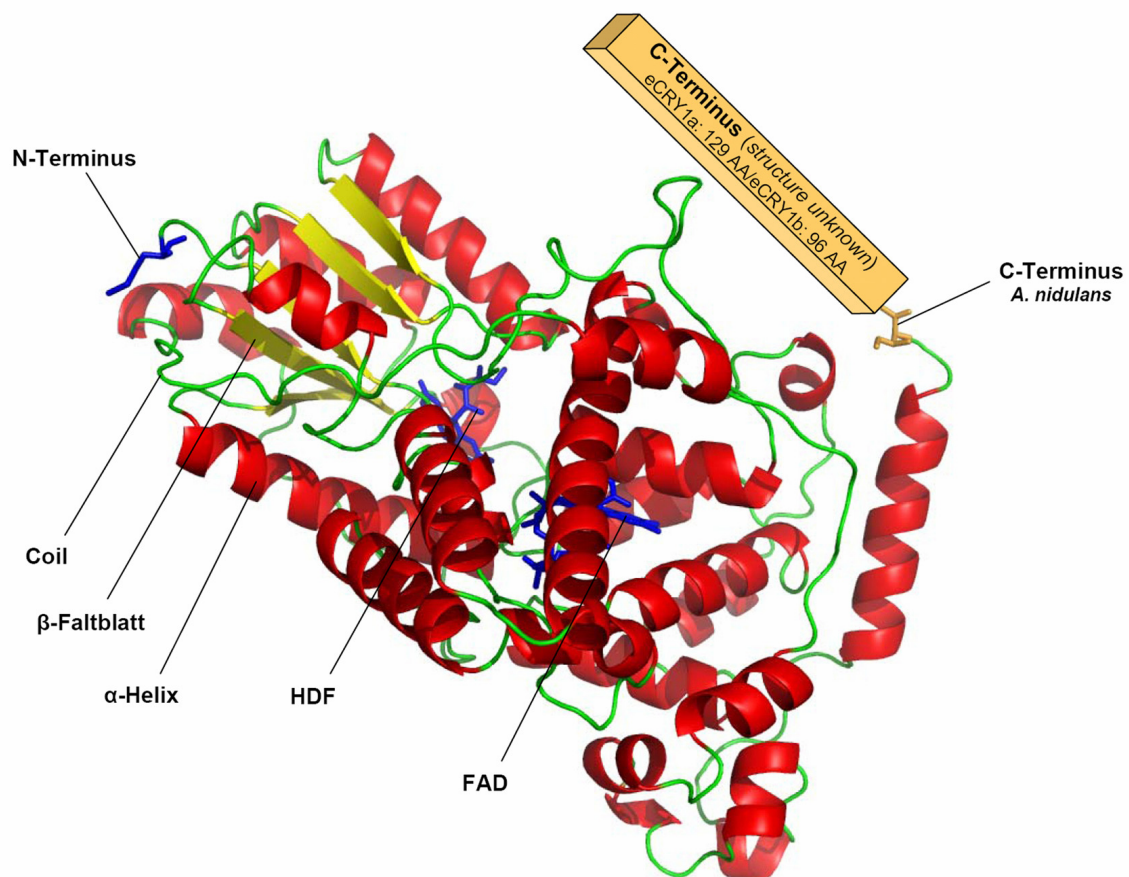


Abb. 2.10: Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b in Anlehnung an die Kristallstruktur der DNA-Photolyase von *Anacystis nidulans* (PDB Code: 1QNF, TAMADA et al. 1997). Verglichen werden konnten die Aminosäuren 8-491. Die zwei kanonischen Sekundärstrukturelemente α -Helices und β -Faltblätter sind in rot bzw. als gelbe Pfeile dargestellt. Die Bereiche ohne kanonische Sekundärstrukturen (*Random Coil*) sind grün gekennzeichnet. In der oberen linken Bildhälfte befindet sich die α/β Domäne mit dem N-Terminus in blau. Die untere α -helikale Domäne enthält zwei nichtkovalent-gebundenen Cofaktoren: das katalytische Chromophor Flavin Adenin Dinukleotid (FAD) und das lichtsammelnde Chromophor 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (HDF oder 8-HDF). In der rechten oberen Bildhälfte befindet sich das C-terminale Ende von *A. nidulans* (orange gekennzeichnet). Der orangefarbene Balken stellt das im Modell fehlende C-terminale Ende von *Erithacus*-CRY1a und -CRY1b mit jeweils 129 bzw. 99 weiteren Aminosäuren (AA) dar (nicht maßstabsgerecht). Die Struktur der beiden C-Termini ist noch nicht bekannt.

Während das Fehlen der ersten acht Aminosäuren am N-terminalen Teil aufgrund der bekannten hohen Sequenzhomologie zwischen Photolyase und Cryptochrom zu vernachlässigen ist, ist das Fehlen der letzten 129 Aminosäuren für eCRY1a bzw. 99 Aminosäuren für eCRY1b von entscheidender Bedeutung, da in diesen Abschnitt die spezifischen C-terminalen Teile der beiden Varianten fallen (vgl. Abschnitt 2.3.1). Aus diesem Grund gilt das erstellte Proteinmodell in dieser Form für beide eCRY1-Varianten. Die sekundären sowie tertiären Strukturen der beiden C-terminalen Teile der *Erithacus*-CRY1 Varianten a und b können noch nicht beschrieben werden. (vgl. Abb. 2.10 orangefarbener Balken).

Die α -Helicale Domäne des eCRY1-Proteinmodells enthält zwei nichtkovalent-gebundenen Chromophoren bzw. Cofaktoren: das katalytische Chromophor Flavinadeninindinukleotid (FAD) und das lichtsammelnde Chromophor 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (8-HDF) (vgl. Abb. 2.10).

Abb. 2.11 zeigt das Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b jeweils ohne und mit Oberflächenmodellierung. Das katalytische Chromophor Flavinadenindinukleotid (FAD) ist durch den Kontakt mit 14 Aminosäuren tief in der α -Helicalen Domäne verankert. Die meisten dieser 14 Aminosäuren sind innerhalb der Photolyase/Cryptochrom-Familie konserviert (PARK et al. 1995, KOMORI et al. 2001). Die in Abb. 2.11b gut zu erkennende u.a. von PARK et al. (1995) beschriebene Aussparung von ca. 10 Å in der Mitte der α -Helikalen Domäne ermöglicht einen einfachen Zugang von Lösungsmittel und Sauerstoff zum FAD. Auf der Gegenseite ragt das lichtsammelnde Chromophor 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (8-HDF) aus der flachen Spalte zwischen den beiden Proteindomänen teilweise über die Proteinoberfläche hinaus (Abb. 2.11c).

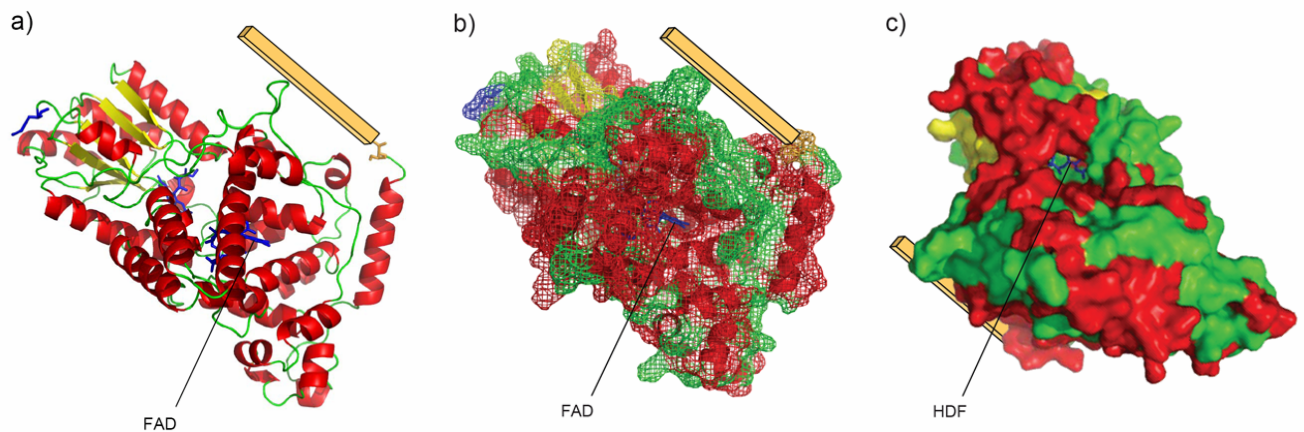


Abb. 2.11: Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b ohne (a) und mit Oberflächenmodellierung Gitterstruktur (b) und Oberflächenmodellierung geschlossen (c). Der orangefarbene Balken stellt das im Modell fehlende C-terminale Ende der unterschiedlichen *Erithacus*-CRY1a und b Varianten dar, dessen Struktur noch unbekannt ist (nicht maßstabsgerecht). Links das Proteinmodell mit den kanonischen Sekundärstrukturen (a), in der Mitte mit der entsprechenden Oberflächenmodellierung aus der gleichen Perspektive (b). Rechts das gleiche Modell um 180° horizontal gedreht (c). In Abbildung (b) gut zu erkennen ist die Aussparung von ca. 10 Å, die eine optimale Zugänglichkeit von FAD zu Lösungsmitteln und Sauerstoff ermöglicht. Das lichtsammelnde Chromophor 8-HDF ist in einer flachen Spalte zwischen den beiden Domänen lokalisiert und ragt teilweise aus über die Oberfläche des Proteins hinaus (c).

2.3.4.3 Analyse der Membranständigkeit mit Hilfe der *Dense Alignment Surface*-Methode

Mit Hilfe der *Dense Alignment Surface*-Methode (DAS) (CSERZO et al. 1997), mit der sich Vorhersagen über transmembrane Regionen und Orientierungen von Proteinen treffen lassen, wurde die Wahrscheinlichkeit der Membranständigkeit der Proteine von eCRY1a und eCRY1b untersucht. Der Test ergibt in beiden Fällen keinen Hinweis darauf, dass die eCRY1-Proteine membranassoziiert vorliegen (siehe Abb. 2.12). Demnach besitzen beide eCRY1-Varianten keine Membranbindedomäne und liegen zytosolisch vor.

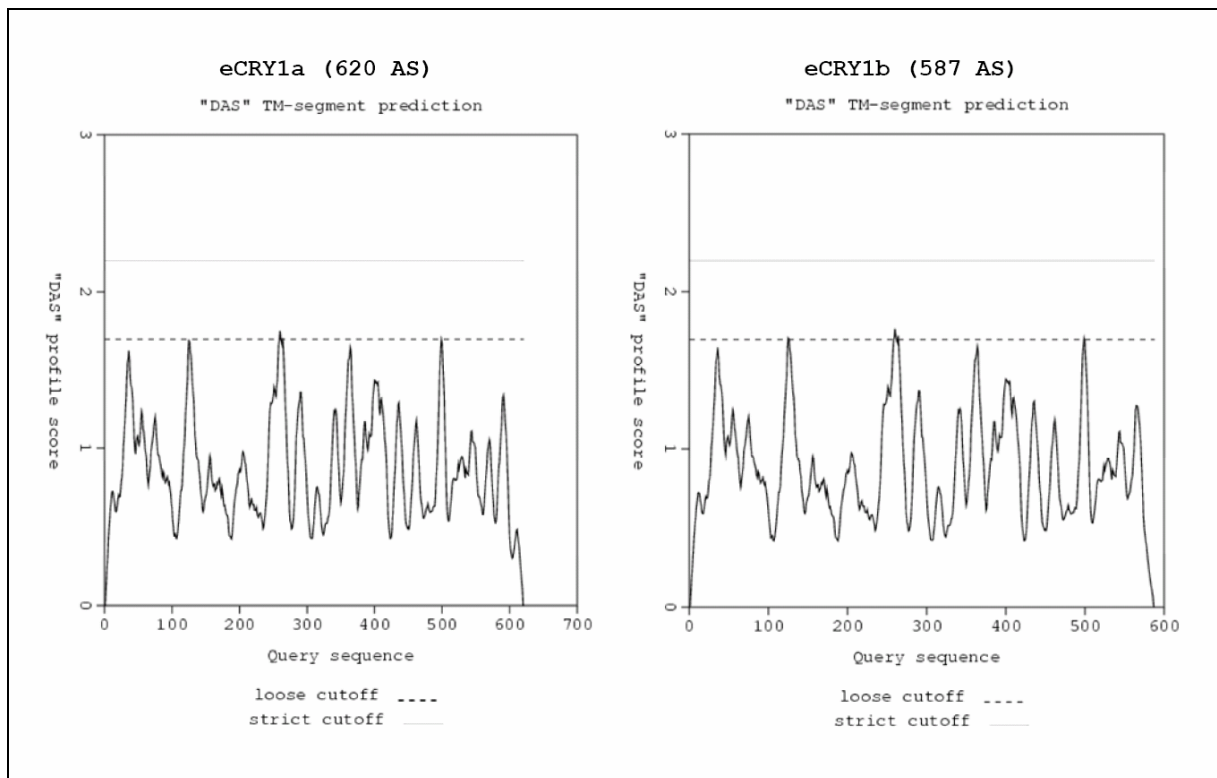


Abb. 2.12: eCRY1a- und eCRY1b-Ergebnisgraphen der *Dense Alignment Surface Methode*, die Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Membranassoziiiertheit eines Proteins trifft. Dabei bildet die x-Achse die spezifische Proteinsequenz ab, die y-Achse beschreibt die Hydropathie (wobei 0 = sehr hydrophil und 3 = sehr hydrophob). Die durchgestrichene Linie beschreibt eine hohe Wahrscheinlichkeit der Membrangebundenheit, d.h. alle Vorhersagen unter dieser Linie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit keinesfalls membranengebunden („strict cutoff“). Die gestrichelte Linie gibt eine mögliche Membrangebundenheit an, d.h. alle Vorhersagen über dieser Linie könnten membranengebunden sein („loose cutoff“). Keine Region der beiden eCRY1-Proteine liegt über einer dieser beiden Linien. eCRY1a und eCRY1b besitzen demnach beide keine Membrandomänen und liegen zytosolisch vor.

Abb. 2.13 zeigt zum Vergleich die *DAS*-Ergebnisgraphen des eCRY1b-Proteins neben dem des membranständigen Proteins Cyclooxygenase 3 (COX-3) mit seinen 7 Membranhelices (vgl. Abb. 2.13).

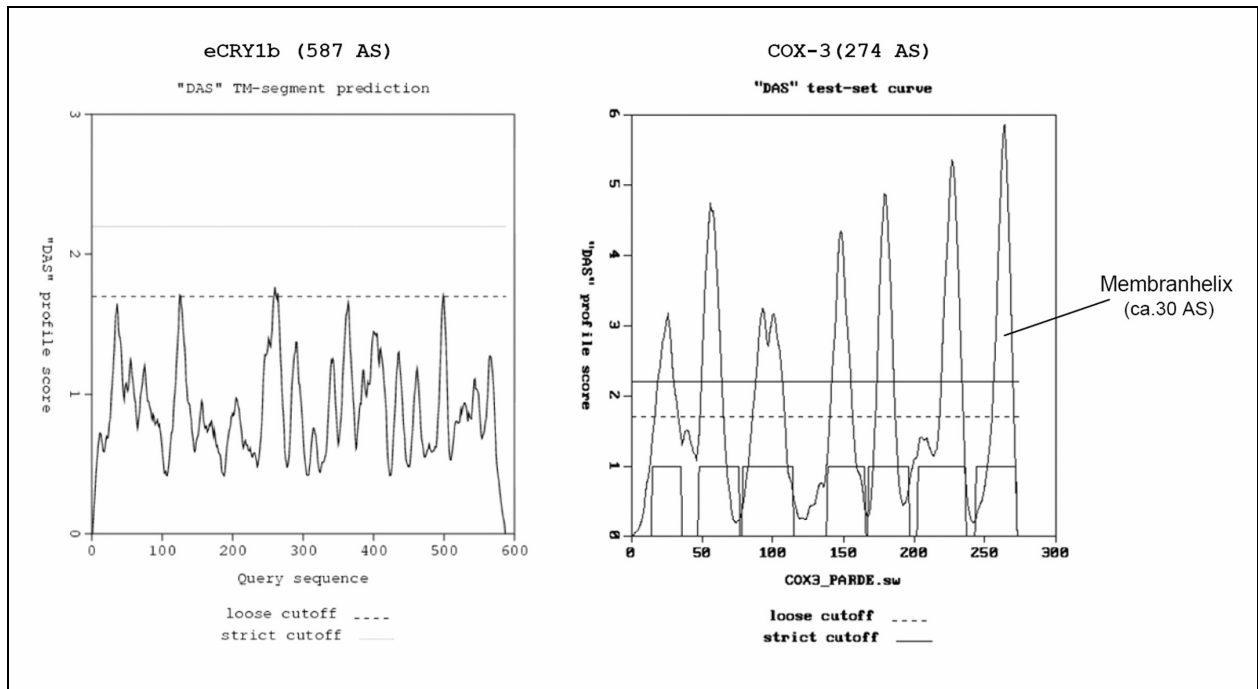


Abb. 2.13: Ergebnis des *Transmembrane Prediction Server*-Tests für das eCRY1b-Protein und das membranständige Cyclooxygenase 3 (COX-3) Protein im Vergleich. Bei letzterem sind die 7 Membranhelices mit Hydrophobizitätswerten von bis zu 5,8 deutlich zu erkennen. Die letzte Membranhelix mit einer Länge von ca. 30 Aminosäuren (= AS) ist in der Abbildung gekennzeichnet.

2.4 Diskussion

2.4.1 Existenz von Cryptochrom in der Retina von *Erithacus rubecula*

In diesem Teil der Arbeit konnte die Existenz von drei Formen von Cryptochrom, die in der Retina eines Zugvogels exprimiert werden, klar nachgewiesen werden.

Obwohl nicht alle Cryptochrome direkt durch Licht aktiviert werden (GRIFFIN et al. 1999, VAN GELDER et al. 2003) und bisher nicht für alle Radikalpaarprozesse in Flavoproteinen direkte physiologische Funktionen beschrieben werden konnten, ist der Beweis von Cryptochrom in der Retina des Rotkehlchens vor dem Hintergrund des Radikalpaarmodells zur Magnetperzeption (RITZ et al. 2000) äußerst interessant.

Ein negativer Befund hätte die Beteiligung dieses Photorezeptortyps bei der Wahrnehmung des Erdmagnetfelds sehr unwahrscheinlich gemacht, wenn nicht sogar ausgeschlossen.

Die Anwesenheit von eCRY1a, eCRY1b sowie eCRY2 in der Zugvogelretina erlaubt die Spekulation, dass dem Cryptochrom-Molekül neben seiner bekannten Beteiligung an Prozessen der inneren Uhr noch eine weitere Funktion im Organismus zukommt, nämlich die möglicherweise entscheidende Rolle bei der Vermittlung magnetischer Kompassinformation.

Allerdings ist eine Beteiligung von eCRY2 am lichtinduzierten Magnetperzeptionsprozess mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. In der C-terminalen Region von eCRY2 konnte nach eingehender Untersuchung ein Kernlokalisierungssignal mit der Aminosäureabfolge „PKRKHE“ identifiziert werden (vgl. 2.3.2). Ein solches Signal weist auf eine Lokalisierung von *Erithacus*-Cryptochrom 2 im Kern der Zelle hin und macht die Funktion dieses Cryptochroms als sensorischer Lichtrezeptor eher unwahrscheinlich.

2.4.2 Das *Erithacus*-CRY1 Proteinstrukturmodell

Alle drei Proteinklassen der Photolyase/Cryptochrom-Familie, Photolyase (genauer: Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer-Photolyase), (6-4)-Photolyase und Cryptochrom sind 50-70 kDa Proteine, die zwei nichtkovalent gebundene Chromophore/Cofaktoren besitzen. Ein Cofaktor ist immer das katalytische Chromophor Flavinadeninindinukleotid (FAD). Bei Photolyasen ist FAD neben der katalytischen Funktion auch für die Bindung der Photolyasen an geschädigte DNA notwendig (*dimer-flipping-model*; vgl. SANCAR 2003). Der Zweite Cofaktor, der als lichtsammelndes Antennenpigment fungiert, ist häufig Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (HDF) (SANCAR 2003). Kristallographisch ermittelte Strukturmodelle von bislang drei Photolyasen, *E. coli* (PARK et al. 1995), *A. nidulans* (TAMADA et al. 1997) und *Thermus thermophilus* (KOMORI et al. 2001) und der photolyase-homologen Region von *Synechocystis*- und *Arabidopsis thaliana*-Cryptochrom (BRUDLER et al. 2003, BRÄUTIGAM et al. 2004) sind mit einer Abweichung von weniger als 2 Å quasi deckungsgleich. Das bedeutet, dass trotz einer niedrigen Aminosäuresequenzhomologie zwischen Cryptochrom und Photolyasen von im Schnitt nur 21-27% in der N-terminalen Region ein hoher Grad an struktureller Homologie vorliegt. Im Bereich der Photolyase-homologen Region beträgt diese teilweise über 90% (PARTCH et al. 2005).

Diese hohe strukturelle Übereinstimmung lässt einen Vergleich zwischen den Photolyase und Cryptochrom Proteinsekundär- und Tertiärstrukturen zu, obwohl es bis heute nicht gelungen ist, die Kristallstruktur von Cryptochrom aufzuklären oder spezifische Modelle bezüglich des *in vivo*-Status des Proteins zu erstellen. Dies liegt in erster Linie am häufigen Verlust der Cofaktoren durch Oxidation oder Aufreinigungsschritten bei rekombinant produzierten Cryptochrom-Proteinen (vgl. z.B. JOHNSON et al. 1988, TODO et al. 1996, ÖZGÜR & SANCAR 2003).

Die bisher kristallografisch ermittelten Photolyaseproteine besitzen immer zwei Domänen: eine N-terminale α/β Domäne und eine C-terminale α -helikale Domäne, die durch einen langen Interdomänenloop verbunden sind, der sich um die α/β -Domäne wickelt

(SANCAR 2003). Im an die Photolyase von *A. nidulans* angelehnten Proteinmodell für beide *Erithacus*-CRY1-Varianten sind diese beiden Domänen sowie die Cofaktoren FAD und 8-HDF gut zu erkennen (vgl. Abb. 2.10). Allerdings ist davon auszugehen, dass sich im *Erithacus*-CRY1 anstelle des lichtsammelnden Chromophor 8-HDF im System *A. nidulans* ein MTHF befindet. Die konservierte MTHF-Domäne konnte in der N-terminalen Region von eCRY1a und eCRY1b nachgewiesen werden (vgl. 2.3.1). Die Farbstoffe 8-HDF und MTHF sind in Eigenschaften und Position innerhalb der Photolyase-Proteine homolog.

2.4.3 Die spezifische Rolle des CRY C-Terminus

Cryptochrome fungieren sowohl als Photorezeptoren, wie im Fall von *Arabidopsis* (z.B. AHMAD et al. 1998), als (circadiane) Photorezeptoren und *Core oscillator*-Proteine wie bei *Drosophila* (z.B. ROSATO et al. 2001) und *Danio* (z.B. KOBAYASHI ET. AL 2000) oder als reine *Core oscillator*-Proteine wie bei *Xenopus* (z.B. ZHU & GREEN 2001) und bei Säugetieren (MYAMOTO & SANCAR 1998). Diese Diversität erlaubt die Spekulation, dass darüber hinaus Cryptochrom noch eine weitere Funktion, nämlich möglicherweise die eines Magnetrezeptors zukommt.

Alle bisher beschriebenen Mitglieder der Cryptochrom-Familie verfügen über eine ca. 500 AS lange Kerndomäne, die zwei Chromophor-Bindestellen besitzt, und einer C-terminalen Extension. Während die N-terminalen Teile sich nur geringfügig unterscheiden, weisen die C-terminalen Domänen von Cryptochrom eine hohe Variation in Länge und Aminosäurenkomposition auf (TODO et al. 1996, VAN DER SPEK et al. 1996) (siehe Abb. 2.14).

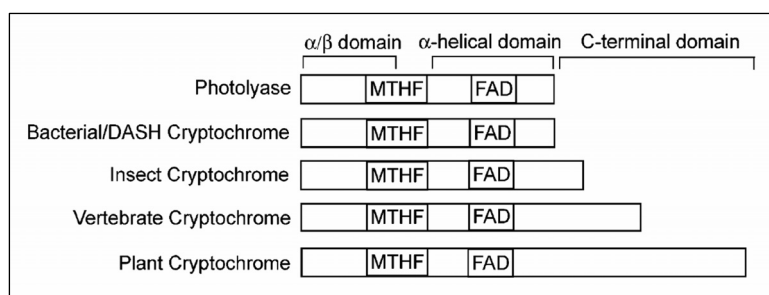


Abb. 2.14: Domänen-Organisation der Photolyase/Cryptochrom-Familie. Gezeigt sind die drei Subdomänen mit den konservierten Bindungs-regionen der zwei Cofaktoren/Chromophore MTHF und FAD. Rotkehlchen eCRY1a und b sind von der Länge der C-Termini mit den Insektencryptochrom zu vergleichen (aus: PARTCH et al. 2005).

Die Entwicklung von unterschiedlichen artspezifischen C-terminalen Extensionen im Laufe der Evolution hat ganz offensichtlich nicht nur dazu geführt, Cryptochrome funktionell von Photolyasen zu trennen. In gleichem Maße hat die C-terminale Variation auch zu einer großen Diversität innerhalb der Cryptochrom-Familie beigetragen. Alles deutet darauf hin, dass diese Region der hauptsächliche Strukturdeterminant ist, der über die Funktion der einzelnen Cryptochrome entscheidet.

Einen direkten Nachweis, dass CRY C-Termini Effektor-Moleküle binden, konnte bereits 1997 von ZHAO & SANCAR erbracht werden. Sie zeigten, dass die C-terminale Extension des menschlichen CRY2 (*hCRY2*) mit der Protein Serin/Threonin-Phosphatase 5 interagiert und dessen Aktivität moduliert. Auch bei *Arabidopsis thaliana* scheint die C-terminale Domäne kritisch für die Funktion der beiden Cryptochrome *atCRY1* und *atCRY2* zu sein, wie aus Protein-Protein Interaktionsstudien (AHMAD et al.1998, JARILLO et al.2001, WANG et al. 2001) und dem konstitutiven photomorphogenen Phänotyp von *Arabidopsis*-Keimlingen hervorgeht, die die C-terminalen Domänen überexprimieren (YANG et al. 2000).

Um in der Lage zu sein, über eine neue Cryptochrom-Funktion zu spekulieren, würde man den Nachweis einer neuen C-terminalen CRY-Domäne erwarten. Diese Domäne könnte eine neue Kombination von bereits beschriebenen Protein-Interaktionspartnern besitzen bzw. mit spezifischen Interaktionspartnern assoziieren, die bei den bekannten Cryptochromen noch nicht beschrieben sind (siehe auch 2.4.4).

Tatsächlich konnte in diesem Abschnitt der Arbeit bei den gefundenen retinalen Spleißvarianten des Cryptochrom 1, *eCRY1a* und *eCRY1b*, bei letzterer eine neue C-terminale Domäne identifiziert werden, die weder bei *eCRY1a* noch bei anderen bisher beschriebenen Cryptochromen auftritt. Sie könnte Domänenstrukturen mit besonderen noch unbekanntem Proteinbindungseigenschaften enthalten.

Des Weiteren wird spekuliert, dass die Unterschiede in den C-terminalen Domänen darüber hinaus die Spezifität der Funktionen zwischen Cryptochromen des gleichen Organismus liefern könnten. Für die Befunde aus der Retina des Rotkehlchens könnte dies bedeuten, dass die *eCRY1* Spleißformen *eCRY1a* und *eCRY1b* vermutlich unterschiedliche Funktionen im Organismus wahrnehmen könnten (siehe auch Diskussion Kapitel 3).

2.4.4 Lichtreguliertes intra- und intermolekulares Aktivierungsmodell für *Erithacus*-Cryptochrom 1

In nahezu allen Photopigmenten erfolgt bei der Transduktion des Lichtsignals die lichtstimulierte Bewegung einer Domäne (z.B. PARK et al. 2000, OKADA et al. 2001, HARPER et al. 2003). Auch bei Cryptochromen wird von einer lichtregulierten Konformationsänderung der C-terminalen Domäne ausgegangen. Diese Änderung scheint bei der Regulation der Signalweitergabe an *downstream effectors* eine wichtige Rolle zu spielen (PARTCH et al. 2005). Da beide *eCRY1*-Varianten nachweislich nicht membranassoziiert vorliegen (vgl. 2.3.4.3), benötigen sie für die Umwandlung eines Signals, z. B. eines Signals über die

vorliegende Richtung des Erdmagnetfelds in ein Aktionspotential, mindestens einen Interaktionspartner oder alternativ eine Reizgeneration über spezifische Elektronentransportketten. Mindestens ein Interaktionspartner muss auch deshalb gefordert werden, weil nach der Radikalpaartheorie (RITZ et al. 2000; vgl. Kapitel 1) die magneto-sensitiven Rezeptoren zumindest im Moment der Photonenabsorption in einer bestimmten Anordnung sphärisch fixiert sein müssen, da die magnetische Kompassinformation durch einen Vergleich der Triplettausbeuten in verschiedenen Raumrichtungen errechnet wird. Demnach wäre der mögliche Interaktionspartner entweder membrangebunden oder er liegt in der Retina in einer bestimmten Ausrichtung fixiert vor.

Die meisten der derzeit diskutierten lichtabhängigen Cryptochromfunktionsmodelle gehen davon aus, dass die Funktion der C-terminalen Domäne in Dunkelheit unterdrückt ist. Die Lichtaktivierung könnte entweder durch eine intramolekulare oder durch intermolekulare Redox-Reaktion erfolgen. Die Details dieser Reaktion sind noch unbekannt (YANG et al. 2000). Bei *Arabidopsis*-CRY1 (*atCRY1*) scheint die lichtabhängige Konformationsänderung, die eine entscheidende Rolle bei der Inhibition des Effektors COP1 spielt, allerdings von einem spezifischen hochkonservierten Motiv im C-Terminus reguliert zu sein (YANG et al. 2001, PARTCH et al. 2005, vgl. Abb. 2.15).

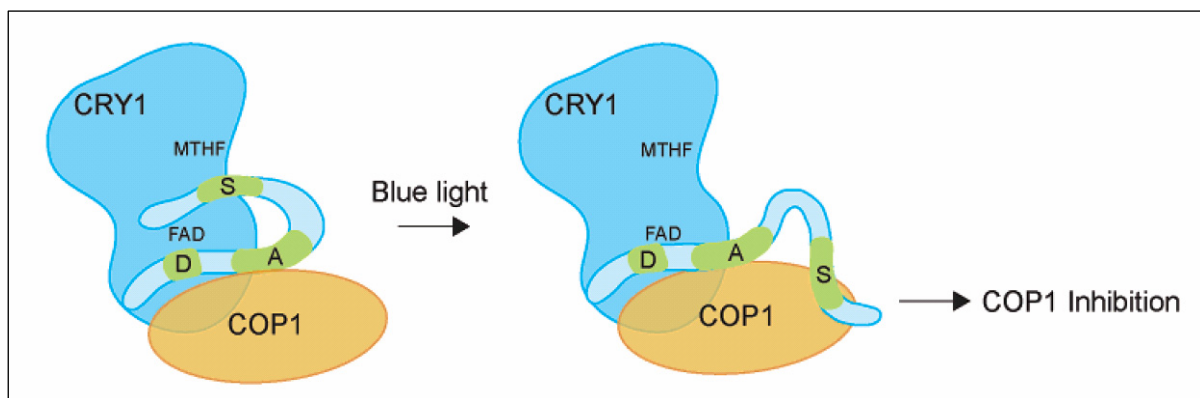


Abb. 2.15: Modell der lichtabhängigen Konformationsänderung in der Funktion von *Arabidopsis*-Cryptochrom 1 (*atCRY1*). Kurzwelliges Licht initiiert eine photochemische Reaktion, die eine Region um das bei nahezu allen pflanzlichen Cryptochromen konservierte STAESS-Motiv im C-Terminus aus ihrer ursprünglichen Bindung an die PHR löst und so eine direkte Inhibition der COP1 Aktivität ermöglicht (DAS = DQXVP-acidic-STAES Domäne) (aus: PARTCH ET AL. 2005).

Intramolekulare Redox-Reaktionen nach Photonabsorption sind in der Lage, die Effizienz eines Signalprozesses erheblich zu steigern. Solche intramolekularen Prozesse sind sowohl von Phytochrom als auch von Rhodopsin bekannt (CASHMORE et al. 1999). Bei letzterem resultiert die Absorption eines Photons in einer cis-trans Isomerisierung des assoziierten retinalen Chromophors, dass wiederum eine Konformationsänderung des assoziierten Opsin-Proteins bewirkt (z. B. MÜLLER & KAUPP 1998). Im Hinblick auf die bekannte

Effektivität eines solchen intramolekularen Signalsystems ist denkbar, dass auch bei retinalen *Erithacus*-Cryptochromen als erstes Ereignis nach der Photonabsorption eine intramolekulare Redox-Reaktion stattfindet.

Im Detail könnte die Perzeption von kurzwelligem Licht in der N-terminalen PHR-Domäne von eCRY1b zu einer intramolekularen Redox-Reaktion führen, die wiederum eine Veränderung des Redox-Zustandes des C-Terminus bewirkt und damit eine Konformationsänderung - z.B. ein Ausklappen - verursacht (vgl. Abb. 2.16). Diese Konformationsänderung ermöglicht dann eine Interaktion mit (einem) möglichen Zielprotein(en) (vgl. YANG et al. 2000, ROSATO et al. 2001).

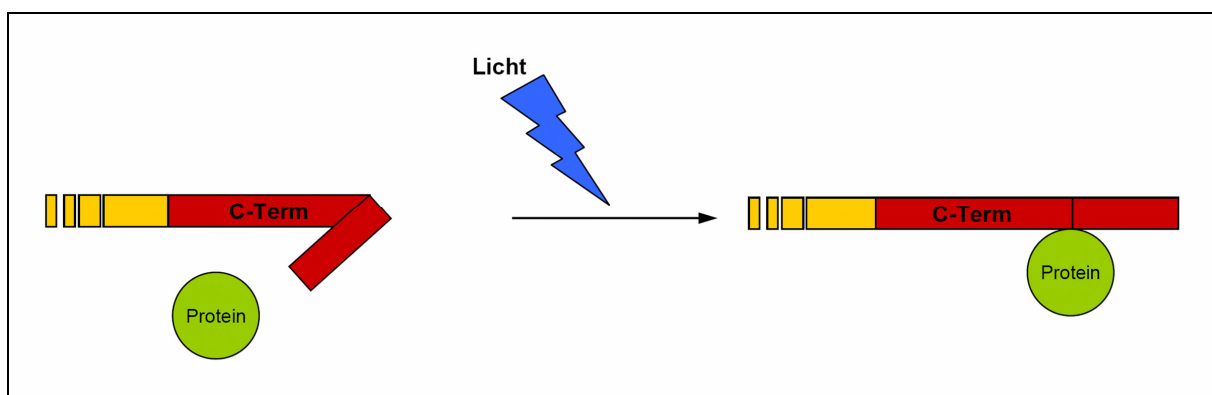


Abb. 2.16: Intramolekulares Aktivierungs-Modell für Cryptochrom (verändert nach ROSATO et al. 2001). In Dunkelheit blockiert ein Teil der C-terminalen Domäne (rot) die Bindungsstelle für einen möglichen Proteinbindungspartner (grün). Nach Absorption von kurzwelligem Licht kommt es zu einer intra-molekularen Redox-Reaktion, die zu einer Konformationsänderung im C-Terminus führt und die Interaktion mit dem Zielprotein ermöglicht. Orangefarbener Balken = CRY N-Terminus

Eine alternative Variante der Cryptochrom-Signaltransduktion könnte ein intermolekularer Transfer von Energie zu einem Partner mit assoziiertem Chromophor sein. Dieser Energietransfer wäre mit dem Transfer von Energie vom lichtsammelnden Chromophor der Photolyase zum Flavin vergleichbar. Als potentielle Partner in einer solchen Interaktion kämen im Fall von Pflanzencryptochrom Phytochrome und im Fall von tierischen Cryptochromen Opsine in Frage (CASHMORE et al. 1999). Die Tatsache, dass sich eCRY1b in der Retina von *Erithacus* befindet, lässt die Überlegung einer möglichen Assoziation und eines intermolekularen Energietransfers zwischen Cryptochrom und Opsinen plausibel erscheinen. Auch im Hinblick auf die wichtige Fixierung von magneto-sensitiven Rezeptoren in einer bestimmten sphärischen Anordnung erscheint eine Interaktion mit Opsinen sinnvoll, da diese in den Außensegmenten der Photorezeptoren in den sogenannten Disks in hoher Ordnung und konstanter Raumrichtung vorliegen.

2.4.5 Ist die C-terminale Domäne von eCRY1b zu kurz für essentielle Funktionen?

Die bisher beschriebenen Modelle der möglichen Funktion des C-Terminus von Cryptochrom beziehen sich in erster Linie auf die relativ langen C-terminalen Domänen der pflanzlichen und Säugetier-Cryptochrome (*atCRY* und *mCRY*). Der C-Terminus des in dieser Arbeit zuerst beschriebenen eCRY1b weist hingegen eine Domänenlänge von lediglich 24 Aminosäuren auf. Es stellt sich die Frage, ob bei einem derart kurzen Domänenbereich über eine essentielle Funktion im Organismus - wie z.B. der Magnetperzeption - spekuliert werden kann.

Erstaunlicherweise konnte jedoch für die lediglich 22 Aminosäuren lange C-terminale Domäne des *Drosophila* Cryptochroms (*dCRY*) eine solche essentielle Funktion in der Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. *Drosophila* Cryptochrom (*dCRY*) ist Teil des circadianen Oszillatorsystems und treibt unter Lichteinfluss den Abbau des circadianen Clock-Proteins *dTIM* voran (LIN et al. 2001). Die Photolyase-homologe Region des *dCRY* ist zwar nachweislich ausreichend, um Licht wahrzunehmen, die lichtabhängige Regulation der *dCRY-dTIM* Interaktion und damit der kontrollierte Abbau von *dTIM* geht durch das Fehlen des C-Terminus jedoch verloren (ROSATO et al. 2001, BUSZA et al. 2004, DISSEL et al. 2004).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die C-terminale Domäne von eCRY1b trotz ihrer kurzen Aminosäureabfolge die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen haben kann und so essentielle Funktionen im Magnetperzeptionsprozess wahrnehmen könnte.

2.4.6 Die Flexibilität der C-terminalen Domäne spricht möglicherweise für intramolekulares Aktivierungsmodell von eCRY1

Interessanterweise haben vergleichende Sequenzanalysen aller zur Zeit in der Datenbank verfügbaren Cryptochrome – auch der hier beschriebenen *Erithacus*-CRYs - ergeben, dass, obwohl sie in ihrer primären Aminosäureabfolge wenig homolog sind, die Sekundärstrukturen der C-terminalen Domänen eine auffallende Unstrukturiertheit teilen (siehe z.B. Abb. 2.17). Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Strukturermittlungsprogramme PONDR und DisEMBL (ROMERO et al. 2001, LINDING et al. 2003).

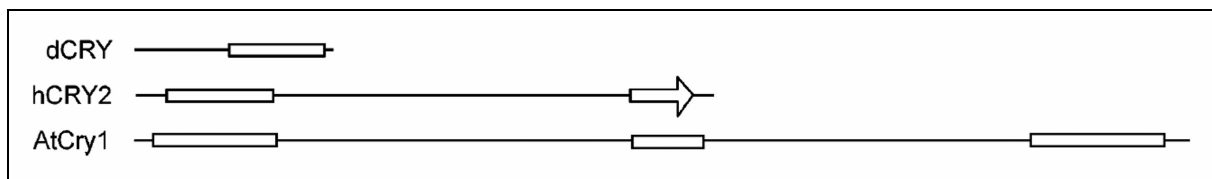


Abb. 2.17: Sekundärstruktur-Alignment unterschiedlicher Cryptochrom C-Termini. Die Sekundärstrukturmodelle der hier dargestellten tierischen und pflanzlichen CRYs zeigen berechnete α -Helices als Rechtecke, β -Faltblätter als Pfeile. Alle anderen Regionen weisen keine kanonischen Sekundärstrukturen auf (aus: PARTCH et al. 2005). d=*Drosophila*, h=*Human*, At=*Arabidopsis*

Dieser Befund ist mit der vermuteten Rolle der CRY C-terminalen Domänen als Signaltransduktionsdomänen konsistent, da unstrukturierte Regionen in signaltransduktions- wie auch in regulatorischen Proteinen signifikant häufiger auftreten, als in Komponenten des metabolischen oder biosynthetischen Kreislaufs (IAKOUCHEVA et al. 2002, BELL et al. 2002, ESTEVE et al. 2003). Interessanterweise besitzen relativ unstrukturierte Proteine auch einen großen Anteil an Aminosäuren, die besonders häufig in flexiblen Regionen vorkommen, so z.B. Prolin, Asparagin- und Glutaminsäure sowie Serin (VIHINEN et al. 1994, ROMERO et al. 2001). Ein flexibler C-Terminus wäre im Hinblick auf das von YANG et al. (2000) sowie ROSATO et al. (2001) postulierte intramolekulare CRY Aktivierungs-Modell (Abb. 2.16) möglicherweise von Vorteil.

Des Weiteren ermöglicht eine flexible Struktur einer Signaldomäne eine größere Effizienz in der Erkennung von multiplen Interaktionspartnern (SHOEMAKER et al. 2000). Verbinden sich C-Terminus und der potentielle Interaktionspartner, dann kann Letzterer eine Faltung induzieren und die ungeordneten *Coils* des CRY C-Terminus in Strukturen zwingen. Die energetischen Kosten dieser induzierten Faltungen lassen hochspezifische Interaktionen mit relativ geringer Affinität zu, die sich für Signalaustausche anbieten (SPOLAR et al. 1994, ROSENFELD et al. 1995). Diese Voraussetzungen wären besonders im Hinblick auf die bereits diskutierten Signalkaskaden mit einem oder mehreren Interaktionspartnern ideal. Ein solches Szenario wird durch die flexible Struktur der C-terminalen Domäne der Rotkehlchen CRY1-Varianten in der Retina unterstützt.

2.4.7 Funktionelle Interaktion zwischen Photolyase-homologer Region und C-Terminus bei Cryptochromen

Obwohl die Wichtigkeit der C-terminalen Domäne für die Funktion des Cryptochroms unumstritten ist, gibt es inzwischen Hinweise darauf, dass ohne eine Kommunikation zwischen ihr und bestimmter Regionen der Photolyase-homologen Domäne eine Konformationsänderung des Proteins nicht möglich ist.

Beim Säugetier CRY1 (*mCRY1*) wurden kürzlich innerhalb der PHR zwei Regionen gefunden, die in der Lage sein könnten, eine Strukturveränderung des *mCRY1* auszulösen. Diese Strukturänderung aktiviert den C-Terminus, der dann multiple transkriptionale Co-Repressor Komplexe (z.B. Histondeacetylase) rekrutieren könnte, um CLOCK/BMAL1-angetriebene Transkriptionen zu inhibieren (CHAVES et al. 2006). Kürzlich konnte auch bewiesen werden, dass die Homodimerisierung des *Arabidopsis*-CRY1 durch die PHR essentiell für die lichtabhängige Aktivierung des C-Terminus ist (SANG et al. 2005).

Die funktionelle Kommunikation zwischen der Photolyase-homologen Region des CRY1 und dessen C-Terminus scheint für die weiteren Vorgänge am C-Terminus entscheidend und möglicherweise ein typisches Merkmal von Cryptochromen zu sein (CHAVES et al. 2006). Über eine Kommunikation zwischen der PHR von *Erithacus*-CRY und dessen C-Terminus ist bislang noch nichts bekannt. Da sie in ihrer Aminosäuresequenz zu den PHRs anderer bisher beschriebenen Cryptochrome eine hohe Homologie aufweist, wäre eine solche Interaktion jedoch auch hier denkbar.

2.4.8 Ausblick

Vor dem Hintergrund der theoretischen Überlegungen (RITZ et al. 2000) sind der Nachweis von Cryptochrom in der Zugvogelretina und die damit verbundenen diskutierten Befunde ein möglicher Hinweis auf die Beteiligung dieser Pigmente im primären Magnetperzeptionsprozess. Allerdings muss die spezifische Rolle der zwei Typen von eCRY1 sowie der eigentliche Transduktionsmechanismus noch geklärt werden.

Eine quantitative Expressionsstudie könnte klären, zu welchen Zeiten die unterschiedlichen Spleißprodukte eCRY1a und eCRY1b in der Retina produziert werden und einen Hinweis auf eventuelle unterschiedliche Funktionen und Interaktionspartner liefern. Eine Lokalisation der spezifischen *Erithacus*-Cryptochromvarianten durch *in-situ* Hybridisierung und Immunlokalisation könnte Aufschluss über die Verteilung der möglichen Magnetrezeptoren auf der Zugvogelretina geben und die unter 2.4.4 postulierte Interaktion mit Opsinen möglicherweise stützen. Auch ein Vergleich mit der Verteilung von Cryptochrom in der Retina anderer Vertebraten wäre so möglich.

Im Hinblick auf die immer noch vorherrschenden Unklarheiten in Bezug auf die Struktur der C-Termini von Cryptochromen, ist eine erfolgreiche Synthetisierung und insbesondere Aufreinigung dieses Proteins in ausreichender Menge für eine

kristallographische Analyse dringend notwendig. Eine entsprechende Synthese beider Spleißvarianten des *Erithacus* 1-Cryptochroms wird derzeit in Kooperation mit M. AHMAD an der Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) und S. SAGASSER an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

3 Genexpressionsanalyse von eCRY1a und eCRY1b in der *Erithacus* - Retina durch quantitative RT-PCR

3.1 Einleitung

3.1.1 Motivation und Fragestellung

Mit Hilfe der molekularbiologischen Analysen in Kapitel 2 konnte ich zeigen, dass mindestens drei Formen von Cryptochrom in der Retina von *Erithacus rubecula* exprimiert werden (vgl. MÖLLER et al. 2004). Die Beteiligung am Magnetperzeptionsprozess ist jedoch nur für zwei der drei nachgewiesenen Cryptochrome, eCRY1a und eCRY1b, wahrscheinlich, da die Sequenz von eCRY2 ein aus anderen Vertebraten bekanntes Kernlokalisierungssignal im C-terminalen Bereich beinhaltet. Die Situierung im Zellkern macht eine Funktion als sensorischer Lichtrezeptor unwahrscheinlich (siehe 2.4.1). Aus diesem Grund konzentriere ich mich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die ermittelten Spleißprodukte des eCRY1-Lokus als potentielle Magnetfeldrezeptoren.

Im Anschluss an den Nachweis von Cryptochrom in der Retina eines Zugvogels soll in diesem Abschnitt der Arbeit das Vorkommen von eCRY1a und eCRY1b quantitativ ermittelt werden. Dabei sollen die spezifischen genetischen Expressionsmuster der zwei *Erithacus*-CRY1-Spleißvarianten im Tagesverlauf analysiert werden. Tagsüber könnte die Funktion des Magnetkompass zur Orientierung im Nahbereich über weniger oder ein anderes Verhältnis der Cryptochrom-Spleißvarianten gesteuert werden, als beim nächtlichen Zug. In der Dämmerungsphase, dem Zeitpunkt, an dem die Vögel die Richtungsentscheidung für ihre nächtliche Zugstrecke treffen (vgl. WILTSCHKO & WILTSCHKO 1978) wäre hingegen eine deutliche Steigerung der Cryptochrom-Expression denkbar. Falls diese erfolgt, so ist zu ermitteln, welche der Cryptochrom-Spleißvarianten in der Retina für diese Steigerung verantwortlich ist.

Verhaltensbiologische Experimente mit Rotkehlchen weisen des Weiteren auf eine starke Lateralisation des Magnetperzeptionsprozesses für die Kompassorientierung mit einer ausgeprägten Dominanz des rechten Auges bzw. der linken Hirnhemisphäre hin (WILTSCHKO et al. 2002). Daher soll ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchung auf einem Expressionsvergleich der zwei Spleißvarianten zwischen den beiden Augen liegen. Im Rahmen dieses Vergleichs kann möglicherweise geklärt werden, ob die beschriebene Lateralisation erst durch Verarbeitung im Gehirn entsteht, oder ob sie bereits in der Retina auf Rezeptorebene vorliegt.

In diesem Teil der Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie hoch ist die Expression von eCRY1a bzw. eCRY1b in der Retina von *Erithacus rubecula* zu den ausgewählten Uhrzeiten? Gibt es signifikante Unterschiede?
2. Ist ein spezifisches Expressionsmuster erkennbar?
3. Liegen Unterschiede in der Expression von eCRY1a und eCRY1b in rechtem und linkem Auge vor?
4. Falls ja, ist dieser Unterschied zu allen Uhrzeiten gleich?
5. Ist eine signifikante Steigerung der Transkriptionsmenge von eCRY1a bzw. eCRY1b in der Dämmerung, zum Zeitpunkt der Richtungsentscheidung der Vögel, erkennbar?
6. 3' RACE-Experimente (vgl. Kapitel 2) lassen auf eine geringere Transkriptionsmenge von eCRY1b im Vergleich zu eCRY1a schließen. Lassen sich diese Vermutungen durch die quantitative RT-PCR bestätigen?

3.1.2 Strategie

3.1.2.1 Quantitative Reverse-Transkriptions (RT) PCR

Die Untersuchungen in diesem Abschnitt der Arbeit wurden mit Hilfe einer quantitativen Reverse-Transkriptions (RT)-PCR durchgeführt.

Durch quantitative RT-PCR ist es möglich, anhand der Menge des PCR-Produktes direkt auf die Menge an eingesetzter mRNA zu schließen. Auf diese Weise kann die Transkriptionshäufigkeit von bestimmten Genen bzw. deren Spleißprodukten, hier eCRY1a und eCRY1b, ermittelt werden. Mit dieser Technik können demnach quantitative Aussagen über die Menge der tatsächlich zu einer bestimmten Tageszeit exprimierten Gene gemacht werden.

Der Vorteil gegenüber der alternativ zur Verfügung stehenden Northern-Blot-Analyse ist die etwa tausendfach höhere Sensitivität der quantitativen RT-PCR, mit der daher auch sehr seltene mRNA-Spezies sicher nachgewiesen werden können - im günstigsten Fall genügt eine einzige Kopie eines Gens (vgl. GASSEN & SCHRIMPF 1999). Letzteres schien insbesondere auch deshalb unabdinglich, da die Ergebnisse der 3' PCR-Experimente (vgl. Kapitel 2) bereits auf eine sehr geringe Expression von eCRY1b hingewiesen haben. Des Weiteren wurde diese Art der Untersuchung bereits in zahlreichen anderen Analysen, zum Beispiel zur genetischen Reaktion von Organismen auf Schadstoffexposition erfolgreich angewandt (z.B. HARMS et al. 2000).

Eine ausführliche Beschreibung der methodischen Einzelschritte findet sich in Abschnitt 3.2.

3.1.2.2 Auswahl der Zielfragmente

Die spezifischen 3'-Regionen der zwei Spleißprodukte des eCRY1-Lokus, eCRY1a und eCRY1b (vgl. Abschnitt 2.3.2), wurden als Zielfragmente ausgewählt. Die Primer flankieren eine Region von 188 bp (eCRY1a) und 208 bp (eCRY1b). Um eine Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde überdies ein intronüberspannendes eCRY1a Primer-Set verwendet (siehe auch 3.2.5).

3.1.2.3 Amplifikationsstandard und Kontrolle

Zur genauen Berechnung der eingesetzten Menge einer bestimmten cDNA-Spezies wird ein Amplifikationsstandard benötigt (siehe 3.2.6). In dieser Arbeit fungiert *Erithacus*-Aktin (eActin) cDNA als quantitativer Standard. *Erithacus*-Aktin wurde speziell für dieses Experiment aus der Rotkehlchenretina amplifiziert und genspezifische Primer designt (siehe 3.2.5). Als Kontrolle wurde cDNA aus Rotkehlchen-Flugmuskel (*Musculus pectoralis*) verwendet.

3.1.2.4 Präparatauswahl, -anzahl und Uhrzeiten

Um einerseits eine möglichst allgemeine Aussage über die Expression der Spleißprodukte des eCRY1-Lokus bei *Erithacus rubecula* machen zu können, und andererseits eine breite Streuung für die statistische Auswertung zu erhalten, wurden in diesem Versuchsansatz die Expression von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von Rotkehlchen aus drei verschiedenen Zugpopulationen der Jahrgänge 2001, 2002 und 2003 untersucht.

Mit dem Ziel, die Entnahme von Rotkehlchen aus der Natur möglichst gering zu halten wurde entschieden, ausgehend von 17:30 Uhr *central european time* (CET) vier Analysezeitpunkte über den Tag verteilt festzulegen. 17:30 Uhr wurde deshalb als Ausgangspunkt gewählt, weil dort die Dämmerung einsetzt und die Tiere zu diesem Zeitpunkt nachweislich ihre Richtungsentscheidung treffen. Sollte Cryptochrom 1 am Magnetperzeptionsprozess beteiligt sein, so würde man zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Steigerung der mRNA-Expressionswerte erwarten. Die Vögel wurden unter einem 13h hell:11h dunkel (13H:11D) Lichtrhythmus gehalten, wobei der simulierte Sonnenaufgang um 04:00 Uhr CET, der Sonnenuntergang um 17:00 Uhr CET erfolgte. Diese Zeiten sind laut Konvention äquivalent zu *zeitgeber time* (ZT) 0 und 13. Zum Zeitpunkt 17:30 Uhr wurden zunächst drei Vögel untersucht, des Weiteren je zwei Tiere um 11:00 Uhr (ZT 7), 22:30 Uhr (ZT 18.5) und 03:30 Uhr CET (ZT 23.5).

Bei Analysen der Expressionswerte beider Cryptochromgenvarianten waren bei den Populationen der Jahre 2001 und 2002 im Vergleich zwischen den Uhrzeiten sowie rechtem

und linkem Auge statistische Trends erkennbar. Aus diesem Grund wurde die Gesamtanzahl der untersuchten Vögel im Frühjahr 2004 (Tiere aus der Population 2003) für die Uhrzeiten 11:00 Uhr und 17:30 Uhr CET um ein Tier auf je vier Individuen erhöht. Für die Uhrzeiten 22:30 Uhr und 3:30 Uhr CET wurde ebenfalls um ein Tier auf je drei Individuen erhöht.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Alle in diesem Abschnitt der Arbeit verwendeten Retinae stammen von Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) aus drei unterschiedlichen Populationen, die jeweils im Herbst 2001, Herbst 2002 und Herbst 2003 gefangen wurden. Details über Fang, Lebensdaten und Haltungsbedingungen der Tiere können dem Abschnitt 2.2.1 entnommen werden. Vierzehn Vögel wurden insgesamt für die quantitative RT-PCR Studie randomisiert ausgewählt. Alle Tiere zeigten in zuvor durchgeführten Verhaltensversuchen zur Zugorientierung im Herbst 2001 und Frühjahr 2002, Herbst 2002 und Frühjahr 2003 sowie Herbst 2003 und Frühjahr 2004 (vgl. z.B. WILTSCHKO et al. 2004) normales Zugverhalten. Die Entnahme aus der Natur wurde von der unteren Naturschutzbehörde des Landes Hessen genehmigt. Eine detaillierte Aufstellung der Fangdaten und Zuordnung der Vögel zu den einzelnen Versuchen findet sich im Anhang (Seite I-V).

3.2.2 Präparation der Retinae und des Flugmuskels

Die Präparation der unterschiedlichen Retinae sowie des Flugmuskels erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben.

3.2.3 Isolation von Gesamt-RNA aus *Erithacus*-Retinae und -Flugmuskel

Die Herstellung von Gesamt-RNA aus den präparierten *Erithacus*-Retinae und -Flugmuskel erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben.

3.2.4 Synthese und Amplifikation der cDNA

Die reverse Transkription der *mRNA* aus Gesamt-RNA der rechten und linken *Erithacus*-Retina der unterschiedlichen Uhrzeiten sowie aus *Erithacus*-Flugmuskelproben erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben.

3.2.5 Primersynthese für Cryptochrom- und Aktin-Regionen

Cryptochromprimer für eCRY1a und eCRY1b:

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.2 erwähnt, wurden die 3'-Regionen der zwei Spleißprodukte des eCRY1-Lokus, eCRY1a und eCRY1b, die die spezifischen Sequenzabschnitte beinhalteten (siehe 2.3.1), als Zielsequenzen verwendet. Die Primer *am16* und *am17* flankieren eine Region von 188 bp (eCRY1a); *am18* und *am19* eine Region von 208 bp (eCRY1b). Sie wurden so konstruiert, dass ihre Schmelzpunkte möglichst hoch und nicht mehr als 1°C auseinander liegen. Somit wird erstens eine hohe Spezifität gewährleistet und zweitens garantiert, dass sie im selben Versuchsansatz einsetzbar sind.

Aktinprimer:

Aus einem DNA-Alignment von GenBank-Sequenzen der Spezies *Artemia* (GenBank Accession-Nr.: AJ269579), *Drosophila* (K00670), *Xenopus* (X03470), *Podocoryne* (X69058) und *Hydra* (M32364) wurden zunächst degenerierte Primer aus einem konservierten Bereich des Gens für Aktin erstellt (Universal Aktin forward: 5-GGTATYGCTGAYCGTATGCA-3, Universal Aktin reverse: 5-GAGATCCACATYTGTTGGAA-3; vgl. SCHROTH 2000). Mithilfe dieses degenerierten Primersets wurden rotkehlchenspezifische Aktinsequenzen isoliert, kloniert und sequenziert. Aus diesen Sequenzen wurde ein *Erithacus*-spezifisches eAktin-Primerset generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Aktinprimer eine ähnlich lange Region flankieren, wie die spezifischen Cryptochrom-Primer, möglichst gleich lang sind und einen ähnlich hohen Schmelzpunkt aufweisen, um im selben Versuchsansatz einsetzbar zu sein.

Die eAktin-Primer *am20* und *am21* flankieren eine Region von 202 bp, die als Expressionskontrolle und Referenz zur Quantifizierung der Cryptochrom- Transkriptmengen verwendet wurde. Alle in der quantitativen RT-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: In der quantitativen RT-PCR eingesetzte Primersets für eCRY1a (A), eCRY1b (B) und eAktin (C).

A) Intronüberspannender Primer für Q RT-PCR eCRY1a	
Forward Primer: am16 (Möller)	Reverse Primer: am17 (Möller)
5-GCA AGG TTA CTG TCA AGC AGG-3	5-CAA GCA GTT TAA TTT GTG CTC TG-3
B) Primer für Q RT-PCR eCRY1b	
Forward Primer: am18 (Möller)	Reverse Primer: am19 (Möller)
5-AGG AGG AGC TCA GCT GGG AA-3	5-GCA GAC AGC AGC TAT CAC CCA-3
C) Primer für <i>Erithacus</i>-Aktin (eAktin)	
Forward Primer: am20 (Möller)	Reverse Primer: am21 (Möller)
5-GCC CAG CAC CAT GAA GAT CA-3	5-AGG AGG GGG AGG AAC AGG AG-3

3.2.6 Quantitative RT-PCR

Da die Retinaprobe der verschiedenen Uhrzeiten und Tiere unterschiedliche Mengen an *mRNA* enthalten können, liefert die hier durchgeführte Quantifizierung nur einen Hinweis auf die Mindestmenge an *mRNA* im ursprünglichen Ansatz, jedoch keine absoluten Werte. Dieses Problem wird durch einen externen Standard gelöst, im Falle dieser Arbeit durch das Haushaltsgen (= gleichmäßig exprimiertes Gen) (β -) Aktin. Man nimmt an, dass Aktin über den Tagesverlauf in einer konstanten Menge exprimiert wird und bezieht die Menge an spezifischem Produkt dann auf dieses „Haushaltsgen“ (vgl. z.B. APOSTOLAKOS et al. 1993). Bei dem hier eingesetzten quantitativen Verfahren ist nicht die absolute Produktmenge der Cryptochrom-Gene entscheidend, sondern die relativ zur Aktinexpression transkribierte Menge.

Um zu gewährleisten, dass die amplifizierte Menge proportional zur eingesetzten cDNA-Templatmenge war, wurde die Zyklenzahl so gewählt, dass noch kein Sättigungsplateau erreicht war. Der Standardreaktionsansatz aller quantitativen RT-PCR Analysen ist aus Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Standard-Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR

PCR Reaktionsansatz für Quantitative RT-PCR	PCR-Programm Quantitative RT-PCR (Zyklus Parameter)
15,5µl ddH ₂ O	1 Zyklus: 2 min bei 94°C
2,5µl 10x Puffer Mix	40 Zyklen:
2µl MgCl ₂	0:30 min bei 94°C
1,5µl Forward Primer M13f (Invitrogen)	0:30 min bei 65°C
1,5µl Reverse Primer M13r (Invitrogen)	0:40 min bei 72°C
1µl dNTPs	1 Zyklus: 3 min bei 72°C
0,3µl Taq Polymerase	∞ bei 10°C
Vorlage: cDNA aus Retinae der unterschiedlichen Zugpopulationen und Tageszeiten	

3.2.7 Analyse der quantitativen RT-PCR Daten

Die quantitativen RT-PCR Reaktionen der entsprechenden Experimente wurden mit je 1/6 Volumen Ladepuffer (15% Ficol; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylencyanol) versetzt und parallel auf einem langen zweiprozentigen TBE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 Volt aufgetrennt. Um den durch die lange Laufzeit unvermeidlichen Verlust an Ethidiumbromid im Gel zu vermeiden, wurde der Laufpuffer zusätzlich mit Ethidiumbromid (10µg/ml) versetzt.

Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit einer digitalen Kamera dokumentiert.

Die digitalisierten quantitativen RT-PCR-Agarosebilder wurden zur Quantifizierung der Transkriptmengen mit Hilfe eines optisch densitometrischen Verfahrens auf Softwareebene analysiert (Macintosh Programm: NIH Image V1.62, public domain unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Die Umsetzung der jeweiligen Bandenintensitäten in quantifizierbare Einheiten erfolgte durch Analyse der Pixeldichte gegenüber dem Agarosegelhintergrund, der dann als Standard zur Kalibrierung der Graustufenwerte verwendet wurde. Die Werte der Pixelanzahl bzw. der optischen Dichte wurden graphisch in quantifizierbare Flächeneinheiten umgesetzt. Anschließend wurden die Transkriptmengen von eCRY1a und eCRY1b der unterschiedlichen Tagenzeiten mit der jeweiligen Menge an amplifiziertem *Erithacus*-Aktin relativiert: $A_{\text{Cryptochrom}}/A_{\text{eActin}} = A_{\text{relCRY}}$ (A = Flächeneinheit) und das Mengenverhältnis zur Negativkontrolle standardisiert. Die statistische Analyse der Bandenintensitäten erfolgte mittels eines *two-tailed t-tests*, bei dem auf einen Unterschied zwischen den Uhrzeiten sowie linker und rechter Retina geprüft wurde.

3.3 Ergebnis

In diesem Abschnitt der Arbeit konnten mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR die spezifischen genetischen Expressionsmuster der zwei *Erithacus*-Cryptochromgen-Spleißvarianten im Tagesverlauf ermittelt werden. Tabelle 3.3 zeigt die jeweiligen Transkriptmengen von eCRY1a und eCRY1b der unterschiedlichen Tageszeiten und Zugpopulationen in rechter und linker Retina relativiert zur jeweiligen Menge amplifiziertem *Erithacus*-Aktin. Das Mengenverhältnis wurde zur Negativkontrolle standardisiert.

Tabelle 3.3: Transkriptmengen von eCRY1a und eCRY1b (relativ zu eAktin) in rechter und linker Retina im Tagesverlauf in den jeweils untersuchten Zugpopulationen (x = keine Probenentnahme). Rotkehlchen wurden unter einem 13:11h hell:dunkel Lichtzyklus gehalten (Sonnenaufgang um 4 Uhr CET, Sonnenuntergang um 17 Uhr CET).

eCRY1a (<i>Gallus</i> -homolog)			eCRY1b (<i>Erithacus</i> -spezifisch)		
Uhrzeit CET (Jahr)	Linke Retina (A _{relCRY})	Rechte Retina (A _{relCRY})	Uhrzeit CET (Jahr)	Linke Retina (A _{relCRY})	Rechte Retina (A _{relCRY})
11:00 (2002)	x	x	11:00 (2002)	x	x
11:00 (2003)	3,32	1,62	11:00 (2003)	0,36	0,43
11:00 (2004)	3,3	3,70	11:00 (2004)	0,46	0,35
11:00 (2004)	4,29	3,87	11:00 (2004)	0,47	0,42
11:00 (2004)	5,81	2,40	11:00 (2004)	0,59	0,39
17:30 (2002)	5,84	1,89	17:30 (2002)	0,74	0,71
17:30 (2003)	7,35	2,19	17:30 (2003)	0,61	0,78
17:30 (2004)	7,03	2,48	17:30 (2004)	0,75	0,87
17:30 (2004)	4,38	2,17	17:30 (2004)	0,77	0,79
22:30 (2002)	5,06	1,42	22:30 (2002)	0,39	0,39
22:30 (2003)	6,02	1,26	22:30 (2003)	0,35	0,31
22:30 (2004)	6,53	2,69	22:30 (2004)	0,48	0,45
03:30 (2002)	2,99	2,98	03:30 (2002)	0,37	0,58
03:30 (2003)	2,81	3,43	03:30 (2003)	0,31	0,49
03:30 (2004)	3,65	3,86	03:30 (2004)	0,60	0,45

Die Untersuchung zeigt, dass sich die Genexpression von eCRY1a und eCRY1b sowohl zwischen den Augen als auch zwischen den Cryptochrom1-Varianten unterscheidet. Im Mittel sind die Expressionswerte von eCRY1a fünf- bis zehnmal höher als die von eCRY1b. Die aus den Vorversuchen geschlossene Annahme der niedrigen Expressionswerte von eCRY1b hat sich somit bestätigt. Bei der Expression der Spleißvariante eCRY1a liegt im

Tagesverlauf ein Unterschied zwischen den beiden Augen vor. Um 17:30 und 22:30 Uhr CET ist die Expression in der linken Retina signifikant höher als in der rechten (beide: $p < 0.01$; t -test). Um 11 und um 3:30 Uhr CET lassen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede feststellen (beide: $p > 0.05$, t -Test) (siehe Abb. 3.1).

Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Expressionsmuster von *eCRY1b* in beiden Augen nicht, zeigt jedoch einen signifikanten Anstieg zum Zeitpunkt der Dämmerung um 17:30 Uhr (Unterschied zu den drei anderen Uhrzeiten in beiden Augen: $p < 0.01$, t -test). Durch die unterschiedliche Expression von *eCRY1a* und *eCRY1b* in beiden Retinae verschiebt sich zu diesem Zeitpunkt das Verhältnis zwischen den beiden Cryptochromspleißvarianten im rechten Auge zugunsten von *eCRY1b*.

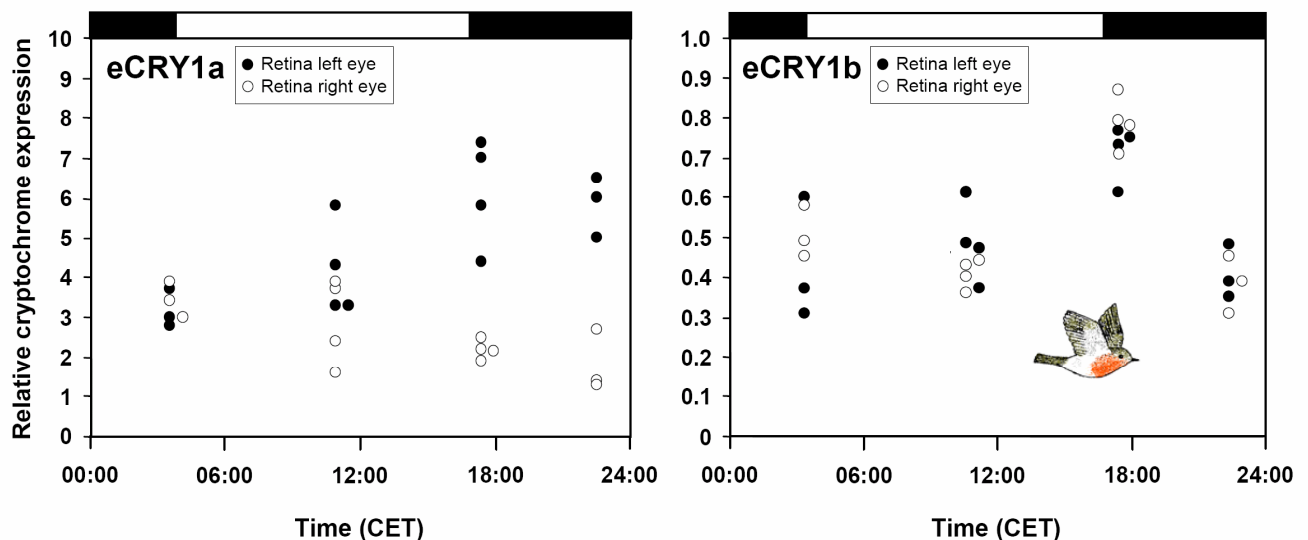


Abb. 3.1: Zeitliches Expressionsmuster der Cryptochrome *eCRY1a* und *eCRY1b* in der Retina von *Erithacus rubecula* relativ zu *Erithacus-Actin*. Die unterschiedlichen Skalen auf den Y-Achsen sind zu beachten: generell ist die Expression von *eCRY1a* fünf- bis zehnmals höher als die von *eCRY1b*. Die Tiere wurden unter 13H:11D gehalten (Sonnenaufgang bei ZT 0 = 4 Uhr CET, Sonnenuntergang bei ZT 13 = 17 Uhr; siehe weiße und schwarze Balken über den Graphen) und Retinae zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen (11, 17:30, 22:30 und 3:30 Uhr CET). Um 17:30 und 22:30 Uhr CET ist die Expression von *eCRY1a* in der linken Retina signifikant höher als in der rechten Retina ($p < 0.01$, t -Test); um 11:00 und 3:30 ist kein Unterschied messbar ($p > 0.05$, t -Test). *eCRY1b* zeigt das gleiche Expressionsmuster in beiden Retinae mit einem signifikanten Anstieg um 17:30 Uhr (Unterschied zu den drei anderen Uhrzeiten in beiden Augen $p < 0.01$, t -Test). Dadurch verschiebt sich das Verhältnis zwischen den beiden Cryptochromspleißvarianten im rechten Auge zugunsten von *eCRY1b* zum Zeitpunkt des Zugbeginns in der Dämmerung.

3.4 Diskussion

3.4.1 Lateralisation des Magnetkompass beginnt möglicherweise bereits auf Rezeptorebene

Die Expression von eCRY1a zeigt in der Dämmerung und nachts eine deutliche Asymmetrie zwischen linker und rechter Retina: sie ist zu diesen Zeiten im linken Auge signifikant höher. Ein spezifisches Expressionsmuster über den Tag ist bei eCRY1a hingegen nicht zu beobachten.

Im Gegensatz dazu scheint bei eCRY1b zwar keine asymmetrische aber dafür möglicherweise eine rhythmische Expression vorzuliegen, deren höchste Werte sich in der Dämmerungsphase finden, wenn Rotkehlchen ihren nächtlichen Zug beginnen und ihre Richtungsentscheidung treffen (WILTSCHKO & WILTSCHKO 1978). Zu dieser Zeit wird die Expression von eCRY1b signifikant hochreguliert. Weil die Expression von eCRY1a im rechten Auge gleichzeitig konstant niedrig bleibt, verschiebt sich interessanterweise damit zu diesem Zeitpunkt das Mengenverhältnis der beiden Cryptochromtranskripte im rechten Auge zugunsten von eCRY1b. Diese Hochregulation von eCRY1b zur Zeit der Dämmerung in der Zugvogelretina und die Verschiebung zu dessen Gunsten im rechten Auge lässt spekulieren, dass es sich bei dieser eCRY1-Spleißvariante möglicherweise um das gesuchte Magnetrezeptormolekül handeln könnte.

Üblicherweise basieren die sensorischen Systeme von Vertebraten auf bilateralsymmetrischen Sinnesorganen. Vögel verwenden jedoch entweder ihr rechtes oder linkes Auge, um neue oder bekannte Objekte zu betrachten (BEECHER 1978, DHARMARETNA & ANDREW 1994). Auftretende Asymmetrien bei Funktionen des visuellen Systems sind innerhalb dieser Tiergruppe mehrfach bestätigt (ROGERS 1996, GÜNTÜRKÜN 1997, VALLORTIGARA et al. 1996, TOMMASI & VALLORTIGARA 2001). Versuche mit Vögeln, denen ein Auge abgedeckt wurde, zeigen, dass das linke Auge offensichtlich auf die geometrischen Aspekte visueller Signale und neuen Stimuli spezialisiert ist (TOMMASI & VALLORTIGARA 2001), während das rechte Auge vorwiegend für Objektsehen zuständig ist (ROGERS 1996, GÜNTÜRKÜN 1997).

Versuche mit Tauben, Rotkehlchen und Australischen Brillenvögeln weisen darüber hinaus auf eine Beteiligung des rechten Auges am Wahrnehmungsprozess des Erdmagnetfelds hin (PRIOR et al. 2001, ULRICH 1999, WILTSCHKO et al. 2002, WILTSCHKO et al. 2003). Tauben, denen auf dem Heimflug zu ihrem Schlag lediglich das rechte Auge zur Verfügung stand, verrichteten diese Aufgabe deutlich besser als Tauben mit abgedecktem rechten und offenem linken Auge (PRIOR et al. 2001). In einem ähnlichen Versuch waren

diese Unterschiede bei bedecktem Himmel besonders groß (ULRICH 1999), was auf eine mögliche Beteiligung des Magnetkompass hinweist. Orientierungsversuche mit Rotkehlchen und Australischen Brillenvögeln, denen abwechselnd eines ihrer Augen abgedeckt wurde, konnten diese Annahme unterstützen (WILTSCHKO et al. 2002, WILTSCHKO et al. 2003). Unter Verwendung eines Inklinationskompasses konnten die Vögel mit dem rechten Auge die Richtung des Erdmagnetfelds perzipieren und waren in Verhaltensversuchen in ihrer jahreszeitlichen Zugrichtung orientiert. Stand ihnen nur das linke Auge zur Verfügung, brach die Orientierung zusammen. Diese Versuche deuten auf eine starke Asymmetrie des Magnetperzeptionsprozesses bei Vögeln hin.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Sehnerven bei Vögeln nahezu vollständig kreuzen (COWAN et al. 1961) und Verbindungen zwischen den beiden Hemisphären eher selten sind, wird davon ausgegangen, dass die beschriebenen Arbeitsteilungen der beiden Augen einzig auf eine Spezialisierung der zerebralen Hemisphären zurückzuführen ist, bei der Signale der linken Retina mehrheitlich von der rechten Hemisphäre verarbeitet werden und umgekehrt. Es wird angenommen, dass zumindest die visuelle Spezialisierung der Hemisphären beim Stamm Aves durch eine uneinheitliche Photostimulation der Augen in den letzten drei bis vier Tagen der Embryonalentwicklung zurückzuführen ist (ROGERS & BOLDEN 1991, ROGERS & KREBS 1996). Jedoch deuten Untersuchungen von HART et al. (2000a,b) sowie die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit darauf hin, dass eine Lateralisierung von zumindest einigen sensorischen Aufgaben der Retina bereits auf Rezeptorebene beginnen kann.

Bei Staren (*Sturnus vulgaris*) und bei Blaumeisen (*Parus caeruleus*) konnte eine signifikante Asymmetrie bei der Verteilung der Photorezeptoren in rechter und linker Retina festgestellt werden (HART et al. 2000a,b). Neben einer Klasse von Stäbchen besitzt die Retina eines Vogels vier unterschiedliche Einzelzapfen, deren Sensitivitäten im UV-Bereich (UVS; *UV-sensitive*), sowie im kurzwelligen (SWS; *short-wavelength-sensitive*) mittelwelligen (MWS; *medium-wavelength-sensitive*) und langwelligen (LWS; *long-wavelength-sensitive*) Bereich des Spektrums liegen. Des Weiteren gibt es im langwelligen Bereich sensitive (LWS)-Doppelzapfen, die aus einer Haupt- und einer Untereinheit bestehen (vgl. z.B. BOWMAKER et al. 1997). Bis auf die Untereinheit des Doppelzapfens enthalten alle Zapfen Öltröpfchen, die sowohl bei Vögeln als auch Reptilien nachweislich als spektrale Kantenfilter fungieren (z. B. NEUMEYER & JÄGER 1985, MAIER & BOWMAKER 1993, KAWAMURO et al. 1997, BOWMAKER et al. 1997). Sowohl beim Star, als auch bei der Blaumeise finden sich signifikant mehr LWS- und MWS-Einzelzapfen in der linken Retina. Die Anzahl der Doppelzapfen war hingegen in der rechten Retina signifikant höher. Interessanterweise wird angenommen,

dass die Einzelzapfen bei Vögeln in erster Linie für die Farbwahrnehmung zuständig sind (VOROBYEV & OSORIO 1998, MAIER & BOWMAKER 1993) während die Doppelzapfen an der Detektion von Bewegungen beteiligt sind (CAMPENHAUSEN & KIRSCHFELD 1998). Eine Spezialisierung der linken Retina auf Farbunterscheidung und der rechten auf Bewegungserkennung ist demnach nicht auszuschließen.

Der Befund über die asymmetrische Verteilung von Photorezeptoren in den beiden Retinae von Vögeln und eine damit verbundene mögliche Spezialisierung des visuellen Systems auf Rezeptorebene unterstützt die Spekulation, dass auch die beobachtete Lateralisation des Magnetkompass bei Zugvögeln nicht erst auf der zerebralen Ebene, sondern bereits auf der Ebene des Rezeptors beginnt.

Die Annahme, dass bei Vögeln eine Lateralisierung von nicht-visuellen lichtabhängigen Aufgaben, wie z.B. der Perzeption des Erdmagnetfelds zur Orientierung beim Vogelzug, bereits auf Rezeptorebene vorliegt, wird durch die asymmetrische Regulation der Expression von *eCRY1a* und *eCRY1b* in rechtem und linkem Auge noch bestärkt. Dabei ist anzumerken, dass eine Asymmetrie der Rezeptoren nicht mit einer Asymmetrie der Genregulation korreliert sein muss.

3.4.2 Vergleiche mit retinalen CRY1-Expressionsstudien anderer Spezies

Sollte die Lateralisation des Magnetkompass entgegen der in Abschnitt 3.4.1 diskutierten Spekulation jedoch erst im Gehirn stattfinden, so sind die beobachteten Expressionsunterschiede von *eCRY1a* zwischen den Augen und die Verschiebung des Verhältnisses von *eCRY1a* und *eCRY1b* zur Dämmerung für den Magnetkompass höchstwahrscheinlich nicht relevant. Die Ergebnisse würden dann vermutlich lediglich die rhythmische Expression von *eCRY1a* - und möglicherweise auch *eCRY1b* - als Teil des circadianen Systems aufzeigen.

Retinale CRY1-Expressionsstudien zur circadianen Rhythmik liegen von *Mus*, *Xenopus*, *Gallus*, *Coturnix* und *Spalax* vor. Während bei Mäusen (*Mus musculus*), die unter einem 12H:12D Lichtregime gehalten wurden, keine rhythmische Expression von *mCRY1* in der Retina festgestellt werden konnte (MIYAMOTO & SANCAR 1998), zeigten unter diesem Zyklus gehaltene Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) einen robusten Rhythmus mit einem deutlichen Anstieg der *xCRY1 mRNA* in der Dunkelphase um ZT 16 (ZHU & GREEN 2001). In der Hühner-Retina (*Gallus gallus*) findet sich bei Haltungsbedingungen unter gleichem Lichtzyklus dagegen eine rhythmische Expression von *cCRY1* mit höchster Expression in der Hellphase bei ZT 8 (HAQUE et al. 2002). Diese Ergebnisse sind mit der retinalen *qCRY1* Expression bei Japanischen Zwergwachteln (*Coturnix coturnix*) nahezu identisch (FU et al.

2002). Die höchste Expression des retinalen Cryptochrom 1 beim Blindmull *Spalax ehrenbergi* konnte am Ende der Lichtphase (ZT 12) festgestellt werden (AVIVI et al. 2004).

Obwohl zumindest die C-terminalen Domänen von cCRY1, xCRY1 und eCRY1a hohe Homologien aufweisen, kann dennoch keine der hier aufgeführten Studien zum Vergleich mit der quantitativen RT-PCR Untersuchung in diesem Teil der Arbeit herangezogen werden.

Erstens hat keine der erwähnten Arbeitsgruppen die spezifische CRY1-Expression in den Retinae der einzelnen Augen analysiert. Darüber hinaus wird aus den Methodenbeschreibungen nicht ersichtlich, ob es sich bei den aufgeführten Expressionswerten um den jeweiligen Mittelwert beider Augen eines Individuums oder den Mittelwert der Retinae aller untersuchten Tiere zu einer bestimmten Uhrzeit handelt.

Zweitens wurde in keiner der Arbeiten die retinale Expression von möglicherweise spezifischen Formen von CRY1 untersucht. Die ausgewählten Zielfragmente aller hier aufgeführten Untersuchungen sind sehr lang und beinhalten Abschnitte der Photolyase-homologen Region (Länge der ausgewählten Zielfragmente für CRY1: *Mus* 719 bp, *Xenopus* 736 bp, *Gallus* 1300 bp, *Coturnix* 823 bp, *Spalax* 1060 bp. Zum Vergleich: *Erithacus* 1a: 188 bp, *Erithacus* 1b: 208 bp). Da sich Cryptochrome bekannterweise lediglich in ihren C-terminalen Regionen unterscheiden, ist daher nicht auszuschließen, dass statt der Expression eines spezifischen CRY1 stets die Expression eines Pools aus mehreren unterschiedlichen Cryptochrom1-Varianten untersucht wurde.

3.4.3 Ausblick

Nachdem die hier durchgeführte quantitative Expressionsstudie klären konnte, zu welchen Zeiten welche Mengen an mRNA der unterschiedlichen Spleißprodukte eCRY1a und eCRY1b in der Retina produziert werden, muss nun eine Lokalisation dieser mRNA der spezifischen *Erithacus*-Cryptochromvarianten Aufschluss über die Verteilung auf der Zugvogelretina geben. Da nicht auszuschließen ist, dass Expressionsort und Bestimmungsort des Proteins sich möglicherweise unterscheiden, sollte sowohl eine Lokalisation der mRNA als auch des Proteins erfolgen. Insbesondere sollte geklärt werden, in welchem retinalen Zelltyp die Cryptochrom1-Varianten hauptsächlich exprimiert werden.

4 mRNA *in-situ* Hybridisierung und immunohistochemische Lokalisation von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von *Erithacus rubecula*

4.1 Einleitung

4.1.1 Motivation und Fragestellung

Durch die quantitativen RT-PCR Analysen in Kapitel 3 konnte ich ein spezifisches Expressionsmuster der zwei Cryptochromgen-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b in der Rotkehlchenretina nachweisen und quantitative Aussagen über die Menge der exprimierten Gene treffen. Im Mittel sind die Expressionswerte von eCRY1a fünf- bis zehnmal höher als die von eCRY1b. Die Expression von eCRY1a zeigt in der Dämmerung und nachts eine deutliche Asymmetrie zwischen linker und rechter Retina, scheint jedoch kein spezifisches Expressionsmuster über den Tag zu besitzen. Dagegen liegt bei eCRY1b zwar keine asymmetrische aber dafür möglicherweise eine rhythmische Expression vor, deren höchste Werte in der Dämmerungsphase liegen. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Tageszeiten wird die Expression von eCRY1b um 17:30 Uhr CET in beiden Retinae signifikant gesteigert.

Die Frage der räumlichen Anordnung der Cryptochrome in der Retina blieb bei der quantitativen RT-PCR jedoch unbeantwortet. Auch ob der spezifische Expressionsanstieg der Spleißvariante eCRY1b zum Zeitpunkt der Dämmerung möglicherweise auf die Expressionssteigerung in einem speziellen retinalen Zelltyp zurückzuführen ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Da nicht auszuschließen ist, dass Expressionsort und Bestimmungsort des Proteins sich möglicherweise unterscheiden, sollte sowohl eine Lokalisation der mRNA als auch des Proteins erfolgen.

LEASK (1977) sowie SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) schlagen im Hinblick auf die Photopigment-Radikalpaarhypothese und auch wegen ihrer sphärischen Anordnung die Photorezeptoren der Retina als Ort der Magnetperzeption vor. Dort könnte sich möglicherweise ein von der Richtung des Magnetfeldes abhängiges Erregungsmuster ergeben, aus dem der Vogel dann die axiale Richtung des Magnetfeldes ableiten könnte. Ein Nachweis von Cryptochrom in den retinalen Photorezeptoren von *Erithacus* in diesem Abschnitt meiner Arbeit würde diese Annahme unterstützen.

Darüber hinaus werden vornehmlich von RITZ et al. (2000) als möglicher Ort der Magnetrezeption in der Retina morphologisch auffällige deplazierte retinale Ganglienzellen (*Displaced Ganglion Cells*; DGCs) diskutiert. Diese Zellen sind in unregelmäßigen Abständen im proximalen Teil der inneren Körnerschicht (*Inner Nuclear Layer*, INL) der

gesamten Retina verteilt (FITE et al. 1981, BRITTO et al. 1988, NALBACH et al. 1993). Diese retinalen Ganglienzellen können dadurch unterschiedliche Raumrichtungen repräsentieren und erfüllen so ebenfalls eine entscheidende Voraussetzung für die Theorie des Radikalpaarmodells. Ein Nachweis von Cryptochrom in den DGCs der Retina von *Erithacus* würde die Theorie einer Beteiligung dieses spezifischen Zelltyps untermauern.

Im Rahmen dieses Teils der Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

m-RNA

1. Wo in der Retina von *Erithacus rubecula* wird die mRNA von eCRY1a bzw. eCRY1b exprimiert?
2. Ist die Verteilung diffus oder können die beiden eCRY1-Spleißformen spezifischen retinalen Zellschichten- oder -typen zugeordnet werden?
3. Wenn ja, befinden sich beide Spleißformen in den gleichen Zelltypen?
4. Gibt es hinsichtlich der Verteilung von eCRY1a und eCRY1b Unterschiede zwischen Tag (11 Uhr) und Dämmerung (17:30 Uhr)?
5. In der quantitativen PCR ist zwischen 11 Uhr und 17:30 Uhr ein deutlicher Anstieg der Expression beider Chryptochrom-Spliceformen erkennbar. Sind diese Unterschiede in den Expressionsraten möglicherweise auch im *mRNA in-situ* Experiment erkennbar?
6. Ist der signifikante Anstieg der Expression von eCRY1b um 17:30 Uhr dem Anstieg in einem spezifischen Zelltyp zuzuordnen?

Protein

1. Wo in der Retina von *Erithacus rubecula* ist das Protein von eCRY1b lokalisiert?
2. Kann das Protein spezifischen retinalen Zellschichten- oder -typen zugeordnet werden?
3. Sind Expressionsort der mRNA und Lokalisation des Proteins innerhalb der Retina gleich?
4. Gibt es hinsichtlich der Verteilung des eCRY1b-Proteins Unterschiede zwischen Tag (11 Uhr) und Dämmerung (17:30 Uhr)?

4.1.2 Strategie

4.1.2.1 *In-situ* Hybridisierung

Um herauszufinden, in welchen Zellen der *Erithacus*-Retina die spezifischen Nucleinsäuresequenzen von eCRY1a und eCRY1b tatsächlich lokalisiert sind, wurden in diesem Abschnitt der Arbeit nun mehrere sogenannte *mRNA in-situ* Hybridisierungen mit spezifischen einzelsträngigen RNA-Sonden durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, den Expressionsort spezifischer Gene durch eine Farbreaktion im Gewebe nachzuweisen. Dabei wird die Messenger-RNA (*mRNA*) der zu untersuchenden Gene mit einer komplementären RNA-Sonde hybridisiert und der Komplex durch eine chromogene Farbreaktion im Gewebe nachgewiesen. Sondendesign und -synthese erfolgten eigenständig aufgrund der vorliegenden Gensequenzdaten aus Kapitel 2 dieser Arbeit.

4.1.2.1.1 *In-situ* Hybridisierung mittels *mRNA*

Die Übertragung der genetischen Information von DNA auf Protein geschieht mittels *mRNA*. Mit einer *mRNA in-situ* Hybridisierung weist man die Genaktivität und damit die Verteilung von spezifischen *mRNA*-Molekülen in den Zellen eines Gewebeverbandes nach, um auf diese Weise die gewebs- oder zelltypspezifische Expression eines bestimmten Gens und mitunter auch dessen zeitlichen Verlauf zu verfolgen.

Für quantitative Aussagen über die Stärke der jeweiligen Expression in einem bestimmten Gewebe ist die *mRNA in-situ* Hybridisierung jedoch nicht geeignet. Um eine Aussage über die tatsächliche Menge der jeweiligen *ErithacusCRY-mRNA* treffen zu können, wurde daher in Kapitel 3 dieser Arbeit eine quantitative Reverse-Transkriptase PCR durchgeführt.

4.1.2.1.2 Design der RNA-Sonden

Obwohl im Gebrauch aufwendiger, da RNase-freies Arbeiten erforderlich ist, habe ich in dieser Arbeit einzelsträngige RNA-Sonden verwendet. Das liegt erstens darin begründet, dass aufgrund der größeren Stabilität von RNA-RNA-Hybriden stringenter Hybridisierungsbedingungen gewählt werden können, wodurch sich ein besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ergibt (vgl. GASSEN & SCHRIMPF 1999). Zweitens können durch diese Eigenschaft auch sehr kleine Mengen einer bestimmten Zielsequenz detektiert werden - bei eCRY1b weisen die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR auf eine geringe Expression hin. Drittens können unspezifische Bindungen durch RNase-Verdau relativ einfach entfernt, und der Hintergrund so auf ein Minimum reduziert werden.

Um eine Kreuzhybridisierung der beiden Sonden zu verhindern und die höchstmögliche Spezifität zu erreichen, habe ich die Sondenabschnitte so gewählt, dass keine Homologien der einzelnen *mRNA* Moleküle zueinander vorliegen. Da der spezifische Teil der *eCRY1*-Gene jedoch erst nach der Schnittstelle des Enzyms *EcoRI* beginnt (vgl. Kapitel 2), habe ich bei der *eCRY1b*-Sonde einen Teil der genspezifischen 3' UTR eingebaut (siehe Abb. 4.1). Darüber hinaus mussten beide Sonden die gleichen Parameter besitzen, um im selben experimentellen Ansatz zum Einsatz kommen zu können. Ich habe eine Basenabfolge und -länge gewählt, die eine möglichst hohe Hybridisierungstemperatur zulässt, um so eine spezifische Bindung zu garantieren. Beide Sonden wurden vor ihrem Einsatz auf mögliche Sekundärstrukturbildung untersucht und entsprechend optimiert.

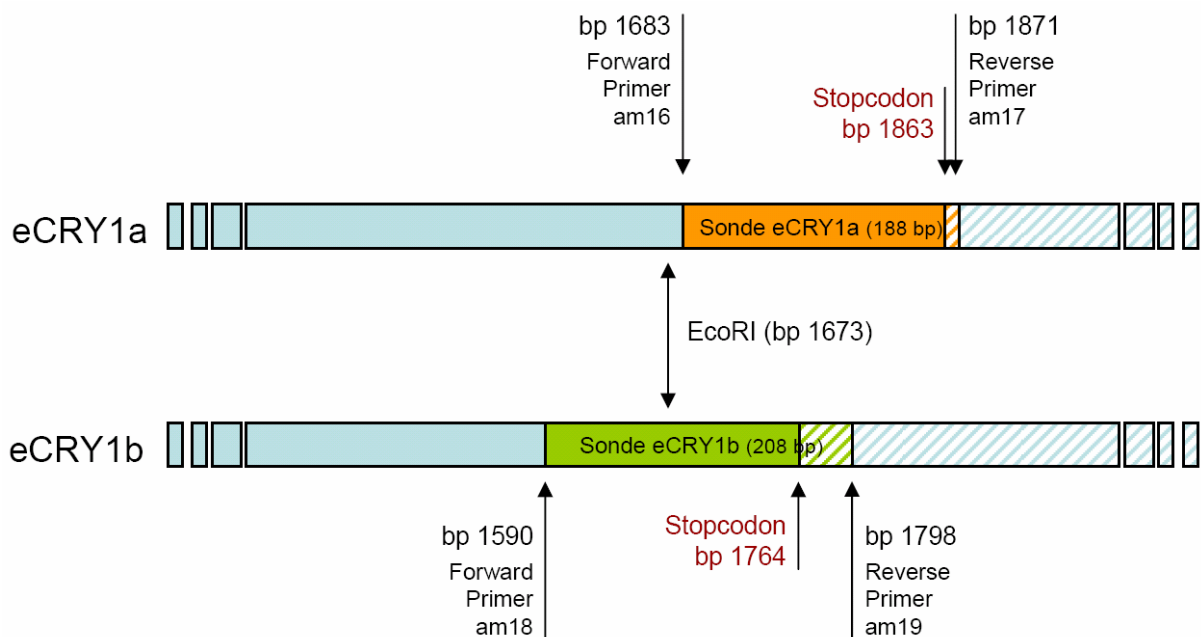


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der verwendeten *mRNA*-Sonden zum Nachweis von *eCRY1a* und *eCRY1b* im Zellverband der Rotkehlchenretina. Nach der eingezeichneten Schnittstelle des Enzyms *EcoRI* sind die Sequenzen nicht mehr homolog. Die schraffierten Gebiete stellen die Bereiche der 3' UTR (*untranslated region*) dar.

4.1.2.1.3 Nachweis der *mRNA*-Sonden im Gewebe

Für die Herstellung der Sonden wurden in dieser Arbeit nicht-radioaktiv Digoxigenin (DIG) markierte Nucleotide verwendet. Diese können über eine Inkubation mit einem spezifischen Anti-DIG AP Antikörper nachgewiesen werden, der an das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das gebundene AP wird durch den Umsatz des chromogenen Substrats 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazolium (NBT) im Gewebe nachgewiesen. Es entsteht ein blau-violett gefärbtes Präzipitat (siehe Abb. 4.2).

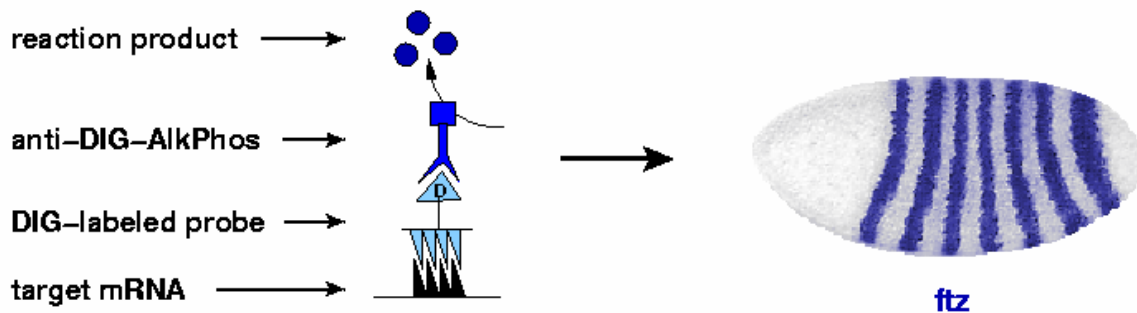


Abb. 4.2: Funktionsweise einer DIG-markierten mRNA Sonde am Beispiel des Expressionsmusters des *ftz*-Gens bei *Drosophila* (aus: TOMANCAK et al. 2002)

4.1.2.2 Immunohistochemische Nachweise von eCRY1 in der Rotkehlchen Retina

Eine Lokalisation der spezifischen eCRY1-mRNA im Gewebeverband lässt nicht ohne weiteres auf die Verteilung des entsprechenden eCRY1-Proteins schließen, da Proteine vom Ort der Produktion innerhalb der Zelle oder des Gewebeverbandes oft in andere Bereiche transportiert werden. Endgültige Aussagen über die Lokalisation der CRY1-Proteine im Vergleich zu der eCRY1-mRNA und über einen potentiellen Proteintransport lassen sich erst in Kombination mit einem immunohistochemischen Ansatz mit spezifischen Antikörpern treffen.

Da zur immunohistochemischen Lokalisation der eCRY1a-Spleißvariante bereits Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe vorlagen (vgl. MOURITSEN et al. 2004), habe ich mich in dieser Arbeit auf die Immunolokalisation der Spleißvariante eCRY1b konzentriert. Aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz von eCRY1b aus Kapitel 2 wurde ein synthetisches Peptid aus den letzten 11 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (Antigen) zur Gewinnung polyklonaler Antikörper hergestellt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

4.1.2.3 Präparatauswahl und Uhrzeiten für mRNA *in-situ* und Immunohistochemie

Um die Entnahme von Rotkehlchen aus der Natur möglichst gering zu halten, habe ich entschieden, mich lediglich auf zwei Zeiten der Cryptochromexpression im Tagesverlauf festzulegen. In der vorausgegangenen quantitativen RT-PCR konnte ein signifikanter Anstieg beider Cryptochromgen-Spleißvarianten von 11 Uhr nach 17:30 Uhr (CET) aufgezeigt werden (vgl. Kapitel 3). Darüber hinaus erschien ein Vergleich zwischen einem Zeitpunkt am Tag und einem zum Zeitpunkt der Dämmerung bei einem nachtziehenden Vogel, der seinen Zug in der Dämmerung beginnt, sinnvoll. Aufgrund dessen habe ich entschieden, jeweils das

linke Auge von drei 11 Uhr-Tieren und drei 17:30 Uhr-Tieren auf die Lokalisation der mRNA zu untersuchen. Das rechte Auge wurde jeweils für immunohistochemische Untersuchungen mit Antikörpern fixiert.

4.2 Material & Methoden

4.2.1 Versuchstiere

Die in diesem Abschnitt der Arbeit untersuchten Rotkehlchen-Retinae stammen von Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) aus drei unterschiedlichen Populationen, die jeweils im Herbst 2002, 2003 und 2004 gefangen wurden. Details über Fang, Lebensdaten und Haltungsbedingungen der Tiere können dem Abschnitt 2.2.1 entnommen werden. Sechs der Vögel wurden für die mRNA-Hybridisierungsversuche bzw. die Immunohistochemie mit Antikörpern randomisiert ausgewählt. Alle Tiere zeigten in zuvor durchgeführten Verhaltensversuchen zur Zugorientierung im Herbst 2002 und Frühjahr 2003, Herbst 2003 und Frühjahr 2004 sowie Herbst 2004 und Frühjahr 2005 (vgl. z.B. WILTSCHKO et al. 2004) normales Zugverhalten. Ihre Entnahme aus der Natur wurde von der unteren Naturschutzbehörde des Landes Hessen genehmigt. Eine detaillierte Aufstellung der Fangdaten und Zuordnung der Vögel zu den einzelnen Versuchen findet sich im Anhang (Seite I-V).

4.2.2 Präparation der Retinae

4.2.2.1 Retinapräparation und Fixierung für mRNA *in-situ* Hybridisierung

Drei der sechs randomisiert ausgewählten Tiere wurden im März 2003, 2004 und 2005 um 11 Uhr bei Tageslicht mit Ketavet[®] (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid; Curamed/Bayer) betäubt und anschließend dekapitiert. Die anschließende Präparation der Retina erfolgte ebenfalls unter Tageslichtbedingungen. Das jeweils linke Auge wurde aus dem Schädel freipräpariert, am Rand des Augenbechers entlang aufpräpariert und Linse sowie Glaskörper entfernt. Die Retina wurde für die mRNA *in-situ* Hybridisierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) fixiert und anschließend bei +4°C in 4% PFA gelagert. Die drei 17:30 Uhr-Tiere wurden ebenfalls mit Ketavet[®] betäubt und anschließend dekapitiert, alle Schritte wurden jedoch in völliger Dunkelheit durchgeführt. Die Präparation und Fixierung der linken Retinae erfolgte wie bei den 11 Uhr-Tieren, jedoch unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²). Zur detaillierten Beschreibung der Bedingungen, ausgewählten Vogelnummern, Lagerung der Präparate etc. siehe auch Anhang Seite I-V.

4.2.2.2 Retinapräparation und Fixierung für die Immunohistochemie

Die Präparation der jeweils rechten Retina erfolgte wie unter 4.2.2.1 beschrieben. Die Fixierung erfolgte 20 min in 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Fixativ 3x 10 min in PBS ausgewaschen. Die Retinae wurden dann in eine sterile Saccharose Reihe (10%, 20% und 30% Saccharose in PBS) überführt und bis zum jeweiligen Absinken bei +4 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in 30% steriler Saccharose in PBS mit 0,05% Natrium Azid.

4.2.3 Herstellung von Retina-Gefrierschnitten für mRNA *in-situ* Hybridisierung und Immunohistochemie

Die in 4%igem PFA bei +4°C fixierten linken Retinae für die mRNA *in-situ*s wurden in 30% sterile Succrose in PBS überführt und bis zum Absinken bei +4°C inkubiert. Die in 30%iger Succrose bei -20°C gelagerten rechten Retinae für die Immunohistochemie wurden bei +4°C langsam aufgetaut. Anschließend wurden sowohl die linken als auch rechten Retinae in Einbettmedium (Leica, Nussloch) eingebettet, entsprechend ausgerichtet, zugeschnitten und auf einen Kryostatblock bei -18°C aufgefroren. Es wurden 14 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Superfrost®Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig) gesammelt. Um eine mögliche RNase-Kontamination der Schnitte für die mRNA *in-situ* Hybridisierungen zu verhindern, wurden beim Schneiden und Sammeln der Retinae Handschuhe getragen und das Messer in regelmäßigen Abständen mit RNase AWAY® (Molecular Bio-Products) gereinigt. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei -20 °C getrennt gelagert.

4.2.4 Material & Methoden für die mRNA *in-situ* Hybridisierung

4.2.4.1 Amplifikation der spezifischen Sondenvorlagen mittels PCR

Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 erwähnt, wurden die Sondenabschnitte von eCRY1a und eCRY1b so gewählt, dass eine höchstmögliche Spezifität gewährleistet ist. Zu diesem Zweck wurden 4 Primer designt, deren amplifizierte Abschnitte von der Ursprungs-cDNA: a) keine Homologien enthalten, b) ungefähr gleich lang sind und c) eine höchstmögliche Hybridisierungstemperatur ermöglichen (hier 65°C) (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Sondenprimer für eCRY1a und eCRY1b (jeweils forward und reverse)

Designer Primer für Sonde eCRY1a	
Forward Primer: am16 (Möller)	Reverse Primer: am17 (Möller)
5-GCAAGGTTACTGTCAAGCAGG-3	5-CAAGCAGTTTAATTTGTGCTCTG-3
Designer Primer für Sonde eCRY1b	
Forward Primer: am18 (Möller)	Reverse Primer: am19 (Möller)
5-AGGAGGAGCTCAGCTGGGAA-3	5-GCAGACAGCAGCTATCACCCA-3

Mittels Polymerasekettenreaktion (vgl. 2.2.2.7) wurden die Sonden-Sequenzen exponentiell vervielfältigt. Reaktionsansätze und Zyklusparameter des PCR Programms sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: PCR-Reaktionsansatz für mRNA-Sondenvorlagen eCRY1a und eCRY1b.

PCR Reaktionsansatz für Sonde eCRY1a	PCR Reaktionsansatz für Sonde eCRY1b	PCR Programm (Zyklus Parameter)
16,2µl ddH ₂ O	16,2µl ddH ₂ O	1 Zyklus: 2 min bei 94°C
2,5µl 10x Puffer Mix	2,5µl 10x Puffer Mix	45 Zyklen:
2µl MgCl ₂	2µl MgCl ₂	0:30 min bei 94°C
1µl Forward Primer am16 (Möller)	1µl Forward Primer am18 (Möller)	0:30 min bei 65°C
1µl Reverse Primer am17 (Möller)	1 µl Reverse Primer am19 (Möller)	0:40 min bei 72°C
1µl dNTPs	1 µl dNTPs	1 Zyklus: 3 min bei 72°C
0,3µl Taq Polymerase (Roche)	0,3µl Taq Polymerase (Roche)	∞ bei 10°C
Vorlage: 1 µl cDNA <i>Erithacus</i> -Retina Links 18:30 (1:20)	Vorlage: 1 µl cDNA <i>Erithacus</i> -Retina Li 18:30 (1:20)	

4.2.4.2 Analyse, Extraktion und Aufreinigung der PCR Produkte aus dem Agarosegel

Analyse, Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte im Anschluss an die PCR erfolgten wie in Kapitel 2 beschrieben (vgl. 2.2.2.8 und 2.2.2.9).

4.2.4.3 Ligation der Sondenvorlage in Transkriptionsplasmidvektoren und Klonierung in chemisch kompetente *E. coli*

Nach nochmaliger Analyse des aufgereinigten Eluats der Sondenvorlagen eCRY1a und eCRY1b auf einem Agarosegel wurden diese in Transkriptionsvektoren ligiert und

anschließend in kompetente Bakterien transformiert (vgl. 2.2.2.10 und 2.2.2.11). Die Zielklone wurden im Anschluss mittels Bakterien-PCR indentifiziert (vgl. 2.2.2.12).

4.2.4.4 Aufreinigung und Sequenzierung der Sondenvorlagen zur Identifikation der Orientierung im Vektor

Um die Orientierung der Sondenvorlagen im pCR[®]II-TOPO Vektor zu indentifizieren, wurden die PCR-Produkte aus der Bakterien-PCR über Milliporese[®]-Säulen (Millipore) aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Sondenvorlage von eCRY1a liegt hinter dem T7 Promotor und dem Forward Primer am16, d.h. eine *in-vitro* Transkription mit T7 (vgl. 4.2.4.5) wird demnach eine eCRY1a RNA Antisense-Sonde produzieren. Die Antisense-Sonde ist komplementär zur nachzuweisenden mRNA. Eine Transkription mit SP6 wird die SENSE, die Kontrollsonde amplifizieren, die identisch zur nachzuweisenden mRNA ist. Das gleiche gilt für die Sondenvorlage von eCRY1b: sie liegt hinter dem T7 Promotor und dem Forward Primer am18, d.h. auch hier wird eine *in-vitro* Transkription mit T7 (siehe Abschnitt 2.5) eine eCRY1b RNA Antisense-Sonde produzieren (siehe Abb. 4.3).

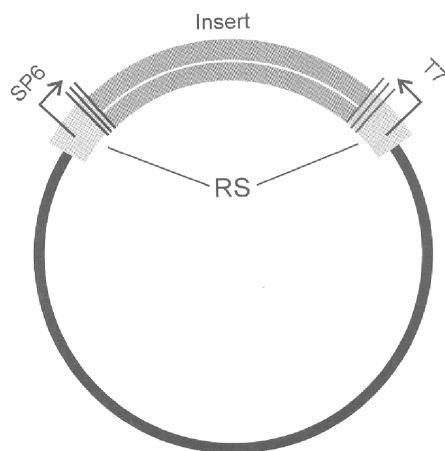


Abb. 4.3: Transkriptionsvektor mit kloniertem DNA-Insert (aus: GASSEN & SCHRIMPF 1999). Das Insert des hier verwendeten Vektors ist die eCRY1a- bzw. eCRY1b-Sondenvorlage. Dank der flankierenden RNA-Polymerase-Promotoren SP6 und T7 ist es möglich, durch die Verwendung der entsprechenden Polymerasen RNA-Moleküle entgegengesetzter Richtung herzustellen („Sense“ und „Antisense“) und dabei zu markieren (RS = Schnittstellen der multiplen Kloniersequenz).

4.2.4.5 *In-vitro* Transkription und Markierung der RNA mit Digoxigenin zur Synthese von RNA-Sonden

Die Synthese von RNA-Sonden, die in der mRNA *in-situ* Hybridisierungen eingesetzt wurden, erfolgte durch *in-vitro* Transkription. Bei der *in-vitro* Transkription wird RNA von DNA (hier: die durch PCR vervielfältigte und klonierte Sondenvorlage) synthetisiert. In diesem System der *in-vitro* Transkription von RNA-Hybridisierungsproben wurden entsprechend der Vorgaben durch den pCR[®]II-TOPO Vektor (Invitrogen) RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7 (Wirt: *E.coli*) oder SP6 (Wirt: *Salmonella*) in Gegenwart von Digoxigenin

markierten Ribonukleotiden (DIG-UTP) verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Reaktionsansatz zur Herstellung der DIG-Sonden eCRY1a und eCRY1b.

Reaktionsansatz zur Herstellung der DIG-Sonden eCRY1a und eCRY1b	
12µl	DEPC-H ₂ O
2µl	RNAse Inhibitor (RNAse Out [®]) (Boeringer)
2µl	10x Transkriptionspuffer (Boeringer)
1µl	RNA Polymerase T7 oder SP6
2µl	Digoxygenin Labeling Mix (Boeringer)
Vorlage:	
2µl	PCR Produkt
→ Inkubation: 2h bei 37°C	

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Degeneration der restlichen DNA-Vorlage aus der Ursprungs-PCR wurde der Ansatz im Anschluss an die Synthese mit 2 µl RNAse freier DNase I (Roche) versetzt und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Das Volumen des Ansatzes wurde mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O auf 70 µl erhöht, die RNA unter Zugabe von 8 µl 4 M LiCl (in DEPC) und 180 µl EtOH über Nacht bei -20°C präzipitiert, pelletiert und anschließend in 50µl H₂O DEPC resuspendiert. Anschließend wurde die RNA in 500 µl Hybridisierungslösung aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Ein 1µl Aliquot des Ansatzes wurde zur Überprüfung der Effizienz der Probensynthese auf dem Agarosegel aufgetrennt. Die Auftrennung und Dokumentation erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.2.8 beschrieben, auf Grund der RNA wurde TBE als Elektrophorese-Puffer verwendet.

4.2.4.6 mRNA *in-situ* Hybridisierung

Alle Reagenzien und Lösungen wurden mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Arbeitsoberflächen und Geräte wurden mit Chloroform/Hitzebehandlung oder RNase AWAY[®] (Molecular Bio-Products) von Ribonukleasen dekontaminiert. Die *in-situ* Hybridisierung wurde an 14 µm dicken Kryoschnitten der Rotkehlchenretina auf Superfrost[®]-Objektträgern durchgeführt. Die eingesetzten RNA Sonden wurden mit Digoxygenin (Dig-UTP) markiert. Hybridisierung, Post-Hybridisierung und Färbung der Kryoschnitte wurden nach einem leicht veränderten Standardprotokoll nach REISSMANN et al. (1996) durchgeführt.

Hybridisierung

Die Objektträger mit den tiefgefrorenen Retinaschnitten (14 µm Dicke) wurden 15 min auf RT angeglichen und in einer Kunststoffbox mit 50% Formamid/1x SSC überführt. Formamid soll unter anderem dazu dienen, das Aufschmelzen der mRNA-Sekundärstrukturen zu erleichtern. Die RNA-Sonden wurden jeweils in Hybridisierungspuffer (1 ml 10x Salz, 5 ml deion. Formamid, 2 ml 50% [w/v] Dextransulfat, 1 ml yeast-RNA, 100 µl 50x Denhardt's, 900 ml H₂O) gelöst (Verdünnung 1:100) und anschließend 10 min bei 70°C im Hitzeblock denaturiert. Im folgenden Schritt wurden jeweils 150 µl der Sonde auf die Proben pipettiert und die Objektträger anschließend mit hitzesterilisierten langen Deckgläsern (RNAse frei) abgedeckt. Dann wurde die Kunststoffbox geschlossen, mit Aluminiumfolie zusätzlich gegen Trockenfallen geschützt und über Nacht bei 65°C im Ofen hybridisiert.

Post-Hybridisierung: Waschen, Blocken und Antikörperinkubation

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit den Schnitten in Glasküvetten gestellt und diese in 65°C warme Waschlösung (1x SSC, 50% Formamid, 0,1% Tween) überführt, um die Sonde abzuwaschen. Nach einigen Minuten wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die Küvette in eine zweite Waschlösung überführt und 60 min gewaschen. Anschließend wurde die Küvette in MABT-Lösung (100 mM Maleinsäure pH 7.5, 150 mM NaCl) mit 0,1% Tween überführt und 30 min unter leichtem Schaukeln auf Raumtemperatur angeglichen. Dann wurde im 3. Waschschritt MABT mit der Pipette direkt auf die Schnitte gegeben und 30 min gewaschen. Anschließend wurde jeweils 300 µl 20% hitzeinaktiviertes Hühnerserum (*chicken serum*, CHS) in MABT auf die Schnitte gegeben und 1h bei Raumtemperatur unspezifische Bindungsstellen geblockt. Danach wurde mit jeweils 150 µl Primärantikörper (1:1000 anti-DIG AP [Roche] in 1 ml MABT Lösung mit CHS) pro Objektträger über Nacht bei +4°C inkubiert. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die Schnitte erneut mit einem hitzesterilisierten Deckglas abgedeckt und der Boden der Inkubationskammer mit feuchten Papierhandtüchern bedeckt.

Waschen und Färbung

Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte in eine Glasküvette mit MABT überführt und die Deckgläser vorsichtig entfernt. Dann wurde 3x 10min bei Raumtemperatur mit je 300 µl MABT, anschließend 2x 10 min mit je 300 µl in AP-Puffer (100mM Tris pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20, 0.024% Levamisol) gewaschen. Der AP-Puffer wurde dann möglichst lichtfrei durch 200 µl NBT/BCIP-Färbelösung ersetzt und die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt, um unspezifisches Präzipitat durch Luftkontakt zu vermeiden. Die Schnitte wurden bis zum Ende der Farbreaktion bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Abstoppen der Farbreaktion und Eindeckeln

Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Schnitte in einer Glasküvette in PBS überführt. Nach Ablösen der Deckgläser wird erneut in PBS überführt. Anschließend wurden die Schnitte mit ca. 100 µl Kaisers Glycerin-Gelatine überschichtet und möglichst blasenfrei eingedeckelt. Nach mindestens einer Woche Aushärtung wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet und bis zur Auswertung im Dunkeln gelagert.

4.2.4.7 Auswertung der Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Polyvar-Mikroskops (Reichert, Wien).

4.2.5 Material & Methoden für die Immunohistochemie

4.2.5.1 Synthese des polyklonalen Antikörpers

Auf Grund der bekannten Aminosäuresequenz von eCRY1b aus Kapitel 2 wurde ein synthetisches Peptid aus den letzten 11 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (Antigen) zur Gewinnung polyklonaler Antikörper hergestellt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (siehe Tabelle 4.4). Peptidsynthese sowie Standard-Immunisierung in zwei Kaninchen über drei Monate erfolgte durch die Firma BioScience (Göttingen).

Tabelle 4.4: Information zu den ausgewählten spezifischen Aminosäuren des Peptidantikörpers eCRY1b

Peptidantikörper eCRY1b		
Sequenz: c n y g k p d k t s k *		
Abkürzung der AS	Voller Name der AS	Polarität
C	Cystein	ungeladene Seitenketten, polar
N	Asparagin	ungeladene Seitenketten, polar
Y	Tyrosin	ungeladene Seitenketten; trotzdem hydrophob
G	Glycin	ungeladene Seitenketten, polar
K	Lysin	basische Seitenketten
P	Prolin	unpolare Seitenketten, hydrophob; trotzdem löslich
D	Asparaginsäure	saure Seitenketten
K	Lysin	basisch
T	Threonin	ungeladen, polar
S	Serin	ungeladen, polar
K	Lysin	basische Seitenketten

Unmittelbar vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut abgenommen und daraus Präimmunserum (Präserum) für spätere Kontrollexperimente gewonnen. Zwei Kaninchen (Nr. 10/3 und Nr. 10/4) wurden immunisiert.

4.2.5.2 Spezifitäts- und Eignungstest des Antikörpers

Vor einem Einsatz der vorliegenden Kaninchen-Seren für immunologische Experimente auf der *Erithacus*-Retina wurden Spezifitäts- bzw. Eignungsnachweise der vorliegenden Kaninchen-Seren für immunologische Experimente durchgeführt. Die Seren wurden auf ihre Spezifität für eCRY1b mit Retina- und Muskel-Gesamtprotein des Rotkehlchens getestet und die Reaktionsbedingungen zum Nachweis von eCRY1b in verschiedenen Testserien bestimmt. Mit Hilfe einer *Dot-Blot* Analyse wurde spezifiziert, gegen welche Konzentration des Zielproteins die eCRY1b-Seren sensitiv reagieren. In nachfolgenden *Western-Blot* Experimenten wurden jeweils das antigene Peptid als auch das retinale eCRY1b-Protein nachgewiesen. Auf Basis dieser Untersuchungen wurden die nachfolgenden Experimente mit dem Serum des Kaninchens 10/4 durchgeführt.

4.2.5.3 Nachweis von eCRY1b-Protein in der *Erithacus*-Retina durch Fluoreszenzantikörper (*in-situ* Protokoll für Immunohistochemie)

Die Immunohistochemie mit Hilfe des erstellten spezifischen eCRY1b Antikörpers wurde an 14 µm Kryoschnitten der Rotkehlchenretina auf Superfrost®-Objektträgern durchgeführt. Die eingesetzten Sekundärantikörper waren mit Fluoreszein (FITC), einem Farbstoff für die Fluoreszenzmikroskopie, der bei Anregung gelb-grünes Licht emittiert markiert. Die Immunohistochemie der Schnitte wurde nach einem leicht abgewandelten Standardprotokoll nach WÄSSLE et al. (1998) durchgeführt.

Permeabilisieren, Blocken und Inkubation des primären Antikörpers

Die Objektträger mit den tiefgefrorenen Retinaschnitten wurden 2h auf einer Wärmeplatte bei +40° C getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem hydrophoben Marker (Pap-Pen) umrandet, um Abfließen der Lösungen von der Gewebeprobe und somit ein Austrocknen zu verhindern. Durch 2x 15 minütiges Waschen in TBS-TT-Puffer (TBS-TT-Puffer = TBS-Puffer [100mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl] mit Detergenz: 0,5% Triton X 100, 0,05% Tween 20) in einer Küvette wurden die Schnitte zunächst permeabilisiert und ggf. Reste der Kryomatrix (Einbettmedium) entfernt. Im Folgenden wurden unspezifische Bindungsstellen mit Hilfe einer Blocklösung aus TBS-TT-Puffer mit 5% FCS (*fetal calv serum*) für 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blockieren von unspezifischen Antikörper-Bindestellen wurde die Lösung abgegossen und die Inkubation mit dem primären

Antikörper Anti-eCRY1b (aus Kaninchen Nr. 10/4) in Blocklösung über Nacht (mindestens 4 h) durchgeführt. Dabei wurde eine Verdünnung von 1:500 bis 1:5000 des Antikörpers in der Blocklösung verwendet. Gute Ergebnisse wurden bei einer Verdünnung von 1:1000 erzielt.

Sekundärer Antikörper

Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten mit TBS-TT-Puffer in einer Küvette gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper Anti-Rabbit FITC (1:5000 in TBS) aus der Maus 60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zeitgleich zu den Versuchen wurden Kontrollpräparate angelegt, die mit Präserum und dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert wurden. Danach wurden die Schnitte 3x 15 min mit TBS-Puffer im Dunkeln gewaschen und anschließend mit einem geeigneten Eindeckmittel (hier: Vecta-Shield, Firma Vecta) und einem Deckgläschen eingedeckelt. Um Austrocknung zu verhindern, wurden die Deckgläschen an den Rändern zusätzlich mit Nagellack versiegelt. Versiegelte Schnitte wurden bis zur mikroskopischen Analyse im Dunkel bei +4°C aufbewahrt.

Peptidkontrolle

Die Peptidkontrolle erfolgte durch TBS-TT Puffer mit lyophilisiertem Peptid. Die Primärantikörper für eCRY1b wurden 4 h bei +4°C unter leichtem Schütteln mit dem spezifischen Peptid inkubiert. In dieser Zeit blockt das Peptid die spezifischen Bindungsstellen des eCRY1b-Antikörpers. Der so entstandene Peptidblock wird anschließend parallel zu den Versuchen auf den Retinaschnitten als Negativkontrolle eingesetzt.

4.2.5.4 Auswertung der Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines TSC konfokalen Mikroskops (Leica, Nussloch).

4.3 Ergebnis

4.3.1 Aufbau der *Erithacus*-Retina

Hinsichtlich der genauen Morphologie der Singvogelretina und ihrer einzelnen retinalen Schichten sind in der Literatur nur unzureichende bis keine Angaben zu finden. Ein einfacher Vergleich mit vorliegenden lichtmikroskopischen Aufnahmen der Retinae von Huhn oder Taube ist nicht möglich, da die Rotkehlchenretina etliche Besonderheiten aufweist. Diese sind vermutlich auf die Dämmerungsaktivität der Tiere zurückzuführen. Um dennoch eine

Interpretation der Ergebnisse aus den *mRNA in-situ* Hybridisierungen und der Immunolokalisation zu ermöglichen, wurde eine mit Methylenblau und Fuchsin doppelgefärbte Schnittserie der *Erithacus*-Retina angefertigt und analysiert.

Abb. 4.4 zeigt den Aufbau der Retina von *Erithacus rubecula* um 17:30 Uhr (CET) im Detail. Die zehn lichtmikroskopisch zu unterscheidenden Schichten sind gut zu erkennen: 1. Retinales Pigmentepithel (*Retinal Pigment Epithelium, RPE*), 2. Retinale Photorezeptoren (*Photoreceptor Layer, PRL*), 3. Äußere Grenzmembran (*External Limiting Membrane, ELM*), 4. Äußere Körnerschicht (*Outer Nuclear Layer, ONL*), 5. Äußere Plexiforme Schicht (*Outer Plexiform Layer, OPL*), 6. Innere Körnerschicht (*Inner Nuclear Layer, INL*), 7. Innere Plexiforme Schicht (*Inner Plexiform Layer, IPL*), 8. Ganglienzellschicht (*Ganglion Cell Layer, GCL*), 9. Nervenfaserschicht (*Nerve Fibre Layer, NFL*) und 10. Epiretinale/Innere Grenzmembran (*Internal Limiting Membrane, ILM*).

PRL und INL sind in weitere Untereinheiten unterteilt. Im PRL befinden sich um 17:30 Uhr direkt unterhalb des retinalen Pigmentepithel die Außensegmente der Photorezeptoren (*Outer Segments, OS*). Tagsüber sind die Außensegmente größtenteils vom Pigmentepithel umgeben. Unterhalb der Außensegmente befinden sich die Innensegmente (*Inner Segments, IS*) (siehe auch 4.3.2). Die Zellkerne der Photorezeptoren befinden sich in der ONL. Die INL ist die variationsreichste Zellschicht der Retina, die die Perikaryen der Horizontal-, Bipolar-, Müller- und Amakrinzellen enthält. Im proximalen Teil der INL befindet sich die Schicht der Horizontalzellen (*Horizontal Cell Layer, HCL*), im distalen die Schicht der Amakrinzellen (*Amakrine Cell Layer, ACL*) (vgl. Abb. 4.4).

In Abb. 4.4 farbig hervorgehoben sind vier Zelltypen der Retina: Bipolarzelle (BC), Amakrinzelle (AC), Deplazierte Ganglienzelle oder *Displaced Ganglion Cell* (DGC) und Ganglienzelle (GC). Die Dendriten der Bipolarzelle (grün) sind im OPL mit den synaptischen Enden der Photorezeptoren verschaltet und bilden somit die erste Stufe der intraretinalen Informationsverarbeitung. Die Amakrinzellen (blau) bilden gemeinsam mit den Bipolarzellen Quervernetzungen im IPL. Die Dendriten der im GCL befindlichen Ganglienzellen (rot), verzweigen in die angrenzende IPL, nehmen die Signale der Bipolar- und Amakrinzellen auf und leiten sie über das Axon in der Nervenfaserschicht weiter. Deplazierte Ganglienzellen oder *Displaced Ganglion Cells* (violett) sind außerhalb der GCL und daher „deplaziert“ im proximalen Teil der INL zu finden.

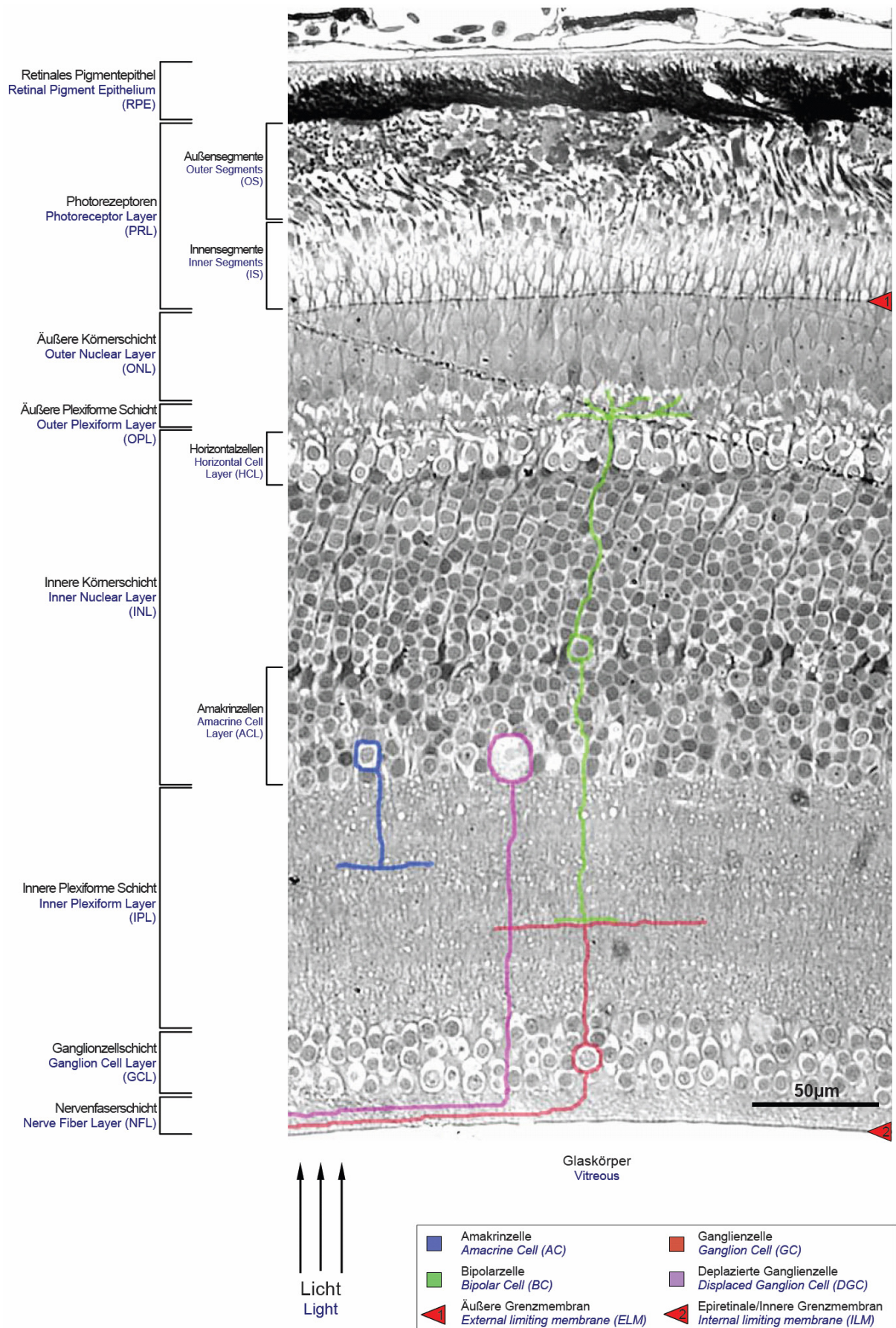


Abb. 4.4: Schnitt durch die Retina von *Erithacus rubecula* um 17:30 Uhr (CET). Schnittdicke: 3 µm; Doppelfärbung Methylenblau und Fuchsin.

4.3.2 Retinale Photorezeptoren bei Vögeln

Die Photorezeptoren der Vogelretina sind denen der Reptilien sehr ähnlich, jedoch bedeutend schlanker in ihrer Form (BOWMAKER et al. 1997). Wie beim Stamm Reptilia finden sich bei Aves ein Stäbchentyp neben vier Typen von Einzelzapfen und einem Doppelzapfen bestehend aus einer Haupt- und einer Untereinheit (vgl. Kapitel 3.4.1 und Abb. 4.5). Im Gegensatz zu den Reptilien, bei denen außer der Haupteinheit des Doppelzapfens alle Zapfen und das Stäbchen ein sogenanntes Paraboloid, einen Glycogenspeicher, enthalten, besitzen Vögel dieses nur in der Untereinheit des Doppelzapfens und im Stäbchen.

Das Außensegment der Vogelzapfen (OS) besteht aus Membranstapeln, die das Sehpigment enthalten, das aus unterschiedlichen Typen von Opsinproteinen und dem Chromophor Retinal besteht. Das Innensegment (IS) der Einzelzapfen besteht aus einem distalen, azidophilen Ellipsoid, das mit Mitochondrien ausgefüllt ist. Des weiteren aus einem proximalen basophilen Myoid, in dem sich Endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen und Anteile des Golgi-Apparates befinden. Bis auf die Untereinheiten der Doppelzapfen besitzen alle Zapfentypen farbige oder transparente Öltröpfchen, die die sowohl bei Vögeln als auch Reptilien nachweislich als spektrale Kantenfilter fungieren (NEUMEYER & JÄGER 1985, MAIER & BOWMAKER 1993, KAWAMURO et al. 1997, BOWMAKER et al. 1997). Eine detaillierte Aufstellung der einzelnen Vogelzapfentypen mit ihren entsprechenden Sehpigmenten und Öltröpfchen wird in Abb. 4.5 am Beispiel der Taube (*Columba livia*) aufgezeigt.

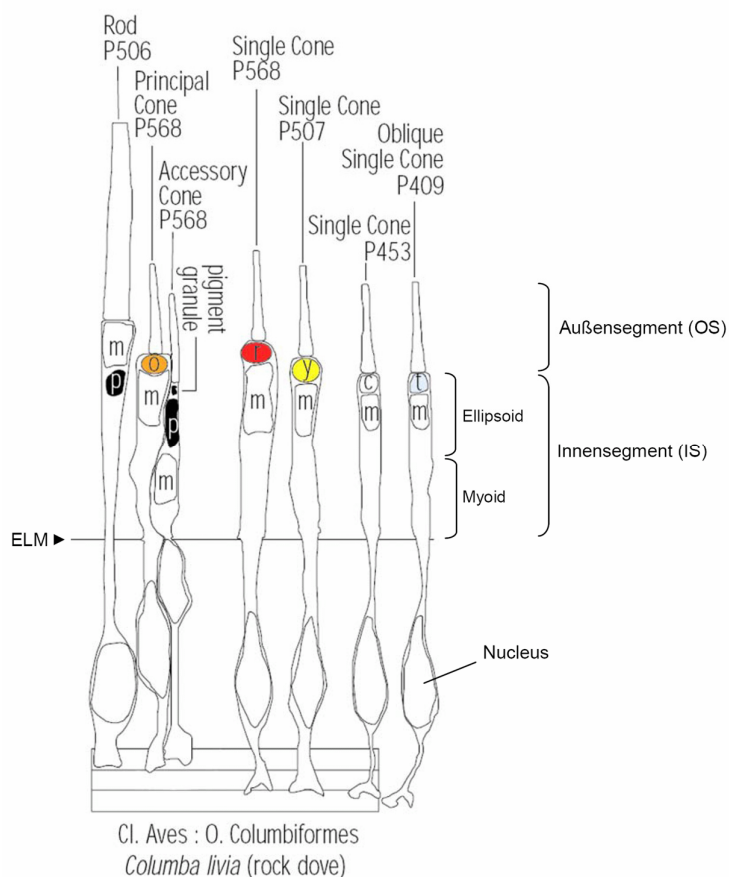


Abb. 4.5: Retinale Photorezeptoren bei Aves; hier repräsentiert durch die Taube, *Columba livia* (verändert nach MARC 1998). Von links nach rechts: Stäbchen mit Pigment (P) 506 im OS ohne Öltröpfchen im IS, Doppelzapfen bestehend aus Haupteinheit und Untereinheit mit P568 im OS und orangem Öltröpfchen (o) im IS der Haupteinheit, Einzelzapfen mit P568 im OS und rotem Öltröpfchen (r) im IS, Einzelzapfen mit P507 im OS und gelbem Öltröpfchen (y) im IS, Einzelzapfen mit Pigment P453 im OS und transparentem Öltröpfchen (c) im IS, Einzelzapfen mit Pigment P409 im OS und UV-durchlässigem Öltröpfchen (t) im IS. Die Untereinheit des Doppelzapfens weist kein Öltröpfchen auf, besitzt jedoch oft gelbliche Pigmentkörner und den Paraboloid (p), einen Glycogenspeicher, der im Ellipsoid über oder unter den Mitochondrien (m) liegen kann. ELM = *External Limiting Membrane*.

4.3.3 mRNA-Expression von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von *Erithacus r.* am Tag (11 Uhr CET)

Mit der in diesem Abschnitt der Arbeit angewandten *mRNA in-situ* Hybridisierung kann die Genaktivität der beiden Cryptochromgen-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b im Gewebeverband der Rotkehlchenretina durch blau-violett gefärbtes Präzipitat nachgewiesen werden.

Um 11 Uhr CET sind beide Spleißvarianten in den Innensegmenten der Photorezeptoren exprimiert (siehe Abb. 4.6).

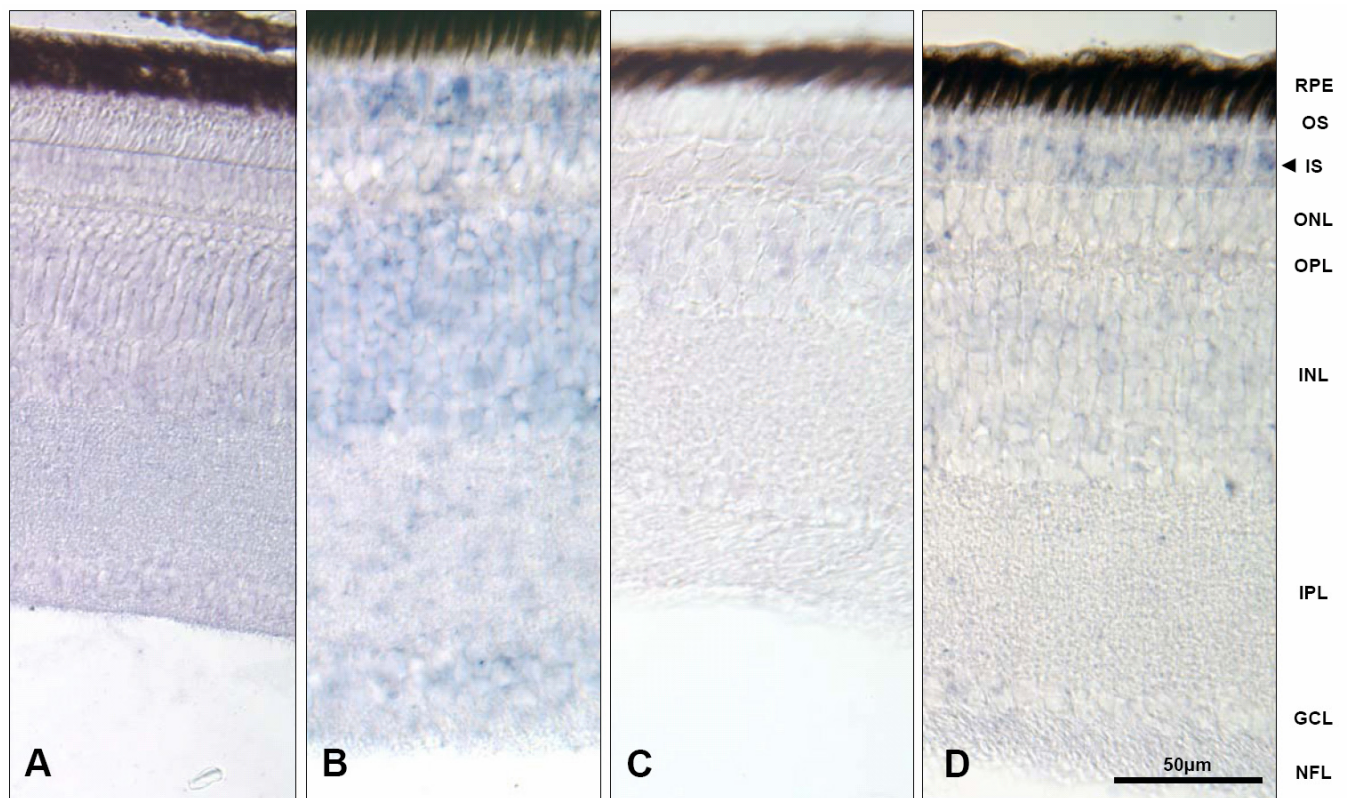


Abb. 4.6: eCRY1a- und eCRY1b-mRNA Expression in der *Erithacus*-Retina um 11:00 Uhr (CET). Lichtmikroskopische *mRNA in-situ* Bilder; Sonden markiert mit DIG (blaues Präzipitat). A= Kontrolle eCRY1a (Sense), B= eCRY1a (Antisense), C= Kontrolle eCRY1b (Sense), D= eCRY1b (Antisense). RPE= Retinal Pigment Epithelium, OS= Outer Segments, IS= Inner Segments, ONL= Outer Nuclear Layer, OPL= Outer Plexiform Layer, INL=Inner Nuclear Layer, IPL=Inner Plexiform Layer, GCL=Ganglion Cell Layer, NFL= Nerve Fiber Layer. Gut zu erkennen ist die jeweils spezifische blaue Nachweisfärbung der *mRNA* von eCRY1a (B) und eCRY1b (D) in den Innensegmenten der Photorezeptoren (IS): siehe Pfeil.

4.3.4 mRNA-Expression von eCRY1a und eCRY1b in der Retina von *Erithacus r.* in der Dämmerung (17:30 Uhr CET)

Zur Zeit der Dämmerung (17:30 Uhr CET), wenn Zugvögel ihre Richtungsentscheidung für den nächtlichen Zug treffen, sind beide Spleißvarianten ebenfalls in den Innensegmenten der Photorezeptoren exprimiert (siehe Abb. 4.7).

Quantitative Analysen in Kapitel 3 haben gezeigt, dass die Expression von eCRY1a um 17:30 Uhr im Durchschnitt fünf- bis zehnmals höher ist, als die Expression von eCRY1b. Auch in den lichtmikroskopischen Bildern der mRNA *in-situ* Hybridisierungsexperimente ist um 17:30 Uhr eine höhere Expression der Spleißvariante eCRY1a im Vergleich zur Variante eCRY1b erkennbar (vgl. Abb. 4.7).

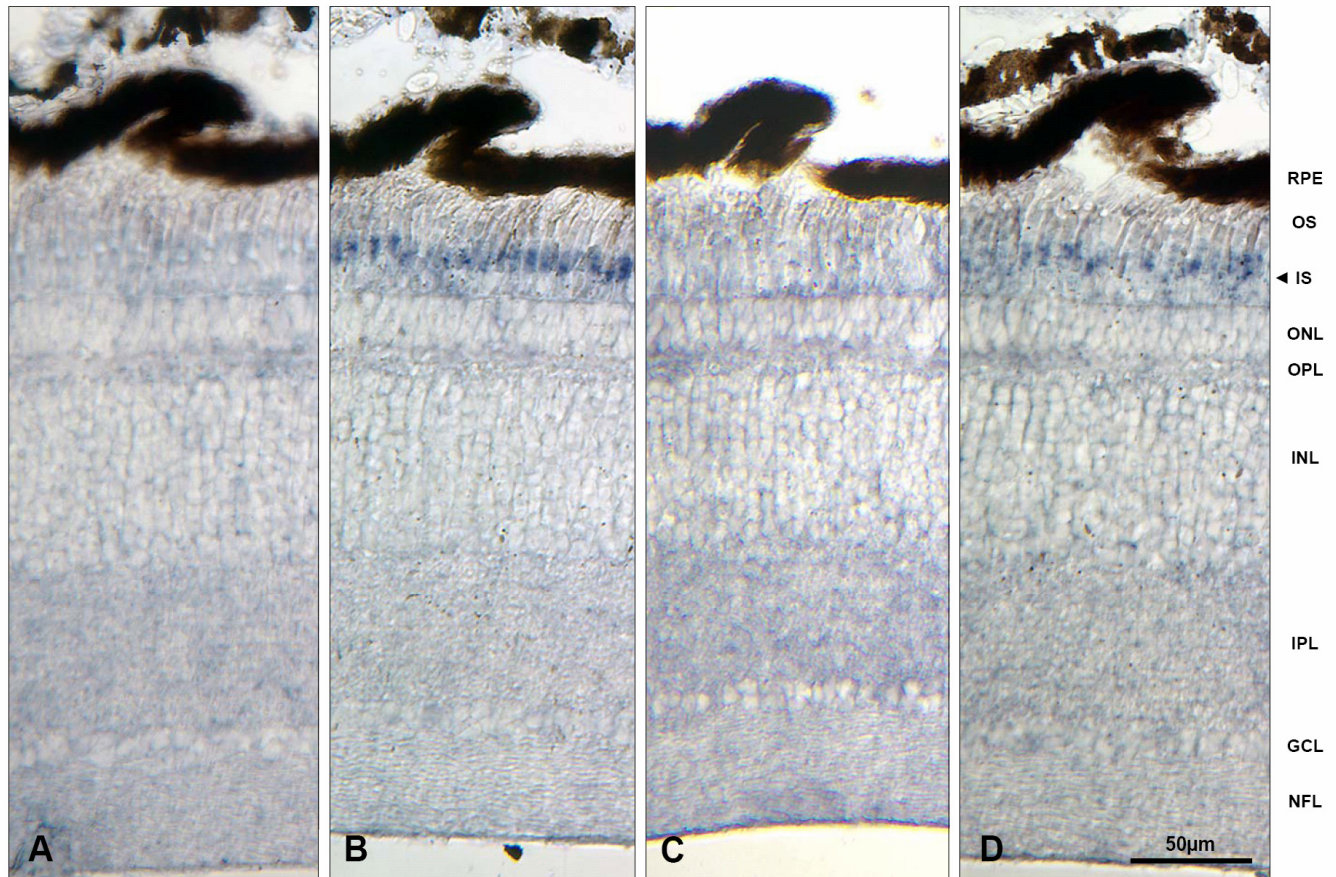


Abb. 4.7: eCRY1a- und eCRY1b-mRNA Expression in der *Erithacus*-Retina um 17:30 Uhr (CET). Lichtmikroskopische mRNA *in-situ* Bilder; Sonden markiert mit DIG (blaues Präzipitat). A= Kontrolle eCRY1a (Sense), B= eCRY1a (Antisense), C= Kontrolle eCRY1b (Sense). D= eCRY1b (Antisense). RPE= Retinal Pigment Epithelium, OS= Outer Segments, IS= Inner Segments, ONL= Outer Nuclear Layer, OPL= Outer Plexiform Layer, INL=Inner Nuclear Layer, IPL=Inner Plexiform Layer, GCL=Ganglion Cell Layer, NFL= Nerve Fiber Layer. Gut zu erkennen ist die jeweils spezifische blaue Nachweisfärbung der mRNA von eCRY1a (B) und eCRY1b (D) in den Innensegmenten der Photorezeptoren (IS) – siehe Pfeil. Das in der quantitativen RT-PCR nachgewiesene Mengenverhältnis von durchschnittlich 5-10:1 (eCRY1a:CRY1b) ist auch in der *in-situ* Hybridisierung erkennbar.

4.3.5 Detailvergleich der mRNA-Expression von eCRY1b in den Photorezeptoren von *Erithacus r.* am Tag und in der Dämmerung

Detailaufnahmen der Photorezeptoren der *Erithacus*-Retina um 11 Uhr und um 17:30 Uhr zeigen, dass sich die eCRY1b-mRNA vermutlich hauptsächlich im unteren Teil des Ellipsoids oder im oberen Teil des Myoids der Innensegmente befindet. Im proximalen Teil des Myoids,

das der *External Limiting Membrane* (ELM) aufsitzt, ist eine geringe bis keine Expression sichtbar (vgl. Abb. 4.8).

eCRY1b ist in den Photorezeptoren unterhalb der Öltröpfchen lokalisiert, von denen jeweils drei in Abb. 4.8 mit weißen (11 Uhr, A) und schwarzen (17:30 Uhr, B) Pfeilen gekennzeichnet sind. Auch die mRNA von eCRY1a befindet sich unterhalb der Öltröpfchen (vgl. Abb. 4.6 B und Abb. 4.7 B). Die Öltröpfchen bilden beim Photorezeptor des Vogels den Abschluss des Innensegments (vgl. Abb. 4.5). Mithilfe der Lokalisation der Öltröpfchen ist auch eine deutliche Mobilität des Retinalen Pigmentepithels (RPE) in Abhängigkeit von der Tageszeit zu erkennen. Um 11 Uhr sind die Außensegmente der Photorezeptoren nahezu vollständig im RPE eingeschlossen, während sie um 17:30 Uhr fast komplett frei vorliegen (siehe Abb. 4.8).

Die in den quantitativen Analysen in Kapitel 3 ermittelte signifikante Steigerung der eCRY1b Spleißvariante von 11 Uhr zu 17:30 Uhr ist auch auf den lichtmikroskopischen Bildern der mRNA *in-situ* Hybridisierungsexperimente eindeutig zu erkennen, auch wenn diese keine konkrete Quantifizierung zulassen (vgl. Abb. 4.8).

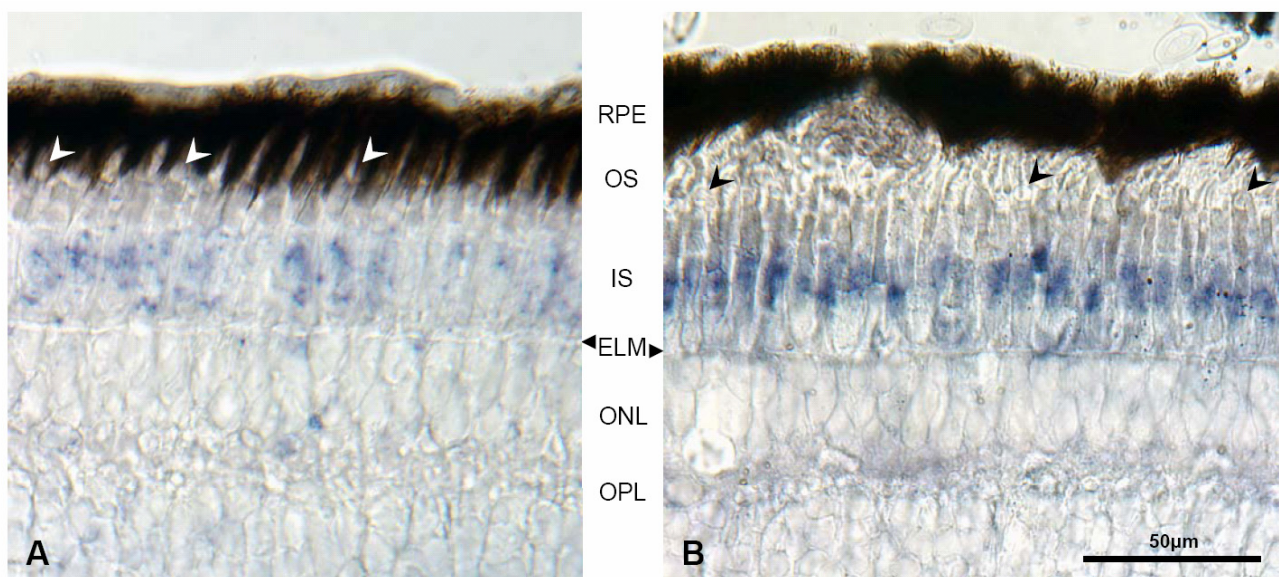


Abb. 4.8: Detailvergleich der eCRY1b-mRNA Expression in den Photorezeptoren von *Erithacus r.* um 11:00 Uhr und um 17:30 Uhr (CET): Lichtmikroskopische mRNA *in-situ* Bilder, Detailaufnahmen; Sonden markiert mit DIG (blaues Präzipitat). A= eCRY1b (Antisense) 11 Uhr (CET), B= eCRY1b (Antisense) 17:30 (CET). RPE= Retinal Pigment Epithelium, OS= Outer Segments, IS= Inner Segments, ELM= External Limiting Membrane, ONL= Outer Nuclear Layer, OPL= Outer Plexiform Layer. Jeweils drei Öltröpfchen sind mit weißen (A) und schwarzen (B) Pfeilen gekennzeichnet. Um 11 Uhr sind die Außensegmente der Photorezeptoren fast vollständig vom RPE umschlossen, während sie um 17:30 größtenteils frei vorliegen.

4.3.6 Lokalisation von eCRY1b-mRNA und -Protein in der Retina von *Erithacus r.* am Tag (11 Uhr CET) im Vergleich

Abb. 4.9 zeigt die Lokalisation der eCRY1b-mRNA (A) und des eCRY1b-Proteins (B) am Tag (11 Uhr CET) im Vergleich. Während die mRNA mit blau-violett gefärbtem Präzipitat nachgewiesen wird, erscheinen die eCRY1b-Proteine in grüner Fluoreszenz. Sowohl mRNA als auch Protein sind um 11 Uhr in den Innensegmenten (IS) der Photorezeptoren lokalisiert.

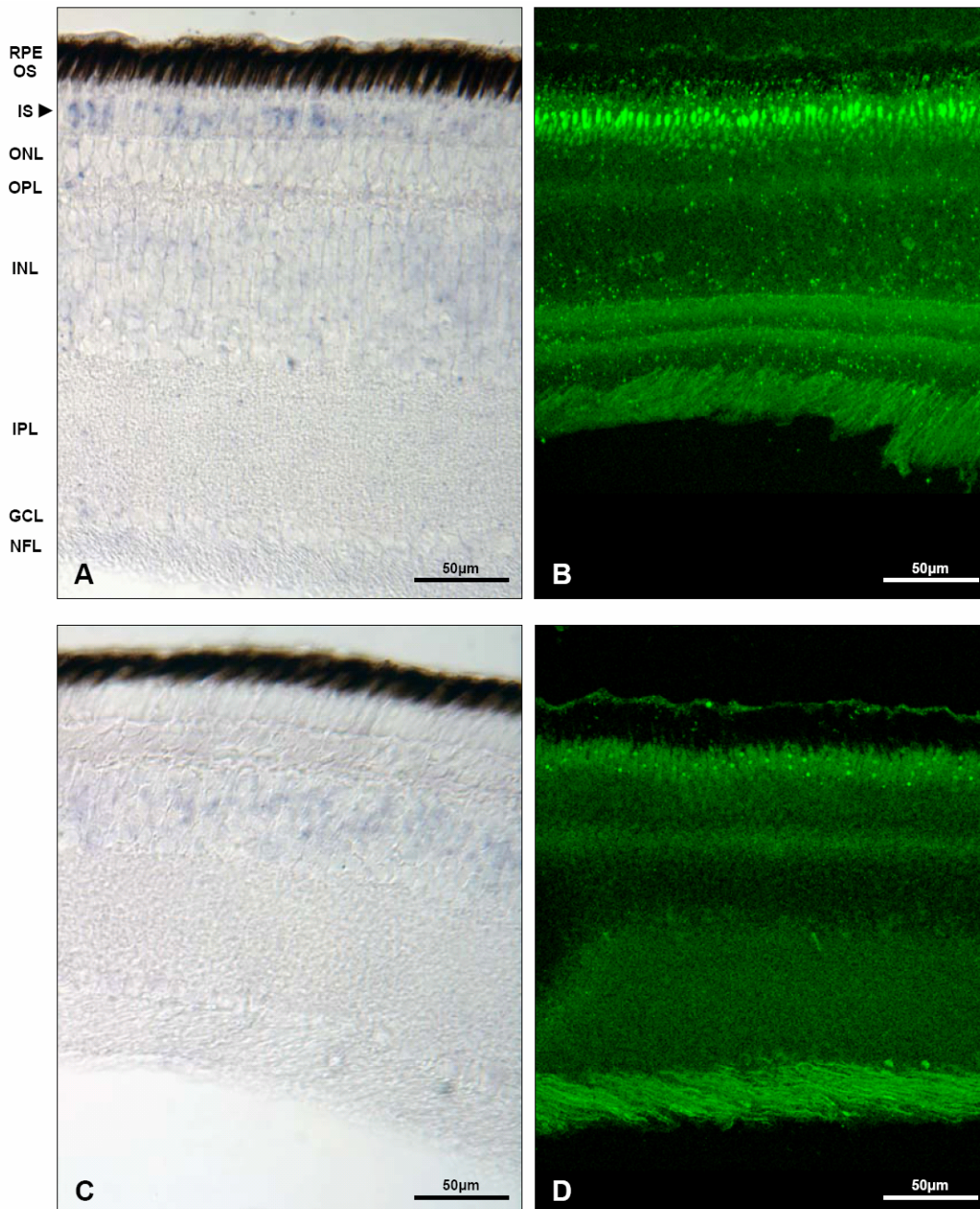


Abb. 4.9: Lokalisation von eCRY1b-mRNA (A) und Protein (B) um 11 Uhr (CET) in der Retina von *Erithacus rubecula* im Vergleich. Sekundärintikörper markiert mit FITC (Nachweis: grüne Fluoreszenz), mRNA-Sonden markiert mit DIG (Nachweis: blaues Präzipitat). C und D: Entsprechende Kontrollen (Sense-Sonde [C]; Peptidblock und sekundärer AK [D]). RPE= Retinal Pigment Epithelium, OS = Outer Segments, IS = Inner Segments, ONL= Outer Nuclear Layer, OPL = Outer Plexiform Layer, INL= Inner Nuclear Layer, IPL= Inner Plexiform Layer, GCL = Ganglion Cell Layer, NFL= Nerve Fiber Layer. In Teilabbildung A und B gut zu erkennen ist die jeweils spezifische Färbung in den Innensegmenten der retinalen Photorezeptoren (IS): siehe Pfeil.

4.3.7 Lokalisation von eCRY1b-mRNA und -Protein in der Retina von *Erithacus r.* in der Dämmerung (17:30 Uhr CET) im Vergleich

Zur Zeit der Dämmerung (17:30 Uhr CET), wenn Zugvögel ihre Richtungsentscheidung für den nächtlichen Zug treffen, sind sowohl mRNA als auch Protein der Spleißvariante eCRY1b in den Innensegmenten der Photorezeptoren exprimiert (siehe Abb. 4.10).

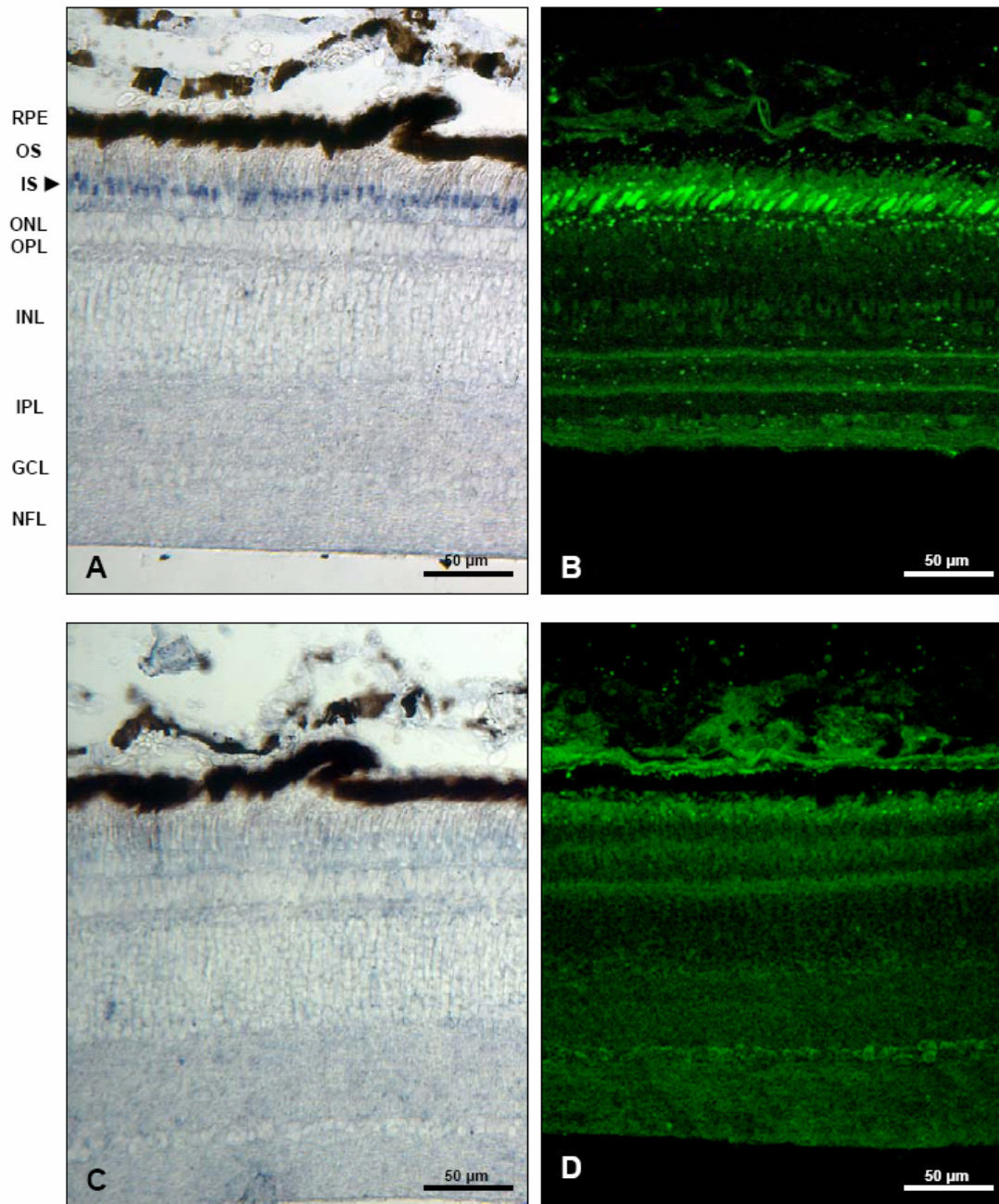


Abb. 4.10: Lokalisation von eCRY1b-mRNA (A) und Protein (B) um 17:30 (CET) in der Retina von *Erithacus rubecula* im Vergleich. Sekundäntikörper markiert mit FITC (Nachweis: grüne Fluoreszenz), mRNA-Sonden markiert mit DIG (Nachweis: blaues Präzipitat). C und D: Entspr. Kontrollen. RPE= Retinal Pigment Epithelium, OS = Outer Segments, IS = Inner Segments, ONL= Outer Nuclear Layer, OPL = Outer Plexiform Layer, INL= Inner Nuclear Layer, IPL= Inner Plexiform Layer, GCL = Ganglion Cell Layer, NFL= Nerve Fiber Layer. In Teilabbildung A und B gut zu erkennen ist die jeweils spezifische Färbung in den Innensegmenten der retinalen Photorezeptoren (IS): siehe Pfeil. Wie anhand der Peptidblockkontrolle (D) ersichtlich, handelt es sich bei der leichten Färbung der Ganglienzellen im GCL um ein unspezifisches Signal.

4.4 Diskussion

4.4.1 Lokalisation der *Erithacus*-Cryptochrom-1 mRNA und Protein in den Innensegmenten der Photorezeptoren

Durch die Analysen in diesem Abschnitt der Arbeit konnte ich zeigen, dass der Expressionsort beider eCRY1-Spleißvarianten sowohl tagsüber als auch in der Dämmerung in den Innensegmenten der retinalen Photorezeptoren lokalisiert ist. Ein aus der quantitativen RT-PCR in Kapitel 3 ermittelter signifikanter Anstieg der Expressionsrate beider Spliceformen von 11 Uhr zu 17:30 Uhr (CET) deckt sich mit dem Ergebnis einer stärkeren spezifischen Farbreaktion im mRNA *in-situ* Hybridisierungsexperiment.

Die ebenfalls in den QRT-PCR Experimenten ermittelte generell höhere Expressionsrate der Spleißform eCRY1a im Gegensatz zu eCRY1b ist zumindest anhand der Färbung in den 17:30 Uhr-Hybridisierungsexperimenten eindeutig erkennbar. Bei den 11 Uhr-Experimenten erschwert leider eine hohe Hintergrundfärbung bei den eCRY1a-Schnitten einen direkten Vergleich mit den eCRY1b-Färbungen (vgl. Abb. 6B). Möglicherweise hätte die Farbreaktion der spezifischen eCRY1a Antisense-Sonde früher abgestoppt werden müssen, als die der eCRY1b-Spleißvariante.

Detailaufnahmen der spezifisch gefärbten Schnitte zeigen, dass sich die mRNA von eCRY1a und eCRY1b möglicherweise im unteren Teil des Ellipsoids oder im oberen Teil des Myoids der Innensegmente befindet. Eine Lokalisation im Bereich des Myoids wäre eher zu erwarten, da sich dort das endoplasmatische Retikulum (ER) als Ort der Proteinproduktion befindet. Üblicherweise liegt die mRNA dem ER auf.

Die immunohistochemischen Experimente in diesem Kapitel der Arbeit zeigen, dass das Protein von eCRY1b zu beiden Tageszeiten ebenso in den Innensegmenten der Photorezeptoren zu finden ist. Dies spricht dafür, dass das Protein vom Synthesort offensichtlich nicht in andere Zellkompartimente weitertransportiert wird.

MOURITSEN et al. (2004) finden in ihren immunohistochemischen Experimenten bei der nachtziehenden Gartengrasmücke (*Sylvia borin*) das Protein der Spleißvariante eCRY1a ebenfalls in den Photorezeptoren, jedoch insbesondere in den retinalen Ganglienzellen und in einigen deplazierten Ganglienzellen. Die Befunde in den retinalen Ganglien- und deplazierten Ganglienzellen sind jedoch möglicherweise auf einen methodologischen Fehler zurückzuführen. Die unbearbeiteten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Peptid-Kontrolle der eCRY1b-Färbung um 11 (Abb. 9D) und um 17:30 Uhr (Abb. 10D) in meiner Arbeit zeigen, dass die Vogelretina generell über eine hohe Eigenfluoreszenz verfügt. Bei

genauerem Betrachten fällt besonders bei der 17:30 Uhr Kontrolle (Abb. 10D) eine unspezifische Färbung der Ganglienzellen auf. Diese fällt umso stärker aus, je länger das Bild belichtet wird. Justiert man Helligkeit und Kontrast mit einem Bildbearbeitungsprogramm auf dasselbe Hintergrundniveau, und versucht mit anderen Worten die Eigenfluoreszenz der Retina stark abzuschwächen, so wie es MOURITSEN et al. (2004) in ihren Methoden beschreiben, kann leicht der Eindruck aufkommen, es handle sich bei der Färbung der Ganglienzellen um eine spezifische Farbreaktion. Dies ist jedoch vermutlich nicht der Fall.

Die Lokalisation beider spezifischer *Erithacus*-Cryptochrom1 Spleißformen in den Innensegmenten der Photorezeptoren stärkt die Annahme von LEASK (1977) sowie SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) einer Beteiligung der Photorezeptoren im Magnetperzeptionsprozess bei Vögeln. Sie ist auch im Einklang mit der Forderung von RITZ et al. (2000) nach einer sphärischen und gleichmäßigen Anordnung der potentiellen Magnetfeldrezeptoren. Die hohe Dichte und exakte Verschaltung der Photorezeptoren erlaubt dem Vogel darüber hinaus theoretisch eine wesentlich höhere Auflösung der magnetischen Richtungsinformation als über deplazierten Ganglienzellen, die in deutlich geringerer Anzahl in der Retina vorliegen. Die von RITZ et al. (2000) errechneten vom Radikalpaarprozess möglicherweise generierten, magnetfeldabhängigen Muster auf der Vogelretina (vgl. Kapitel 1) wären über die bereits bestehenden Kanäle der Bildverarbeitung der Photorezeptoren einfach zu generieren.

Mit dem Fund von eCRY1a und eCRY1b in den Photorezeptoren von *Erithacus* in Einklang stehen ebenfalls Befunde elektrophysiologischer Untersuchungen, die zeigen, dass Neurone in bestimmten Bereichen des visuellen Systems von Vögeln, in den Kernen der basalen Wurzel der optischen Nerven (nBOR) und im *tectum opticum*, auf Richtungsänderungen des Magnetfelds antworteten (SEMM et al. 1984, SEMM & DEMAINE 1986, BEASON & SEMM 1987). Diese Befunde konnten nur bei Licht und bei intakter Retina erzielt werden. Es ist deshalb nicht unwahrscheinlich, dass Photorezeptoren im Auge zusätzlich zu ihrer bildverarbeitenden Funktion gleichzeitig Richtungsinformationen mittels des Erdmagnetfelds wahrnehmen und dass nBOR und *tectum opticum*, die als visuell richtungsspezifisch identifiziert sind, Informationslieferanten für die Richtung des Magnetfelds sein könnten.

Interessanterweise liegen sowohl mRNA als auch Protein von eCRY1a und eCRY1b auf der lichtzugewandten Seite der Öltröpfchen. Da die Öltröpfchen bei Vögeln vornehmlich als spektrale Kantenfilter wirken (vgl. Abschnitt 4.3.2) bedeutet dies, dass das Licht die eCRY1-Spleißvarianten im Gegensatz zu den Opsinen ungefiltert erreicht.

4.4.2 Vergleich mit der Cryptochrom 1-Lokalisation in den Retinae anderer Vertebraten

Cryptochrom 1 *mRNA* konnte bisher in der Retina von *Mus*, *Xenopus* und *Gallus* nachgewiesen werden (MIYAMOTO & SANCAR 1998, ZHU & GREEN 2001, HAQUE et al. 2002), allerdings mit teilweise widersprüchlichen Befunden, was den Ort der Expression betrifft. Bei Mäusen beschreiben MIYAMOTO & SANCAR (1998) eine Expression von Cryptochrom 1 (*mCRY1*) ausschließlich in Zellen des INL und im GCL. In der Retina des Krallenfrosches (ZHU & GREEN 2001) konnte dagegen eine hohe Expression von *xCRY1* in den Innensegmenten der Photorezeptoren nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen meiner Arbeit deckt. Darüber hinaus beschreiben die Autoren eine leichte Expression in einigen Zellen des INL und GCL, die möglicherweise aber auf unspezifische Färbung zurückzuführen ist. In der Retina des Huhns findet sich eine Expression von *cCRY1* vorrangig in den Photorezeptoren und Ganglienzellen (HAQUE et al. 2002). *Northern Blot*-Analysen zeigen, dass die Expression in diesen Zelltypen tagsüber fast doppelt so hoch wie in der Nacht ist. In welchem Photorezeptorsegment *cCRY1* exprimiert wird, ist jedoch nicht ersichtlich.

Über die Auswirkungen oder Funktion der unterschiedlichen Genexpression von *CRY1 mRNA* bei Maus und Rotkehlchen lässt sich nur spekulieren. SANCAR (2003) diskutiert aufgrund der Befunde bei der Maus ein duales System innerhalb der molekularen, histologischen und anatomischen Eigenschaften der visuellen und circadianen photosensorischen Systeme bei Säugetieren. In seinem Modell leiten die in der äußeren Retina lokalisierten Opsine als visuelle Photopigmente das photosensorische Signal an den visuellen Cortex, während Cryptochrome und Melanopsine als circadiane Photorezeptoren in der inneren Retina lokalisiert sind und Lichtsignale durch den Retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) leiten (vgl. Abb. 4.11).

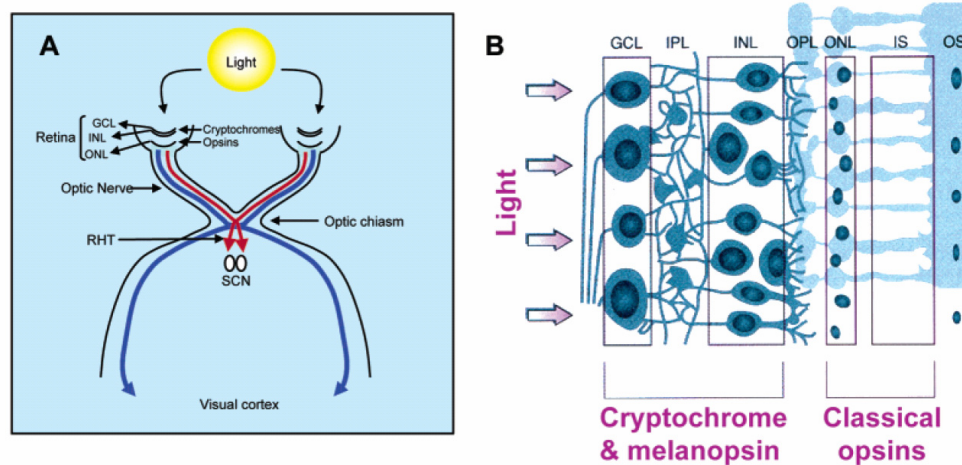


Abb. 4.11: Modell der Dualität innerhalb der molekularen, histologischen und anatomischen Eigenschaften der visuellen und circadianen photosensorischen Systeme (aus: SANCAR 2003). Teilabbildung A zeigt die duale Signalverarbeitung der Opsinsignale (blau) und der circadianen Photopigmente, Cryptochrom und Melanopsin (rot). Teilabbildung B zeigt die Lokalisation der drei Moleküle in der Retina. Dabei ist anzumerken, dass laut dieser Darstellung Opsine fälschlicherweise in der Äußeren Körnerschicht (ONL) und den Innensegmenten (IS) vorliegen sollen. Opsine befinden sich jedoch in den Außensegmenten (OS) der Photorezeptoren.

Diese Annahme ist auf Vögel zumindest in dieser Form nicht übertragbar, da sich Cryptochrome im Gegensatz zur Maus gemeinsam mit den Opsinen in der Schicht der Photorezeptoren befinden.

4.4.3 Möglicher Interaktionspartner von Cryptochrom in der Vogelretina: Opsin

Wie bereits in Kapitel 2 diskutiert, liegen beide eCRY1-Varianten zytosolisch vor und benötigen daher vermutlich einen Interaktionspartner, um eine Kaskade zu starten, in der ein G-Protein eine Phospholipase aktiviert und am Ende ein *second messenger* entsteht, der an der Membran ein Aktionspotential erzeugt (vgl. MÜLLER & KAUPP 1998). Eine alternative Variante der Cryptochrom-Signaltransduktion könnte ein intermolekularer Transfer von Energie zu einem Partner mit assoziiertem Chromophor sein (CASHMORE et al. 1999; vgl. Kapitel 2.4.4) oder eine Reizgeneration über spezifische Elektronentransportketten (WEAVER et al. 2000, AHMAD et al. 2006). Darüber hinaus fordert die Theorie von RITZ et al. (2000), dass die magneto-sensitiven Rezeptoren zumindest im Moment der Photonenabsorption in einer bestimmten Anordnung sphärisch fixiert sein müssen. Zytosolisch vorliegendes eCRY1 benötigt demnach einen membrangebundenen oder in einer bestimmten Ausrichtung fixierten Interaktionspartner.

Beide Forderungen könnten Opsine als Interaktionspartner erfüllen. Die Tatsache, dass sich beide eCRY1-Spleißvarianten beim Rotkehlchen in den Innensegmenten der Photorezeptoren und somit in direkter Nachbarschaft der Opsine befinden, lässt die

Überlegung einer möglichen Assoziation und eines intermolekularen Energietransfers zwischen Cryptochrom und Opsinen plausibel erscheinen. Auch im Hinblick auf die wichtige Fixierung von magneto-sensitiven Rezeptoren in einer bestimmten sphärischen Anordnung erscheint eine Interaktion mit Opsinen sinnvoll, da diese in den Außensegmenten der Photorezeptoren in den sogenannten Disks in hoher Ordnung und konstanter Raumrichtung vorliegen.

4.4.4 Mögliche Verschaltung der Cryptochromsignale in der Rotkehlchenretina

Sollten magnetische Informationen in der Retina analog zum bildverarbeitenden Sehen verarbeitet werden, dann stellt sich die Frage, wie das Cryptochromsignal vom Opsinsignal getrennt wird. Zapfen und Stäbchen verfügen über lediglich je ein Axon, über das Information zum Sehnerv übertragen werden kann.

Details über die Zelltypen in der Vogelretina und ihre Kontakte sind kaum bekannt, ebenso existiert bisher kein retinaler Schaltplan. Aus evolutionsbiologischen Gesichtspunkten ist jedoch anzunehmen, dass er möglicherweise dem Schaltplan der Reptilien ähnlich ist. Auf der Basis dessen kann spekuliert werden, wie das Cryptochrom-Signal möglicherweise vom Opsin-Signal getrennt wird.

Eine Isolierung des CRY-Signals aus den Photorezeptoren könnte beispielsweise durch laterale Inhibition ermöglicht werden. Eine Photorezeptorzelle ist möglicherweise eine „-CRY-Zelle“, eine andere eine „+CRY-Zelle“. Aus der „-CRY-Zelle“ würde dann ein reines Opsin-Signal weitergeleitet, aus der „+CRY-Zelle“ gleichzeitig ein Cryptochrom- und ein Opsin-Signal. Zwei verschiedene Bipolarzellen haben im OPL jeweils selektiv mit der „+CRY-Zelle“ und der „-CRY-Zelle“ Kontakt. Eine nachgeschaltete Amakrin- oder Ganglienzelle verrechnet die Signale aus den beiden Bipolarzellen und isoliert so - ähnlich wie beim Farbantagonismus (z.B. blau/gelb) - das CRY-Signal.

Eine ähnliche Signalisolation wäre bereits auf der Ebene der Horizontalzellen als negativer Feedback vorstellbar. Eine „+CRY-Zelle“ ist positiv zur Horizontalzelle verschaltet, diese Horizontalzelle ist wiederum negativ zu einer „-CRY-Zelle“ geschaltet und inhibiert diese. Auf diese Weise wird dem Zapfen das Opsinsignal herausgefiltert und das übrig gebliebene CRY-Signal kann an die Bipolarzelle weitergegeben werden. Eine ähnliche Isolation von zwei unterschiedlichen Signalen wird von PHILLIPS & BORLAND (1992) sowie DEUTSCHLANDER (1999a) für einen zweispektren-sensitiven lichtabhängigen Inklinationskompass bei Molchen (*Notophthalmus viridescens*) diskutiert.

Alternativ könnte, ähnlich wie dies für das auditive System diskutiert wird, eine Trennung der Signale über eine unterschiedliche zeitliche Abfolge erreicht werden.

Vermutet werden könnte auch eine Analogisierung der zwei Cryptochrom1-Spleißformen zu unterschiedlichen Sehpigmenten. eCRY1a wäre dann lediglich einem speziellen Zapfentyp (z. B. den P453 Zapfen) zuzuordnen und eCRY1b-Variante einem anderen (z. B. den P409 Zapfen). Diese Ausgangslage würde wiederum eine andere Verschaltung bzw. Signalverarbeitung fordern.

Wie bereits erwähnt, existiert jedoch zu wenig Detailwissen über die Vogelretina, um daraus tatsächliche Rückschlüsse auf mögliche Signalwege zu ziehen. Darüber hinaus ist noch nicht geklärt, in welchen Zapfentypen sich die beiden CRY1-Spleißformen befinden (vgl. 4.4.5). Auch ist unklar, ob überhaupt eine Trennung von Opsin und Cryptochrom-Signal erfolgen muss, oder ob nicht möglicherweise beide unterschiedliche Transduktionskaskaden nutzen.

4.4.5 Ausblick

Die in diesem Kapitel von mir durchgeführten Nachweisverfahren konnten die Lokalisation der mRNA von eCRY1a und eCRY1b sowie des Proteins von eCRY1b im Gewebeverband der Retina von *Erithacus rubecula* aufklären. In beiden Fällen sind die Cryptochrom 1-Varianten in den Innensegmenten der Photorezeptoren zu finden. Auf den Licht- ebenso wie Fluoreszenzmikroskopaufnahmen sind jedoch teilweise Lücken in der Expression bzw. in der Immunantwort zu sehen. Diese Expressionslücken deuten darauf hin, dass sich eCRY1a und eCRY1b möglicherweise nicht in allen Zapfentypen der Rotkehlchenretina befindet. Auch muss untersucht werden, ob sich die eCRY1-Varianten beim Vogel auch in den Stäbchen befinden. Unterschiedliche Zapfentypen und Stäbchen können mit Hilfe von spezifischen Opsin-Antikörpern ermittelt werden. Eine jeweilige Doppelfärbung des Opsins des entsprechenden Zapfentyps und eCRY1a oder b mit anschließender Überprojektion könnte diese Frage beantworten.

Darüber hinaus ist eine exakte Lokalisation der eCRY1-Varianten im Innensegment der Photorezeptoren durch Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie nicht zu ermitteln. So müsste beispielsweise geklärt werden, ob sich die eCRY1-Varianten im Ellipsoid oder im Myoid der Innensegmente befindet. Für eine derart detaillierte Analyse der retinalen Cryptochromexpression bietet sich eine immunohistochemische Untersuchung der Feinstruktur am Elektronenmikroskop (EM) an. Diese Untersuchungen verlangen im Gegensatz zur Paraformaldehydfixierung bei der Lichtmikroskopie eine Glutaraldehydfixierung des Gewebes, das eine spezielle Konjugation des Antikörpers voraussetzt. Da ich bereits bei der Produktion des spezifischen eCRY1b-Antikörpers auf eine

EM-Kompatibilität geachtet habe, ist zumindest für die Spleißvariante eCRY1b eine immunohistochemische Analyse im EM möglich. Eine entsprechende Studie wurde vor kurzem im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit G. FLEISSNER und dem Max Planck Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main begonnen.

5 Gesamtdiskussion

Lange Zeit standen die verhaltensbiologischen und neurobiologischen Erkenntnisse der Magnetkompassforschung mehr oder weniger isoliert nebeneinander. Meine Ergebnisse tragen möglicherweise dazu bei, die bekannten neurowissenschaftlichen und funktionell morphologischen nun mit den entsprechenden ethologischen Ergebnissen zu verknüpfen. Darüber hinaus konnte ich mit Hilfe der in meiner Arbeit verwendeten Methoden erstmals eine Brücke zwischen Orientierungsbiologie und Physiologie sowie Molekularbiologie und Proteinbiochemie schlagen. Ich halte diesen Ansatz persönlich für sehr viel versprechend, da er für die Zukunft zahlreiche neue Forschungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Orientierungsforschung eröffnet.

Die Untersuchungen meiner Arbeit führten zu drei wesentlichen Ergebnissen, die die Spekulation erlauben, dass dem Cryptochrom-Molekül neben seiner bekannten Beteiligung an Prozessen der inneren Uhr noch eine weitere Funktion im Organismus zukommt, nämlich die möglicherweise entscheidende Rolle bei der Vermittlung magnetischer Kompassinformation.

5.1 Cryptochrom in der Zugvogelretina weist auf dessen mögliche Beteiligung am Magnetrezeptionsprozess hin

Erstens konnte in meiner Arbeit die Existenz von drei Formen von Cryptochrom, die in der Retina eines Zugvogels exprimiert werden, klar nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um zwei Spleißformen des *Erithacus*-CRY1 (eCRY1a und eCRY1b) die auf unterschiedlichen Exonen codiert sind, sowie einer Form von *Erithacus*-CRY2.

Obwohl nicht alle Cryptochrome direkt durch Licht aktiviert werden (GRIFFIN et al. 1999, VAN GELDER et al. 2003) und bisher nicht für alle Radikalpaarprozesse in Flavoproteinen direkte physiologische Funktionen beschrieben werden konnten, hätte ein negativer Befund die Beteiligung dieses Photopigments bei der Wahrnehmung des Erdmagnetfelds sehr unwahrscheinlich gemacht, wenn nicht sogar ausgeschlossen. Allerdings ist eine Beteiligung von eCRY2 am lichtinduzierten Magnetperzeptionsprozess mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, da die Identifizierung eines Kernlokalisierungssignals auf dessen Lokalisierung im Zellkern hinweist.

Während eCRY1a und eCRY2 fast vollständig homolog zu Cryptochrom 1 und 2 in der Retina des Haushuhns sind, besitzt eCRY1b eine noch unbeschriebene C-terminale Domäne, die auf neue Proteinbindungseigenschaften und Interaktionspartner hindeutet. Alles deutet darauf hin, dass die C-terminale Region die hauptsächliche

Strukturdeterminante ist, die über die Funktion der einzelnen Cryptochrome entscheidet. Des Weiteren wird spekuliert, dass die Unterschiede in den C-terminalen Domänen auch die Spezifität der Funktionen zwischen Cryptochromen des gleichen Organismus liefern könnten. Für die Befunde aus der Retina des Rotkehlchens könnte dies bedeuten, dass die eCRY1 Spleißformen eCRY1a und eCRY1b unterschiedliche Funktionen im Organismus wahrnehmen. Eine ausführliche Diskussion der möglichen Aktivierungsmodelle von *Erithacus*-CRY1 unter besonderer Berücksichtigung des spezifischen C-Terminus findet sich in Kapitel 2.4.

Da beide eCRY1-Varianten nachweislich nicht membranassoziiert vorliegen (vgl. 2.3.4.3), benötigen sie für die Umwandlung eines Signals, z. B. eines Signals über die vorliegende Richtung des Erdmagnetfelds in ein Aktionspotential, mindestens einen Interaktionspartner oder alternativ eine Reizgeneration über spezifische Elektronentransportketten. Mindestens ein Interaktionspartner muss auch deshalb gefordert werden, weil nach der Radikalpaartheorie (RITZ ET AL. 2000; vgl. Kapitel 1) die magneto-sensitiven Rezeptoren zumindest im Moment der Photonenabsorption in einer bestimmten Anordnung sphärisch fixiert sein müssen, da die magnetische Kompassinformation durch einen Vergleich der Triplettausbeuten in verschiedenen Raumrichtungen errechnet wird. Demnach wäre der mögliche Interaktionspartner entweder membrangebunden oder läge in der Retina in einer bestimmten Ausrichtung fixiert vor. In Kapitel 2.4 werden bisher bekannte Interaktionen von CRY1 diskutiert und über eine mögliche Interaktion von *Erithacus*-CRY1 mit Opsinen der Vogelretina spekuliert. Die Tatsache, dass sich eCRY1b in der Retina von *Erithacus* befindet, lässt die Überlegung einer möglichen Assoziation und eines intermolekularen Energietransfers zwischen Cryptochrom und Opsinen plausibel erscheinen. Auch im Hinblick auf die wichtige Fixierung von magneto-sensitiven Rezeptoren in einer bestimmten sphärischen Anordnung erscheint eine Interaktion mit Opsinen sinnvoll, da diese in den Außensegmenten der Photorezeptoren in den sogenannten Disks in hoher Ordnung und konstanter Raumrichtung vorliegen.

Des Weiteren deuten laufende Versuche bei Vögeln darauf hin, dass die Tiere bei ihrer Magnetkompassorientierung ein intaktes visuelles Feld benötigen (W. WILTSCSKO, pers. Mitt.; K. STAPPUT, pers. Mitt.).

5.2 Spezifische Genexpressionsstudien von eCRY1a und eCRY1b weisen auf eine mögliche Lateralisation des Magnetkompass auf Rezeptorebene hin

Neben obigen Befunden deuten die Ergebnisse der von mir durchgeführten Expressionsstudien in Kapitel 3 auch darauf hin, dass die in Verhaltensversuchen nachgewiesene Lateralisation des Magnetkompass bereits auf Rezeptorebene in der Retina beginnen könnte. Die Genexpression von eCRY1a und eCRY1b unterscheidet sich sowohl zwischen den Augen als auch zwischen den Varianten. In der Dämmerung und nachts ist eCRY1a im linken Auge signifikant höher exprimiert als im rechten Auge. Im Gegensatz dazu ist die Expressionsquantität von eCRY1b in beiden Augen gleich, zeigt jedoch einen signifikanten Anstieg zu Beginn des Zuges in der Dämmerung. Durch die unterschiedlichen Expressionsraten von eCRY1a und eCRY1b verschiebt sich zum Zeitpunkt der Richtungsentscheidung des Vogels in der Dämmerung das Verhältnis zwischen den beiden Cryptochrom1-Varianten im rechten Auge zugunsten von eCRY1b. Diese Hochregulation von eCRY1b zur Zeit der Dämmerung in der Zugvogelretina und die Verschiebung zu dessen Gunsten im rechten Auge lässt die Spekulation zu, dass es sich bei dieser eCRY1-Spleißvariante möglicherweise um den gesuchten Magnetrezeptor handeln könnte.

Ein Vergleich der Daten mit anderen bisher durchgeführten CRY-Expressionsstudien, sowie eine ausführliche Diskussion der bei Vögeln bislang gefundenen visuellen Lateralisationen und ihre mögliche Bedeutung für den Prozess der Magnetwahrnehmung erfolgt in Kapitel 3.4.

5.3 Lokalisation der *Erithacus-Cryptochrom-1 mRNA* und Proteine in den Innensegmenten der Photorezeptoren weist auf eine mögliche neuronale Verarbeitung der magnetischen Richtungsinformation analog zum bildverarbeitenden Sehen hin

Durch meine Analysen konnte ich drittens zeigen, dass der Expressionort beider eCRY1-Spleißvarianten sowohl tagsüber als auch in der Dämmerung in den Innensegmenten der retinalen Photorezeptoren lokalisiert ist. Detailaufnahmen der spezifisch gefärbten Schnitte zeigen, dass sich die mRNA von eCRY1a und eCRY1b möglicherweise im unteren Teil des Ellipsoids oder im oberen Teil des Myoids der Innensegmente befindet. Die immunhistochemischen Experimente in diesem Kapitel der Arbeit zeigen, dass das Protein von eCRY1b zu beiden Tageszeiten ebenso in den Innensegmenten der Photorezeptoren zu finden ist. Dieser Befund spricht dafür, dass das Protein vom Syntheseort offensichtlich nicht in andere Zellkompartimente weitertransportiert wird.

Die Lokalisation beider spezifischer *Erithacus*-Cryptochrom1 Spleißformen in den Innensegmenten der Photorezeptoren stärkt die Annahme von LEASK (1977) sowie SCHULTEN & WINDEMUTH (1986) einer Beteiligung der Photorezeptoren im Magnetperzeptionsprozess bei Vögeln. Sie steht auch im Einklang mit der Forderung von RITZ ET AL. (2000) nach einer sphärischen und gleichmäßigen Anordnung der potentiellen Magnetfeldrezeptoren. Die hohe Dichte und exakte Verschaltung der Photorezeptoren erlauben dem Vogel darüber hinaus theoretisch eine wesentlich höhere Auflösung der magnetischen Richtungsinformation als über die deplazierten Ganglienzellen, die in deutlich geringerer Anzahl in der Retina vorliegen. Die von RITZ ET AL. (2000) errechneten, vom Radikalpaarprozess möglicherweise generierten, magnetfeldabhängigen Muster auf der Vogelretina (vgl. Kapitel 1) wären über die bereits bestehenden Kanäle der Bildverarbeitung der Photorezeptoren einfach zu generieren. Die räumliche Nachbarschaft zu Opsinen unterstützt die Annahme einer möglichen Interaktion zwischen diesen und Cryptochrom. Darüber hinaus lässt dieser Befund Spekulationen zu, dass die neuronale Verarbeitung der aus den Photorezeptoren stammenden magnetischen Richtungsinformation analog zum bildverarbeitenden Sehen stattfinden könnte. Modelle für eine mögliche Verschaltung und Signalverarbeitung der Cryptochromsignale werden ausführlich in Kapitel 4.4 diskutiert.

5.4 Cryptochrom als universelles Magnetrezeptormolekül bei der Vermittlung magnetischer Kompassinformation?

Die Ergebnisse der Untersuchungen meiner Arbeit am nachziehenden Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) weisen auf eine mögliche Beteiligung von Cryptochrom am Magnetperzeptionsprozess von Zugvögeln hin. Diese Annahme wird durch den Nachweis von Cryptochrom in der Retina der ebenfalls nachziehenden Gartengrasmücke (*Sylvia borin*) gestützt (MOURITSEN et al. 2004). Radikalpaarprozesse sind nachweislich die Grundlage der Rezeption des Erdmagnetfelds bei Vögeln (RITZ et al. 2004, THALAU et al. 2005) und Cryptochrome sind in der Lage, Radikalpaare zu bilden (GIOVANI et al. 2003). Ob die Vermittlung magnetischer Kompassinformation durch Cryptochrom jedoch auch für andere Organismen generalisierbar ist und ob sie für alle bisher beschriebenen Magnetkompassarten angenommen werden kann, ist noch ungeklärt.

Außer bei Rotkehlchen und Gartengrasmücke konnte bei Maus, Huhn, Zwergwachtel und Krallenfrosch Cryptochrom in der Retina nachgewiesen werden (MIYAMOTO & SANCAR 1998, HAQUE et al. 2002, FU et al. 2002, ZHU & GREEN 2001). Bisläng war unklar, ob alle der genannten Spezies ebenfalls über einen Magnetkompass verfügen. Vor kurzem konnte zumindest beim Haushuhn (*Gallus gallus*) ein Magnetkompass nachgewiesen werden (FREIRE et al. 2006). Dabei handelt es sich wahrscheinlich wie bei Rotkehlchen und

Gartengrasmücke um einen Inklinationskompass, da stärkere und schwächere Magnetfelder die Magnetorientierung verhindern, wie es für Rotkehlchen beschrieben ist (W. WILTSCHKO, pers. Mitt.). Trotzdem ist der Befund möglicherweise ein Indiz für die Generalisierbarkeit der Rolle von Cryptochrom zumindest bei der Vermittlung magnetischer Kompassinformation innerhalb der Klasse der Vögel.

Ob sich dieses System von den Vögeln auch auf die Klasse der Reptilien übertragen lässt, ist unklar. Bislang liegen keine Untersuchungen zu retinalem Cryptochrom bei Reptilien vor. Reptilien verwenden wie Vögel einen Inklinationskompass zur Orientierung am Erdmagnetfeld. Allerdings können sich junge Meeresschildkröten im Gegensatz zu Vögeln mit Hilfe dieses Kompass auch in absoluter Dunkelheit orientieren (LOHMANN & LOHMANN 1993). Dies deutet darauf hin, dass dem Inklinationskompass der Reptilien im Gegensatz zu dem der Vögel möglicherweise kein lichtabhängiger Radikalpaarmechanismus zugrunde liegt und damit Cryptochrom als Rezeptormolekül womöglich eine untergeordnete Rolle spielt.

Ob Cryptochrom bei der Magnetorientierung von Säugetieren eine Rolle spielt, ist ebenso ungewiss. Vor kurzem konnte jedoch beim Blindmull (*Spalax ehrenbergi*) der Nachweis von retinalem Cryptochrom erbracht werden (AVIVI et al. 2004); allerdings lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der circadianen Regulation von CRY und nicht auf dessen Lokalisation. Blindmulle sind subterrane Nager aus Israel, die sich in ihren unterirdischen lichtlosen Gangsystemen am Erdmagnetfeld orientieren (BURDA et al. 1991; KIMCHI & TERKEL 1999, 2001; KIMCHI et al. 2004), ebenso wie die ebenfalls subterranean lebenden sambischen Graumulle (BURDA et al. 1990, MARHOLD et al. 1997a,b).. Im Gegensatz zu Reptilien und Vögeln verwenden letztere dabei jedoch keinen Inklinations-, sondern einen Polaritätskompass (MARHOLD et al. 1997b), der nicht auf einem Radikalpaarmechanismus beruht (THALAU et al. 2006). Auch in diesem System erscheint die Verwendung eines lichtinduzierten Magnetrezeptors eher ungeeignet.

Bei Mäusen, in deren Retina Cryptochrom lokalisiert wurde (MIYAMOTO & SANCAR 1998), konnte bislang kein spontaner Magnetkompass nachgewiesen werden. Gelänge der Nachweis einer eindeutigen Verhaltensantwort, so wären Mäuse für die Untersuchung eines auf Cryptochrom basierenden Magnetrezeptors jedoch sehr gut geeignet, da bereits speziell gezüchtete genetische Nullmutanten ohne Cryptochrom existieren. Ist eine CRY-nullmutante Maus im Gegensatz zur Wildform nicht in der Lage, sich am Erdmagnetfeld zu orientieren, so wäre dies ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung von Cryptochrom am Magnetrezeptionsprozess. In diesem Zusammenhang sind neue Ergebnisse zum erlernten Magnetkompass bei Labormäusen sicher von grossem Interesse (R. MUHEIM, pers. Mitt.).

Der Nachweis von Cryptochrom in der Retina des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (ZHU & GREEN 2001) könnte auf eine Beteiligung als Magnetrezeptormolekül bei Amphibien hinweisen. Untersuchungen des Magnetkompass bei Molchen weisen wie bei Vögeln auf eine Licht- und Wellenlängenabhängigkeit des Systems hin; allerdings scheinen Amphibien zur Orientierung sowohl einen Inklinations- als auch einen Polaritätskompass parallel zu verwenden (PHILLIPS 1986). Eine Beteiligung von Radikalpaarprozessen an der Magnetkompassorientierung bei dieser Vertebratenklasse ist jedoch noch nicht untersucht.

Dass bei der Magnetrezeption der Amphibien exklusiv retinale Magnetrezeptormoleküle beteiligt sind, ist allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen: DEUTSCHLANDER et al. (1999b) konnten zeigen, dass extraokulare Photorezeptoren im Pinealorgan von Amphibien im Prozess der Magnetfeldwahrnehmung eine Rolle spielen. Bei Vögeln konnte zwar sowohl eine Lichtempfindlichkeit des Pinealorgans aufgezeigt (SEMM & DEMAINE 1983) als auch Cryptochrom in dieser Hirnregion nachgewiesen werden (FU et al. 2002, BAILEY et al. 2002). Eine Pinealektomie bei Trauerschnäppern hatte jedoch keinen Einfluss auf deren Magnetorientierung (SCHNEIDER et al. 1994), was möglicherweise auf einen unterschiedlichen Perzeptionsmechanismus bei Amphibien und Vögeln hindeutet.

Ein direkter Nachweis eines Einflusses des Magnetfelds auf Cryptochrom konnte kürzlich bei Pflanzen erbracht werden. AHMAD et al. (2006) konnten zeigen, dass die Intensität des Magnetfelds einen Effekt auf cryptochromgesteuerte Antworten bei höheren Pflanzen hat. Ein Anstieg der Magnetfeldintensität hatte unter blauem Licht und somit unter Kontrolle von Cryptochrom bei der Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*, ein signifikant verringertes Hypokotylwachstum zur Folge. Unter rotem Licht und damit unter Einfluss von Phytochromen konnte keine Veränderung festgestellt werden. CRY1 und CRY2 Doppelmutanten zeigten ebenfalls keine Effekte. Weitere cryptochromgesteuerte Antworten, wie blaulichtabhängige Anthocyaninproduktion und der Abbau von CRY2-Protein, verstärkten sich bei Intensitätserhöhung des Magnetfelds.

Die Befunde bei *Arabidopsis* befürworten interessante Parallelen in der Wahrnehmung des Erdmagnetfelds bei Pflanzen und Tieren, die bei beiden Organismengruppen auf den physikalischen Eigenschaften durch Licht angeregter Cryptochrome basieren könnten.

Es könnte eine intrinsische Eigenschaft der Photochemie von Cryptochromen sein, auf Änderungen des Erdmagnetfelds zu reagieren (AHMAD et al. 2006). Tiere, die über dieses Pigment verfügen, könnten sich im Laufe der Evolution diese Eigenschaft zu Nutze gemacht haben, um magnetische Information für die Kompassorientierung zu gewinnen.

Möglicherweise sind dabei die Tiere im Vorteil, die über ein hochentwickeltes Farbsehen verfügen. Eine hohe Anzahl unterschiedlicher Photopigmente und ggf. zusätzliche Öltröpfchen, die als Kantenfilter fungieren, setzen komplexe Verschaltungsebenen in der Retina voraus. Diese Spezies haben darüber hinaus möglicherweise eine flexiblere neuronale Struktur. Eine höhere Flexibilität ist auch auf kognitiver Ebene zu erwarten. Bei einem tetrachromen visuellen System, wie es bei den Vögeln vorkommt, könnte die Funktion eines Magnetkompass möglicherweise einfacher integriert werden, als bei mono- oder bichromaten Systemen. Dies würde allerdings voraussetzen, dass ein lichtabhängiger Magnetkompass in dieser Form in der Evolution erst nach der visuellen Entwicklung entstanden ist.

5.5 Ausblick

Neben den in den einzelnen Kapiteln ausführlich diskutierten Ausblicken gibt es darüber hinaus zusätzlich zahlreiche generelle Aspekte, deren Untersuchung für die Erforschung des Magnetkompass wichtig wäre. Eine Auswahl möchte ich hier anführen:

1. Gibt es möglicherweise magnetische Effekte auf Membranpotentiale der retinalen Photorezeptoren oder anderer retinaler Zellen?
2. Gibt es magnetische Effekte auf das Cryptochrom-Protein von Zugvögeln?
3. Sind magnetische Effekte auf andere Cryptochrom-Modelle, wie z.B. die TIM-PER Interaktion bei *Drosophila*, effektiv nachweisbar?
4. Ist das von MOURITSEN et al. (2005) beschriebene *Cluster N* in der Nähe des visuellen Wulstes tatsächlich für die Verarbeitung von visuell basierten Sternen- und Magnetfeldinformationen verantwortlich oder ist es vielmehr für die Steuerung der Zugunruhe bzw. der Tages- und Jahresperiodik zuständig?
5. Führt eine *Cluster N*-Ektomie zum Verlust des Magnetkompass?
6. Ist ein neuronales Tracing aus oder zu den retinalen Photorezeptorzellen oder möglicherweise des DGCs zum bzw. vom *Cluster N* möglich?
7. Welche Interaktionen bestehen zwischen einem möglicherweise Cryptochrom-gesteuerten „Kompass im Auge“ und einem auf Magnetit basierenden „Gaussmeter im Schnabel“ von Vögeln?

6 Zusammenfassung

Das aktuell diskutierte Modell der lichtabhängigen Magnetrezeption bei Vögeln beschreibt, dass die Richtung des Erdmagnetfelds durch Radikalpaarprozesse in spezialisierten Photorezeptoren wahrgenommen wird. Dabei werden Cryptochrome, eine Klasse photoaktiver Flavoproteine, als potentielle Kandidaten für das Radikalpaarmodell und damit als mögliches Magnetrezeptormolekül diskutiert. Verhaltensbiologische Experimente mit Zugvögeln zeigen, dass der Magnetrezeptionsprozess offensichtlich stark lateralisiert im rechten Auge stattfindet und dass dieser Prozess Licht aus dem blau-grünen Teil des Spektrums benötigt. Cryptochrome absorbieren Licht in diesem Bereich und besitzen darüber hinaus biochemische Eigenschaften, die für die Funktion des Radikalpaarmodells entscheidend sind.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen habe ich untersucht, ob Cryptochrom (CRY) in der Retina des Rotkehlchens, *Erithacus rubecula*, einem nachziehenden Singvogel, zu finden ist. Mit molekulargenetischen Methoden konnte ich erstmals drei individuell exprimierte Cryptochrome aus der Rotkehlchenretina isolieren: *Erithacus* (e)-CRY1a, -CRY1b und -CRY2. Während eCRY1a und eCRY2 fast vollständig homolog zu Cryptochrom 1 und 2 in der Retina des Haushuhns sind, besitzt eCRY1b eine noch unbeschriebene C-terminale Domäne, die auf neue Proteinbindungseigenschaften und Interaktionspartner hindeutet. Die Identifizierung eines Kernlokalisierungssignals bei eCRY2 weist auf dessen Lokalisierung im Zellkern hin und macht seine Funktion als sensorischer Lichtrezeptor eher unwahrscheinlich. Ein mit Hilfe der Aminosäuresequenz erstelltes Proteinmodell von eCRY1 zeigt, dass dieser Typus zwei Cofaktoren besitzt: das katalytische Chromophor Flavinadenindinukleotid (FAD) und das lichtsammelnde Pterin Methenyltetrahydrofolat (MTHF). eCRY1a und eCRY1b sind Spleißprodukte des gleichen Gens; ihre C-terminalen Domänen sind auf unterschiedlichen Exonen codiert. eCRY1a und eCRY1b besitzen beide keine Membranbindedomäne und liegen zytosolisch vor. Weil jedoch laut Radikalpaartheorie die magnetosensitiven Rezeptoren zumindest im Moment der Photonenabsorption in einer bestimmten Anordnung und Raumrichtung vorliegen müssen, benötigen beide eCRY1-Varianten daher mindestens einen sphärisch fixierten Interaktionspartner. In meiner Arbeit diskutiere ich Opsine als mögliche Partner, da diese in den Aussensegmenten der Photorezeptoren stark geordnet und in konstanter Raumrichtung vorliegen.

Die Genexpression von eCRY1a und eCRY1b unterscheidet sich sowohl zwischen den Augen als auch zwischen den CRY-Varianten. Im Mittel waren die Expressionswerte von eCRY1a in der Rotkehlchenretina fünf- bis zehnmals höher als die von eCRY1b. In der

Dämmerung und nachts ist eCRY1a im linken Auge signifikant höher exprimiert als im rechten Auge. Im Gegensatz dazu ist die Expression von eCRY1b in beiden Augen gleich, zeigt jedoch einen signifikanten Anstieg zu Beginn des Zuges in der Dämmerung. Durch die unterschiedlichen Expressionsraten von eCRY1a und eCRY1b verschiebt sich zum Zeitpunkt der Richtungsentscheidung des Vogels in der Dämmerung das Verhältnis zwischen den beiden Cryptochrom1-Varianten im rechten Auge zugunsten von eCRY1b. Die Ergebnisse meiner Expressionsstudie deuten darauf hin, dass die in Verhaltensversuchen nachgewiesene Lateralisation des Magnetkompass bereits auf Rezeptorebene in der Retina beginnen könnte.

mRNA in situ- als auch immunohistochemische Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass bei Zugvögeln sowohl die *mRNA* als auch die Proteine beider eCRY1-Typen in den Innensegmenten der retinalen Photorezeptoren lokalisiert sind. Die räumliche Nachbarschaft zu Opsinen unterstützt die Annahme einer möglichen Interaktion zwischen diesen und Cryptochrom. Darüber hinaus lässt dieser Befund Spekulationen zu, dass die neuronale Verarbeitung der aus den Photorezeptoren stammenden magnetischen Richtungsinformation analog zum bildverarbeitenden Sehen stattfinden könnte. Modelle für eine mögliche Verschaltung und Signalverarbeitung der Cryptochromsignale werden in dieser Arbeit diskutiert.

Insgesamt unterstützen die Befunde meiner Arbeit die im Radikalpaarmodell diskutierte Annahme, dass Cryptochrome eine entscheidende Rolle bei der Perzeption von magnetischer Kompassinformation bei Zugvögeln spielen und möglicherweise als Magnetrezeptormoleküle fungieren. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis des Gesamtprozesses der Magnetrezeption bei Tieren leisten, und zwar von der Rezeptorzelle bis zur Verhaltensantwort. Meine Ergebnisse tragen möglicherweise auch dazu bei, die bekannten neurowissenschaftlichen und funktionell morphologischen mit den entsprechenden ethologischen Ergebnissen zu verknüpfen. Ich würde es sehr begrüßen, wenn meine Arbeit zu weiterführender Forschung auf diesem spannenden Gebiet anregt und zu einem besseren Verständnis der noch unbekanntem Aspekte der Magnetrezeption beitrüge.

7 Summary

One of the currently discussed models of the mechanism underlying light-dependent magnetoreception in migratory birds proposes that the direction of the magnetic field is perceived by 'radical-pair' processes in specialized photoreceptors, with cryptochromes suggested as potential candidate molecules mediating magnetic compass information. Behavioural studies have shown that avian magnetic compass orientation is lateralized in the right eye and requires light from the blue-green part of the spectrum. Cryptochromes, a class of photoactive flavoproteins are known to absorb in the same spectral range. Furthermore, they possess biochemical properties crucial for the 'radical-pair' model, including the ability to form radical pairs.

In view of these considerations I searched for cryptochrome (CRY) in the retina of European robins, *Erithacus rubecula*, passerine birds that migrate at night. With molecular genetic methods I was able to isolate three individually expressed cryptochromes, *Erithacus* (e)-CRY1a, -CRY1b, and -CRY2. While eCRY1a and eCRY2 are homologous to cryptochrome 1 and 2 found in domestic chicken retina, eCRY1b owns a unique carboxy (C)-terminal, suggesting novel protein properties and interaction partners. eCRY2 was found to be located in the nucleus, therefore its involvement as a sensory light receptor in magnetoreception is less likely. A protein model of eCRY1 reveals the catalytic chromophore flavin adenine dinucleotide (FAD) and a light-harvesting pterin in the form of methenyltetrahydrofolate (MTHF) as cofactors. Both eCRY1-types are splice products of the same gene with their C-terminal domains encoded on different exons. Also, eCRY1a and eCRY1b are both cytosolic; according to the 'radical-pair' model they therefore need at least one spherically fixed interaction partner in order to act as magnetoreceptor molecule. Here, opsins are discussed as potential partners because they are arranged in high order and constant spatial direction in the outer segments of the retina's photoreceptor cells.

Expression levels of eCRY1a and eCRY1b differ between eyes as well as between CRY-types. In general, expression levels of eCRY1a in the Robin's retina were about five to ten times higher than of eCRY1b. eCRY1a shows significant higher transcription levels in the left than in the right eye during dusk and at night. In contrast, the pattern of eCRY1b is similar in both retinae, with a significant peak at dusk. As a result, the ratio of the two eCRY1-transcripts is shifted in favour of eCRY1b in the right eye during the daily onset of migration at dusk. The results of my expression study suggest that the reported lateralization in the behavioural experiments might already start at the receptor level.

mRNA in-situ and immunolocalisation experiments show that *mRNA* as well as the proteins of both eCRY1-types are located in the inner segments of the photoreceptor cells in the bird's retina. The spatial vicinity further supports the assumption of opsin as interaction partner of eCRY1 in the process of magnetoreception. It also suggests that magnetic input originating in the photoreceptors of the bird's retina possibly shares neuronal pathways with the visual system. Several models of how the cryptochrome signals could possibly be processed are discussed.

In light of the 'radical-pair' model, the findings of my work support a potential role of cryptochromes as transducers for the perception of magnetic compass information in birds. Also, they might represent an important step to a more detailed understanding of the overall process from receptor cell to behaviour. My results contribute to connecting the known neurobiological and functional morphologic findings with respective ethological responses. Hopefully, this work encourages further research in this field in order to unravel the mystery of magnetoreception in animals.

Literaturverzeichnis

- Able K.P., Bingman V.P. (1987) The development of orientation and navigation behavior in birds. *Quart. Rev. Biol.* **62**:1-29.
- Ahmad M., Cashmore M. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**:162-166.
- Ahmad M., Galland P., Ritz T., Wiltschko R., Wiltschko W. (2006) Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta, im Druck* (DOI: 10.1007/s00425-006-0383-0).
- Ahmad M., Jarillo J.A., Cashmore A. (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue-light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* **10**:197-207.
- Apostolakos M.J., Schuermann W.H., Framton M.W., Utel M.J., Willey J.C. (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **213**:277-284.
- Avivi A., Oster H., Joel A., Beiles A., Albrecht U., Nevo E. (2004) Circadian Genes in a Blind Subterranean Mammal III: Molecular Cloning and Circadian Regulation of Cryptochrome Genes in the Blind Subterranean Mole Rat, *Spalax ehrenbergi* Superspecies. *J Biol Rhythms* **19**:22-34.
- Bailey M.J., Chong N.W., Xiong J., Cassone V.M. (2002) Chicken's Cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. *FEBS Lett* **513**:169-174.
- Beason R.C. (1986) Magnetic orientation and magnetically sensitive material in migratory birds. In: Maret G., Boccara N., Kiepenheuer J. (Eds.): *Biophysical effects of steady magnetic fields*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp:167-172.
- Beason R.C., Dussourd N., Deutschlander M.E. (1995) Behavioural evidence for the use of magnetic material in magnetoreception by a migratory bird. *J. Exp. Biol.* **198**:141-146.
- Beason R.C., Nichols J.E. (1984) Magnetic orientation and magnetically sensitive material in a transequatorial migratory bird. *Nature* **309**:151-153.
- Beason R.C., Semm P. (1987) Magnetic responses of the trigeminal nerve system of the bobolink, *Dolichonyx oryzivorus*. *Neurosci. Lett.* **80**:229-234.
- Beason R.C., Semm P. (1996) Does the avian ophthalmic nerve carry magnetic navigational information? *J. Exp. Biol.* **199**:1241-1244.
- Beecher W.J. (1978) Feeding adaptations and evolution in the starlings. *Bulletin Chicago Acad Sci*, **11**:269-298.
- Bell S., Klein C., Muller L., Hansen S., Buchner J. (2002) p53 contains large unstructured regions in its native state, *J. Mol. Biol.* **322**:917-27.
- Berthold, P., Dorka, V. (1969): Vergleich und Deutung von jahreszeitlichen Wegzugs-Zugmustern ausgeprägter und wenig ausgeprägter Zugvögel. *Vogelwarte* **25**: 121-129.
- Berthold P. (1990) *Vogelzug: Eine kurze, aktuelle Gesamtübersicht*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- Bezzel E., Weik F. (1992). *Das Rotkehlchen*. Naturbuch Verlag, Augsburg.

- Biebach, H. (1983): Genetic determination of partial migration in the European Robin. *Auk* **100**: 601-606.
- Bingman V.P. (1987) Earth's magnetism and the nocturnal orientation of migratory European robins. *Auk* **104**:523-525.
- Bingman V.P., Wiltschko, W. (1988) Orientation of Dunnocks (*Prunella modularis*) at sunset. *Ethology* **77**:1-9.
- Bowmaker J.K., Heath L.A., Wilkie S.E., Hunt D.M. (1997) Visual pigments and oil droplets from six classes of photoreceptor in the retinas of birds. *Vision Res.* **37**:2183-2194.
- Bräutigam, C.A., Smith, B.S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D.R., Machius, M., and Deisenhofer, J. (2004) Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:12142-7.
- Britto L. R. G., Keyser K. T., Hamassaki D. E., Karten H. J. (1988) Catecholaminergic subpopulation of retinal displaced ganglion cells projects to the accessory optic nucleus in the pigeon (*Columba livia*). *J. Comp. Neurol.* **269**:109-117.
- Brudler R., Hitomi K., Daiyasu H., Toh H., Kucho K., Ishiura M., Kanehisa M., Roberts V.A., Todo T., Trainer A. and Getzoff E.D. (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol. Cell* **11**, 59-67.
- Burda H., Marhold S., Westenberger T., Wiltschko R., Wiltschko W. (1990) Magnetic compass orientation in the subterranean rodent *Cryptomys hottentotus* (Bathyergidae). *Experientia* **46**: 528-530.
- Burda H., Marhold S., Wiltschko W., Beiles A., Nevo E., Simon S. (1991) Spontane magnetische Richtungspräferenzen bei Blindmäusen, *Spalax ehrenbergi superspecies* (Rodentia, Mammalia). *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* **84**: 339.
- 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.
- Campenhausen M.V., Kirschfeld K. (1998) Spectral sensitivity of the accessory optic system of the pigeon. *J Comp Physiol [A]* **183**:1-6.
- Cashmore A., Jarillo J.A., Wu Y.-J., Liu D. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for Plants and Animals. *Science* **284**:760-765.
- Chaves I., Yagita K., Barnhoorn S., Okamura H., van der Horst G.T.J., Tamanini F. (2006): Functional Evolution of the Photolyase/Cryptochrome Protein Family: Importance of the C-Terminus of Mammalian CRY1 for Circadian Core Oscillator Performance. *Molecular and Cellular Biology* **26**:1743-1753.
- Chomczynski P., Mackey K. (1995) Substitution of Chloroform by bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* **225**:163-164.
- Cowan W.M., Adamson L., Powell T.P.S. (1961) An experimental study of the avian visual system. *J. Anat.* **95**:545-563.
- Cserzo M., Wallin E., Simon G., von Heijne, Elofsson A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface Method. *Prot. Eng.* **10**:673-676.

- Deutschlander M.E., Phillips J.B., Borland S.C. (1999a) The case for light-dependent magnetic orientation in animals. *J. Exp. Biol.* **202**:891-908.
- Deutschlander M.E., Phillips J.B., Borland S.C. (1999b) Extraocular magnetic compass in newts. *Nature* **400**: 324-325.
- Dharmaretna M., Andrew R.J. (1994) Age- and stimulus-specific use of right and left eyes by the domestic chick. *Anim. Behav.* **48**:1395-1406.
- Dissel S., Codd V., Fedic R., Garner K.J., Costa R., Kyriacou C.P., Rosato E. (2004) A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.* **7**:834-840.
- Ender A., Schierwater B. (2003) Placozoa are not derived cnidarians: evidence from molecular morphology. *Mol. Biol. Evol.* **20**:130-134
- Esteve V., Canela N., Rodriguez-Vilarrupla A., Aligue R., Agell N., Mingarro I., Bachs O., Perez-Paya E. (2003) The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition, *ChemBioChem* **4**:863-9.
- Fite K., Brecha M., Karten H., Hunt S. (1981) Displaced ganglion cells and the accessory optic system of pigeon. *J. Comp. Neurol.* **195**: 278-288.
- Fleissner G., Holtkamp-Rötzler E., Hanslik M., Winkelhofer M., Fleissner G., Petersen N., Wiltshko W. (2003) Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing Pigeons. *J. Comp. Neurol.* **458**:350-360.
- Freire R., Munro U. H., Rogers, L, Wiltshko R., Wiltshko W. (2006) Chickens orient using a magnetic compass. *Current Biology* **15**:620-621.
- Frohmann M.A. (1994) On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Meth. Appl.* **4**:40-58
- Fu Z., Inaba M., Noguchi T., Kato H. (2002) Molecular Cloning and Circadian Regulation of Cryptochrome Genes in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Biol Rhythms* **17**:14-27.
- Gassen H.G., Schrimpf G. (Hrsg.) (1999) Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. (2. Aufl.) Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K., (2003) Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature Structural Biology* **6**:489-490.
- Glutz v. Blotzheim U.N. (Hrsg.) (1988) Handbuch der Vögel Mitteleuropas. Band 11/I Passeriformes (2. Teil) Turdidae. Aula-Verlag, Wiesbaden.
- Griffin E.A., Staknis D., Weitz C.J. (1999) Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock. *Science* **286**:768-771
- Güntürkün O. (1997) Avian visual lateralization: a review. *NeuroReport* **8**:3–11.
- Hanslik M., Heunemann C., Holtkamp-Rötzler E., Winkelhofer M., Petersen N., Fleissner G. (2000) Superparamagnetic Magnetite in the Upper Beak Tissue of Homing Pigeons. *Bio Metals* **13**:325-331.

- Haque R., Chaurasia S.S., Wessel J.H., Iuvone P.M. (2002) Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *NeuroReport* **13**:2247-2251
- Harms C.A., Ottinger C.A., Blazer V.S., Densmore C.L., Pieper L.H., Kennedy-Stoskopf S. (2000) Quantitative polymerase chain reaction for transforming growth factor beta applied to a field study of fish health in Chesapeake Bay tributaries. *Environ. Health Perspect.* **108**:447-452.
- Harper S.M., Neil L.C., Gardner K.H. (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**:1541-1544.
- Hart N.S., Partridge J.C., Cuthill I.C. (2000a) Retinal asymmetry in birds. *Curr. Biology* **10**:115-117.
- Hart N.S., Partridge J.C., Cuthill I.C., Bennett A.T.D. (2000b) Visual pigments, oil droplets, ocular media and cone photoreceptor distribution in the two species of passerine bird: the blue tit (*Parus caeruleus* L.) and the blackbird (*Turdus merula* L.). *J. Comp. Physiol. A* **186**:375-387.
- Holtkamp-Rötzler E., Fleissner G., Hanzlik M., Wiltshko W., Petersen N. (1997) Mechanoreceptors in the upper beak of homing pigeons (*Columbia livia*) as putative structural candidates for magnetoreception. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **90**:290.
- Iakoucheva L.M., Radivojac P., Brown C.J., O'Connor T.R., Sikes J.G., Obradovic Z., Dunker A.K. (2002) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1037-49.
- Jarillo J.A., Capel J., Tang R.H., Yang H.Q., Alonso J.M., Ecker J.R., Cashmore A.R. (2001) An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* **410**:487-490.
- Johnson J.L., Hamm-Alvarez S., Payne G., Sancar G.B., Rajagopalan K.V., Sancar A. (1988) Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyase as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:2046-2050.
- Kalmijn A.J. (1978) Electric and magnetic sensory world of sharks, skates and rays. In: Hodgson, F. S. & Mathewson, R. F. (Eds.): *Sensory biology of sharks, skates and rays*. Office Naval Res., Arlington, VA, pp:507-528.
- Kawamuro K., Irie T., Nakamura T. (1997) Filtering effect of cone oil droplets detected in the P-III response spectra of Japanese quail. *Vision Res.* **37**:2829-2834.
- Kimchi T., Terkel J. (1999) Magnetic orientation by blind mole rats in a labyrinth. *Isr. J. Zool.* **45**: 318.
- Kimchi T., Terkel J. (2001) Magnetic compass orientation in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*. *The Journal of Experimental Biology* **204**:751-758.
- Kimchi T., Etienne A.S., Terkel J. (2004) A subterranean mammal uses the magnetic compass for path integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**: 1105-1109.
- Kirschvink J. L., Gould J. L. (1981) Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Bio Systems* **13**:181-201.

- Kirschvink J.L., Jones D.S., MacFadden B.J. (1985) Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms. Plenum Press, New York.
- Klinowska, M. (1988) Catacean navigation and geomagnetic fields. *J. Navigation* **41**:52-71.
- Kobayashi Y., Ishikawa T., Hirayama J., Daiyasu H., Kanai S., Toh H., Fukuda I., Tsujimura T., Terada N., Kamei Y., Yuba S., Iwai S., Todo T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes to Cells* **5**:725-738.
- Komori H., Masui R., Kuramitsu S., Yokoyama S., Shibata T., Inoue Y., Miki K. (2001) Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 13560-5.
- Leask M. (1977) A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature* **267**:144-145.
- Leask M.J.M. (1978) Primitive models of magnetoreception. In: Schmidt-Koenig K., Keeton W.T., (Eds): *Animal migration, navigation and homing*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp:318-322.
- Light P., Salmon M., Lohmann K.J. (1993) Geomagnetic orientation of loggerhead sea turtles: Evidence for an inclination compass. *J. Exp. Biol.* **182**:1-10.
- Lin F.J., Song W., Meyer-Bernstein E., Naidoo N., Sehgal A. (2001) Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7287-7294.
- Linding R., Jensen L.J., Diella F., Bork P., Gibson T.J., Russell R.B. (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics, *Structure (London)* **11**:1453-9.
- Lohmann K.J., Lohmann C.M.F. (1992) Orientation to oceanic waves by green turtle hatchlings. *J. Exp. Biol.* **171**:1-13.
- Lohmann K.J., Lohmann C.M.F. (1993) A light-independent magnetic compass in leatherback sea turtle. *Biol. Bull.* **185**:149-151.
- Maier E.J. (1992) Spectral sensitivities including the ultraviolet of the passeriform bird *Leiothrix lutea*. *J. Comp. Physiol. A* **170**:709-714.
- Maier E.J., Bowmaker J.K. (1993) Colour vision in the passeriform bird, *Leiothrix lutea*: correlation of visual pigment absorbance and oil droplet transmission with spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol. A* **172**:295-301.
- Marc R.E. (1998) The structure of vertebrate retinas. In: Toyoda J. (Ed.) *The retinal basis of vision*. Elsevier, Amsterdam.
- Marhold S., Wiltschko W., Burda H. (1997a) A magnetic polarity compass for direction finding in a subterranean mammal. *Naturwissenschaften* **84**:421-423.
- Marhold S., Burda H., Kreilos I., Wiltschko W. (1997b) Magnetic orientation in common molarats from Zambia. In: *Orientation and Navigation: Birds, Humans and Other Animals*. Paper No 5. Royal Institute of Navigation, Oxford.
- Merkel, F. W. & Wiltschko, W. (1965): Magnetismus und Richtungsfinden zugunruheriger Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*). *Vogelwarte* **23**:71-77.

- Miyamoto Y., Sancar A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6097-6102
- Möller A., Sagasser S., Wiltschko W., Schierwater B. (2004) Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* **91**:585-588.
- Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dirks, P., Weiler R. (2004) Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *PNAS* **101**: 14294-14299.
- Mouritsen H., Feenders G., Liedvogel M., Wada K., Jarvis E.D. (2005) Night-vision brain area in migratory songbirds. *PNAS* **102**:8339-8344.
- Mülhardt C. (2002) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Müller F., Kaupp U.B. (1998) Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**:4
- Nalbach H.O., Wolf-Oberhollenzer F., Remy M. (1993) Exploring the image. In: Zeigler H.P., Bischof H.P. (Eds.) *Vision, Brain, and Behavior in Birds*. MIT Press, Cambridge, Mass., pp:25-46.
- Némec P., Altman J., Marhold S., Burda H., Oelschläger H.H.A. (2001) Neuroanatomy of Magnetoreception: The superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science* **294**:366-368.
- Neumeyer C., Jäger J. (1985) Spectral sensitivity of the freshwater turtle *Pseudemys scripta elegans*: evidence for the filter-effect of colored oil droplets. *Vision Res* **25**:833-838.
- Okada T., Ernst O.P., Palczewski K., Hofmann K.P. (2001) Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* **26**:318-324.
- Özgür S., Sancar A. (2003) Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *Biochemistry* **42**:2926-2932.
- Park C.M., Bhoo S.H., Song P.S. (2000) Inter-Domain crosstalk in the phytochrome molecules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**:449-456.
- Park H.W., Kim S.T., Sancar A., Deisenhofer J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* **268**:1866-1872.
- Partch C., Clarkson M.W., Özgür S., Lee A.L., Sancar A. (2005) Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* **44**:3795-3805.
- Pätzold R. (1995) *Das Rotkehlchen*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Phillips J. B. (1986) Two magnetoreception pathways in a migratory salamander. *Science* **233**:765-767.
- Phillips J.B., Borland S.C. (1992) Wavelength specific effects of light on magnetic compass orientation of the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *Ethol. Ecol. Evol.* **4**:33-42.

- Prior H., Wiltschko R., Stapput K., Güntürkün O., Wiltschko W. (2001) Visual lateralization and homing in pigeons. In: Orientation and navigation - Birds, Humans & other Animals. Royal Institute of Navigation, Oxford:25-1-25-8.
- Quinn T.P., Merrill R.T. & Brannon E.L. (1981) Magnetic field detection in sockeye salmon. *J.Exp. Zool.* **217**:137-142.
- Reissmann E., Ernsberger U., Francis-West P.H., Rueger D., Brickell P.M., Rohrer H. (1996) Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* **122**:2079-88.
- Ritz T., Adem S., Schulten K. (2000) A Model for vision-based magnetoreception in birds. *Biophys J* **78**:707-718.
- Ritz T., Thalau P., Phillips J.B., Wiltschko R., Wiltschko W. (2004) Resonance effects indicate a radical pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature* **429**:177-180
- Rogers L. (1996) Behavioral, structural and neurochemical asymmetries in the avian brain: a model system for studying visual development and processing. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**:487-503.
- Rogers L.J., Bolden S.W. (1991) Light-dependent development and asymmetry of visual projections. *Neurosci Lett*, **121**:63-67.
- Rogers L.J., Krebs G.A. (1996) Exposure to different wavelengths of light and the development of structural and functional asymmetries in the chicken. *Behav Brain Res* **6**, **80**:65-73.
- Romero P., Obradovic Z., Li X., Garner E.C., Brown C.J., Dunker A.K. (2001) Sequence complexity of disordered protein, *Proteins* **42**:38-48.
- Rosato E., Codd V., Mazzotta G., Piccin A., Zordan M., Costa R., Kyriacou C.P. (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology* **11**:909-917
- Rosenfeld R., Vajda S., De Lisi C. (1995) Flexible docking and design, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**:677-700.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Sancar A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**:2-9.
- Sancar A. (2003) Structure and Function of DNA Photolyase und Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors *Chem. Rev.* **103**:2203-2337.
- Sang Y., Li Q.H., Rubio V., Zhang Y.C., Mao J., Deng X.W., Yang H.Q. (2005) N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell* **17**:1569–1584.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

- Schneider T., Thalau H.-P., Semm P., Wiltschko W. (1994) Melatonin is crucial for the migratory orientation of pied flycatchers *Ficedula hypoleuca pallas*. J. Exp. Biol. **194**: 255-262.
- Schroth W. (2000) Phylogeographie, Artbildung und Biomarker zum Umweltmonitoring bei der Ohrenqualle *Aurelia sp.* Dissertation J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Schulten K., Windemuth A. (1986) Model for a physiological magnetic compass. In: Maret G., Boccara N., Kiepenheuer J. (Eds): Biophysical effects of steady magnetic fields. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp:99-106.
- Semm P., Beason R.C. (1990) Responses to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. Brain Res. Bull. **25**:735-740.
- Semm P., Demaine C. (1986) Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. J. Comp. Physiol. A **159**:619-625.
- Semm P., Nohr D., Demaine C., Wiltschko W. (1984) Neural basis of the magnetic compass: interaction of visual, magnetic and vestibular inputs in the pigeons brain. J. Comp. Physiol. A **155**:283-288.
- Shcherbakov V. P., Winklhofer M. (1999) The osmotic magnetometer: a new model for magnetite-based magnetoreceptors in animals. Europ. Biophys. J. **28**:380-392.
- Shoemaker B.A., Portman J.J., Wolynes P.G. (2000) Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**:8868-73.
- Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acid Res. **23**:1087-1088.
- Skiles D.D. (1985) The geomagnetic field: its nature, history, and biological relevance. In: Kirschvink J.L., Jones D.S., MacFadden B.J. (Eds.): Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms. Plenum Press, New York, London.
- Spolar R.S., Record M.T. Jr. (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. Science **263**:777-84.
- Tamada T., Kitadokoro K., Higuchi Y., Inaka K., Yasui A., de Ruiter P.E., Eker A.P., Miki K. (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. Nat. Struct. Biol.: **4**:887-91.
- Thalau P., Ritz T., Stapput K., Wiltschko R., Wiltschko W. (2005) Magnetic compass orientation of migratory birds in the presence of a 1.315 MHz oscillating field. Naturwissenschaften **92**:86-90.
- Thalau P., Ritz T., Burda H., Wegner R., Wiltschko R (2006) The magnetic compass mechanisms of birds and rodents are based on different physical principles. J. R. Soc. Interface **3**: 583-587.
- Todo T., Ryo H., Yamamoto H., Toh H., Inui T., Ayaki T., Nomura T., Ikenaga M. (1996) Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. Science **272**:109-112.
- Tomancak P., Beaton A., Weiszmam R., Kwan E., Shu S.Q., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Hartenstein V., Celniker S.E., Rubin G.M. (2002) Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. Genome Biology **3**:0088.1-0088.14

- Tommasi L., Vallortigara G. (2001) Encoding of geometric and landmark information in the left and right hemispheres of the avian brain. *Behav. Neurosci.* **115**:602-613.
- Ulrich C. (1999) Left-hemispheric superiority for visuospatial orientation in homing pigeons. *Behav. Brain Res.* **104**:169-178.
- Vallortigara G., Regolin L., Bortolomiol G., Tommasi L. (1996) Lateral asymmetries due to Preferences in eye use during visual discrimination learning in chicks. *Behav. Brain Res.* **74**:135-143.
- van der Spek P.J., Kobayashi K., Bootsma D., Takao M., Eker A.P., Yasui A. (1996) Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* **37**:177-182.
- Van Gelder R.N., Wee R., Lee J.A., Tu D.C. (2003) Reduced Pupillary Light Responses in Mice Lacking Cryptochromes. *Science* **299**:222.
- Vihinen M., Torkkila E., Riikonen P. (1994) Accuracy of protein flexibility predictions, *Proteins* **19**:141-9.
- Vorobyev M, Osorio D. (1998) Vorobyev M, Osorio D: Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **265**:351-359.
- Walcott C.F., Gould J.L., Kirschvink J.L. (1979) Pigeons have magnets. *Science* **205**:1027-1029.
- Walker M.M., Diebel C.E., Haugh C.V., Pankhurst P.M., Montgomery J.C., Green C.R. (1997) Structure and Function of the Vertebrate Magnetic Sense. *Nature* **390**:371-376.
- Wang H., Ma L.G., Li J.M., Zhao H.Y., Deng X.W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* **294**:154-158.
- Wässle H., Peichl L., Airaksinen M.S., Meyer M. (1998) Calcium-binding proteins in the retina of a calbindin-null mutant mouse. *Cell Tissue Res.* **292**: 211-218.
- Weaver J., Vaughan T., Astumian D. (2000) Biological sensing of small field differences by magnetically sensitive chemical reactions. *Nature* **405**:707-709.
- Weindler P., Baumetz M., Wiltschko W. (1997) The direction of celestial rotation influences the development of stellar orientation in young Garden Warblers. *J. Exp. Biol.* **200**:2107-2113.
- Weindler P., Böhme F., Liepa V., Wiltschko W. (1998) The role of daytime cues in the development of magnetic orientation in a night-migrating bird. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **42**:289-294.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1981) The development of sun compass orientation in young homing pigeons. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **9**:135-141.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1995) *Magnetic orientation in animals*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1999) Das Orientierungssystem der Vögel I. Kompassmechanismen. *J. Ornithol.* **140**:1-40.
- Wiltschko W. (1968): Über den Einfluß statischer Magnetfelder auf die Zugorientierung der Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*). *Z. Tierpsychol.* **25**: 537-558.

- Wiltschko W. (1976): Relative importance of stars and magnetic field for the accuracy of orientation in night-migrating birds. *Oikos* **30**:195-206
- Wiltschko W., Gesson M., Stapput K., Wiltschko R. (2004): Light-dependent magnetoreception in birds: interaction of at least two different receptors. *Naturwissenschaften* **91**:130-134.
- Wiltschko W., Gwinner E. (1974) Evidence for an innate magnetic compass in Garden Warblers. *Naturwissenschaften* **61**:406.
- Wiltschko W., Munro U., Ford H., Wiltschko R. (2003) Lateralisation of magnetic compass orientation in silvereyes, *Zosterops lateralis*. *Austr. J. Zool.* **51**:597-602.
- Wiltschko W., Munro U., Ford H., Wiltschko, R. (1993) Magnetic inclination compass: A basis for the migratory orientation of birds in the northern and southern hemisphere. *Experientia* **49**:167-170.
- Wiltschko W., Traudt J. Güntürkün O., Prior H., Wiltschko R. (2002): Lateralization of magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* **419**:467-470.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2001) Light dependent magnetoreception in birds: the behavior of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths. *J. Exp. Biol.* **204**:3295-3302.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1972) Magnetic compass of European Robins. *Science* **176**:62-64.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1975) The interaction of stars and magnetic field in the orientation system of night migrating birds. II. Spring experiments with European Robins. *Z. Tierpsychol.* **39**:265-282.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1978) Relative importance of stars and the magnetic field for the accuracy of orientation in night-migrating birds. *Oikos* **30**:195-206.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1988) Magnetic orientation in birds. In: Johnston, R.F. (Ed.): *Current Ornitholog.* Vol. 5, Plenum Press, New York, London, pp:67-121.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1995) Migratory orientation of European Robins is affected by the wavelength of light as well as by a magnetic pulse. *J. Comp. Physiol. A* **177**:363-369.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2001) Light dependent magnetoreception in birds: the behavior of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths *J. Exp. Biol.* **204**:3295-3302.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2002) Magnetic compass orientation on birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften* **89**:445-452.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2006) Magnetoreception. *BioEssays* **28**:157-168.
- Wiltschko W., Wiltschko R., Munro U., Ford H. (1998) Magnetic versus celestial cues: cue conflict with migrating silvereyes at dusk. *J. Comp. Physiol. A* **182**:521-529.
- Yang H.Q., Tang R.H., Cashmore, A.R. (2001) The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* **13**:2573-2587.
- Yang H.Q., Wu Y.J., Tang R.H., Liu D., Liu Y., Cashmore A.R. (2000) The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* **103**:815-827.

Yorke E.D. (1979) A possible magnetic transducer in birds. *J. Theor. Biol.* **77**:101-10.

Zhao S., Sancar A. (1997) Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serin/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem Photobiol* **66**:727-731.

Zhu H., Green C.B. (2001) Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. *Mol Vis* **7**:210-215.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Modell zur Zugorientierung	2
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des Magnetfelds der Erde	3
Abb. 1.3:	Reaktionsschema des Radikalpaarmechanismus	6
Abb. 1.4:	In Abhängigkeit vom Erdmagnetfeld durch Radikalpaarprozesse möglicherweise generierte Erregungsmuster.	7
Abb. 1.5:	Orientierungsverhalten von vier Vogelarten unter monochromatischen Lichtern unterschiedlicher Wellenlänge	8
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der 3' und 5' RACE-PCR des <i>Erithacus</i> cDNA- Pools mittels genspezifischer Primer am5 und am6.	13
Abb. 2.2:	Rotkehlchen (<i>Erithacus rubecula</i>).....	15
Abb. 2.3:	Brutareal des Rotkehlchens <i>Erithacus rubecula</i>	15
Abb. 2.4:	Rotkehlchen im Tierhaus des Biologiecampus der J. W. Goethe-Univ.	17
Abb. 2.5:	Prinzip der 3' und 5' RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>).....	25
Abb. 2.6:	Alignment der C-terminalen Aminosäuren der retinalen Cryptochrom-Proteine von Huhn (<i>Gallus gallus</i>) und Rotkehlchen (<i>Erithacus rubecula</i>) beginnend von der letzten gemeinsamen Aminosäure.....	29
Abb. 2.7:	Agarose-Gelbild einer PCR unter Verwendung der Primer am5 (<i>Erithacus</i> Cry forward) und am6 (<i>Erithacus</i> Cry reverse) auf genomischer DNA und cDNA der linken Retina	30
Abb. 2.8:	In der Retina des Rotkehlchens sind zwei Arten von Cryptochrom 1 zu finden: eCRY1a und eCRY1b.....	31
Abb. 2.9:	Schematische Darstellung der Entstehung der unterschiedliche eCRY1- Varianten eCRY1a und eCRY1b durch alternatives Spleißen nach den letzten gemeinsamen Aminosäuren.....	32
Abb. 2.10:	Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b in Anlehnung an die Kristallstruktur der DNA-Photolyase von <i>Anacystis nidulans</i>	33
Abb. 2.11:	Proteinmodell für eCRY1a und eCRY1b ohne (a) und mit Oberflächenmodellierung Gitterstruktur (b) und Oberflächenmodellierung geschlossen (c).....	35
Abb. 2.12:	eCRY1a- und eCRY1b-Ergebnisgraphen der <i>Dense Alignment Surface</i> <i>Methode</i>	36
Abb. 2.13:	Ergebnis des <i>Transmembrane Prediction Server</i> -Tests für das eCRY1b- Protein und das membranständige Cyclooxygenase 3 (COX-3) Protein im Vergleich.	37
Abb. 2.14:	Domänen-Organisation der Photolyase/Cryptochrom-Familie.	39

Abb. 2.15:	Modell der lichtabhängigen Konformationsänderung in der Funktion von <i>Arabidopsis</i> -Cryptochrom 1 (<i>atCRY1</i>).	41
Abb. 2.16:	Intramolekulares Aktivierungs-Modell für Cryptochrom	42
Abb. 2.17:	Sekundärstruktur-Alignment unterschiedlicher Cryptochrom C-Termini.	44
Abb. 3.1:	Zeitliches Expressionsmuster der Cryptochrome eCRY1a und eCRY1b in der Retina von <i>Erithacus rubecula</i> relativ zu <i>Erithacus</i> -Actin.	55
Abb. 4.1:	Schematische Darstellung der verwendeten mRNA-Sonden zum Nachweis von eCRY1a und eCRY1b im Zellverband der Rotkehlchenretina	63
Abb. 4.2:	Funktionsweise einer DIG-markierten mRNA Sonde am Beispiel des Expressionsmusters des <i>ftz</i> -Gens bei <i>Drosophila</i>	64
Abb. 4.3:	Transkriptionsvektor mit kloniertem DNA-Insert.	68
Abb. 4.4:	Schnitt durch die Retina von <i>Erithacus rubecula</i> um 17:30 Uhr (CET).....	75
Abb. 4.5:	Retinale Photorezeptoren bei Aves	76
Abb. 4.6:	eCRY1a- und eCRY1b-mRNA Expression in der <i>Erithacus</i> -Retina um 11:00 Uhr (CET).....	77
Abb. 4.7:	eCRY1a- und eCRY1b-mRNA Expression in der <i>Erithacus</i> -Retina um 17:30 Uhr (CET).....	78
Abb. 4.8:	Detailvergleich der eCRY1b-mRNA Expression in den Photorezeptoren von <i>Erithacus r.</i> um 11:00 Uhr und um 17:30 Uhr (CET).....	79
Abb. 4.9:	Lokalisation von eCRY1b-mRNA (A) und Protein (B) um 11 Uhr (CET) in der Retina von <i>Erithacus rubecula</i> im Vergleich.	80
Abb. 4.10:	Lokalisation von eCRY1b-mRNA (A) und Protein (B) um 17:30 (CET) in der Retina von <i>Erithacus rubecula</i> im Vergleich	81
Abb. 4.11:	Modell der Dualität innerhalb der molekularen, histologischen und anatomischen Eigenschaften der visuellen und circadianen photosensorischen Systeme.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: PCR-Reaktionsansatz (a) und Zyklus Parameter (b) für eine in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Bakterien-PCR.	23
Tabelle 2.2: Degenerierte Primersets für CRY 1 und CRY 2 für die First-Round PCR genomischer DNA.....	24
Tabelle 2.3: Primersets zur Verwendung bei 5' und 3' RACE-PCR auf retinaler <i>Erithacus</i> -cDNA.....	25
Tabelle 2.4: <i>Hot Start</i> PCR-Reaktionsansatz für Vollängen-Amplifikation der zwei Cryptochrom 1-Spleißvarianten eCRY1a und eCRY1b	26
Tabelle 2.5: Primäre- und Nested Primersets zur Verwendung bei <i>Genome Walk</i> auf <i>Erithacus</i> -DNA	27
Tabelle 2.6: Biochemische Parameter der eCRY1 und eCRY2-Proteine (ermittelt mit Hilfe von <i>ProtParam</i>).....	32
Tabelle 3.1: In der quantitativen RT-PCR eingesetzte Primersets für eCRY1a (A), eCRY1b (B) und eAktin (C).....	51
Tabelle 3.2: Standard-Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR.....	52
Tabelle 3.3: Transkriptmengen von eCRY1a und eCRY1b (relativ zu eAktin) in rechter und linker Retina im Tagesverlauf in den jeweils untersuchten Zugpopulationen. ...	54
Tabelle 4.1: Sondenprimer für eCRY1a und eCRY1b (jeweils forward und reverse).....	67
Tabelle 4.2: PCR-Reaktionsansatz für mRNA-Sondenvorlagen eCRY1a und eCRY1b.	67
Tabelle 4.3: Reaktionsansatz zur Herstellung der DIG-Sonden eCRY1a und eCRY1b.....	69
Tabelle 4.4: Information zu den ausgewählten spezifischen Aminosäuren des Peptidantikörpers eCRY1b	71

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Wiltschko danke ich sehr herzlich für seine Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft sowie für seine Begeisterung und Aufgeschlossenheit gegenüber diesem Projekt, dessen Ausgang oftmals höchst ungewiss war. Seine unvergleichliche Offenheit gegenüber neuen Ideen und Ansätzen und die damit verbundene Gewährung grosser wissenschaftlicher Freiräume, insbesondere bei der Wahl unterschiedlichster Arbeitstechniken, möchte ich besonders anerkennen. Ebenso gilt mein Dank seinem Einsatz bei der Vermittlung von Kooperations- und Gesprächspartnern weltweit.

Meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Leo Peichl am Max-Planck-Institut für Hirnforschung möchte ich sehr herzlich für die Einführung in die Retinapräparation, die wertvolle Hilfe bei der Diskussion der mRNA- und Antikörperergebnisse und die intensive Betreuung in der Anfangsphase des Projektes danken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Bernd Schierwater für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Arbeitsplatzes im Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, für die Gewährung materieller Freiräume und die Realisierung des Forschungsaufenthaltes an der Yale University.

Ich danke Dipl.-Biol. Sven Sagasser, der mich erfolgreich in die Arbeitstechniken der Molekulargenetik und Proteinbiochemie eingewiesen hat. Für die fruchtbare Zusammenarbeit in allen Teilen dieser Arbeit, seine Geduld, seinen Kampfgeist und steten Glauben an mich und das Projekt bin ich ihm sehr dankbar.

I gratefully acknowledge generous laboratory support from Prof. Dr. Stephen L. Dellaporta and Dr. Maria A. Moreno of Yale University (New Haven, USA) during the first months of this study. Thank you for valuable discussions and especially for your patience handling unpleasant encounters with officers of the U.S. Department of Agriculture during the time of my unintentional stay with the Animal & Plant Health Inspection Service at Philadelphia Airport.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Gisela Eppe in Philadelphia bedanken, die, wohlgermerkt ohne mich zu kennen, beim Quarantäneoffizier für mich gebürgt und mir damit weitere Nächte mit jamaikanischen Drogenschmugglern erspart hat. Für all ihre unkomplizierte Hilfe und Unterstützung, ihr großzügiges Übernachtungsangebot inkl. gutem Rotwein, sowie die tägliche Trockeneisration zur Rettung der Retinaprobe bin ich überaus dankbar.

Dr. Dorothea Schulte am Max-Planck-Institut für Hirnforschung danke ich für die Kooperation und Betreuung, sowie die unkomplizierte Bereitstellung eines wissenschaftlichen Arbeitsplatzes während meiner Arbeit an den retinalen mRNA *in-situ* Hybridisierungen.

PD Dr. Gerta Fleissner danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der mRNA *in-situ* Hybridisierungsdaten.

Prof. Dr. Henrik Mouritsen und der Arbeitsgruppe *Animal Navigation* an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der immunohistochemischen Untersuchungen. Henrik, mange tak! In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dipl.-Biol. Miriam Liedvogel für die herzliche Aufnahme und die unentgeltliche Bereitstellung ihrer Wohnung danken. Ich freue mich, dass aus der anfänglich nicht immer konfliktfreien fachlichen Konkurrenzsituation unserer beiden Arbeitsgruppen eine freundschaftliche Zusammenarbeit entstanden ist.

Prof. Dr. Jürgen Rullkötter, Prof. Dr. Silke Rinkwitz und Dr. Thorsten Hadrys danke ich für ihre herzliche „inoffizielle“ Betreuung während meiner Zeit in Oldenburg.

Prof. Dr. Harald Schwalbe und Dipl.-Chem. Boris Fürtig danke ich für die wertvollen Anmerkungen zu meiner Diskussion im proteinbiochemischen Teil dieser Arbeit und für die Hilfe bei der Erstellung des Proteinmodells. Prof. Dr. Harald Schwalbe, meinem Studienstiftungsbetreuer an der Universität Frankfurt, möchte ich darüber hinaus sehr herzlich für seine Aufgeschlossenheit und das Interesse an dieser Arbeit sowie die vielen Gespräche und wertvollen Ratschläge danken.

Christine Nießner danke ich für die Bereitstellung des Retinaschnittes in Abbildung 4.4.

Ich bedanke mich beim ITZ-Team an der TiHo Hannover für ihre Unterstützung. I especially would like to acknowledge technical and - more important - huge moral support from Dr. Allen Collins & Jennifer Collins with Brevan Wolf. Thank you so much for a wonderful time in Hannover and a great friendship to last!

Auch bei meinen Kollegen und Kolleginnen des Arbeitskreises Physiologie und Ökologie des Verhaltens möchte ich mich für ihre Unterstützung während der Dissertation bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Katrin Stapput und Dr. Peter Thalau für ihre geduldige Assistenz während der schwierigen Rotkehlchenretinapräparationen.

Für die kritische Durchsicht einiger Kapitel dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Katrin Stapput, Dipl.-Biol. Claudia Detje, Dipl.-Umweltwiss. Regina Wegner, Dipl.-Biol. Jessica Scheider und Dr. Martin Glösmann.

Prof. Dr. Jürgen Mayer und allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Biologiedidaktik der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich sehr herzlich für das Entgegenkommen und Verständnis während der letzten Phase meiner Doktorarbeit.

Liebe Eltern, liebe Schwester, liebe Familie, liebe Ufrings, liebe Freunde nah und fern: Für Eure stete Unterstützung während dieser Doktorarbeit, für Eure unendliche Geduld und Toleranz sowie Euren unerschütterlichen Glauben an mich und meine Fähigkeiten möchte ich Euch von ganzem Herzen danken.

Für ihre unendliche motivierende Unterstützung während der durch die Doppelbelastung nicht ganz einfachen Phase der schriftlichen Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich insbesondere bei Anja, Mareen, Klaus, Dagmar, Katrin, Regina, Stephan, Ursi, Joachim und Oliver bedanken. Oliver bin ich darüber hinaus für sein Verständnis und seine Rücksichtnahme während dieser Zeit sehr dankbar.

Bei Klaus möchte ich mich nicht zuletzt ganz herzlich für die große Hilfe bei Erstellung und Layout des Gesamtdokuments und damit für die mutige Konfrontation mit meinem Perfektionismus bedanken („*Your Success is Our Goal*“ came true!).

Diese Arbeit wurde finanziell durch ein Doktorandenstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert. Mein Stipendium hat mir durch finanzielle Unabhängigkeit die Gastaufenthalte in kooperierenden Laboratorien und damit die methodische Vielfalt dieser Arbeit erst ermöglicht. Ich bin der Stiftung dafür sehr dankbar.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (an W. Wiltschko sowie B. Schierwater) und dem Human Frontier Science Program (an B. Schierwater) realisiert.

Darüber hinaus möchte ich mich für die Teilfinanzierung von Forschungsaufenthalten und Kongressen bei folgende Organisationen und Initiativen bedanken:

- Aventis [i]lab award
- Hermann Willkomm-Stiftung
- Programm Hochschule-Wissenschaft des Landes Hessen (HWP)
- Freunde und Förderer der J. W. Goethe-Universität

Anhang

PROBENLISTE											
Proben Nr.	Datum	Uhrzeit (Tötungszeitpunkt)	Rortekischen Nr. (Ringnummer)	Preparation (Hinweis: KE7A/KE100mg/ml (Carmelisin/Bayer) Wirkstoff: Retamnyl/Retacalcid)	Auge	Handling	Aufbewahrt in	Geplante Verwendung	Verarbeitung	Lagerung	Bemerkung
1a	26.03.2002 3 RKs, Juvenil, gefangen im Herbst 2001, alle aktiv in Versuchen Herbst 01/FJ_02	17:30	25	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
1b		17:30	25	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
2a		22:30	26	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
2b		22:30	26	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
3a		3:30	36	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
3b		3:30	36	0,5ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Yale	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
4a	03.04.2002 3 RKs, Juvenil, gefangen im Herbst 2001, alle aktiv in Versuchen Herbst 01/FJ_02	11:00	12	0,4ml Ketavet	RE	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
4b		11:00	12	0,4ml Ketavet	LI	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
5a		13:00	17	0,4ml Ketavet	RE	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
5b		13:00	17	0,4ml Ketavet	LI	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
6a		14:00	18	0,4ml Ketavet	RE	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
6b		14:00	18	0,4ml Ketavet	LI	Retina Prep as Wholemount in Vogel-PBS; Entfernung PigmentEpithel w/ Dispase 1 (Roche) for approx. 15 Min.; Fix in 4% PFA in Vogel PBS for approx. 20h; Fixativ auswaschen for 15 Min.; Methanol-Reihe 25%/50%/75%/100%; store in 100% Methanol at -20°C	100% Methanol -20°C	for whole mount in-situ	noch nicht	MPI Peichl -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
7a	31.03.2003 8 RKs, Juvenil, gefangen im Herbst 2002, alle aktiv in Versuchen Herbst 02/FJ_03	12:00 (wg. Sommerzeit alle Uhrzeiten um eine Stunde nach hinten verschoben)	45	0,4ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	
7b		12:00	45	0,4ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -21°C	

PROBENLISTE											
Proben Nr.	Datum	Uhrzeit (Tönungzeitpunkt)	Rotkehlchen Nr. (Ringnummer)	Preparation <i>Hinweis: KE/AVET 100mg/ml (Curamed/Bayer) Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid</i>	Auge	Handling	Aufbewahrt in	Geplante Verwendung	Verarbeitung	Lagerung	Bemerkung
8a		12:00	12	0,4ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -21°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
8b		12:00	12	0,4ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -21°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
9a		18:30	21	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff
9b		18:30	21	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff
10a		18:30	42	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
10b		18:30	42	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
11a		23:30	40	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff
11b		23:30	40	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff
12a		23:30	35	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
12b		23:30	35	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	Retina-WholemountPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB for 20 Min (at RT); Fixativ in PB auswaschen for 30 Min., Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
13a		04:30	32	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff
13b		04:30	32	0,4ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep -> Hannover	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thalau -> in fl. Stickstoff

PROBENLISTE											
Proben Nr.	Datum	Uhrzeit (Tötungszeitpunkt)	Rotkehlchen Nr. (Ringnummer)	Preparation <i>Hintweis: KE/AVET/100mg/ml (Curamed/Bayer)</i> <i>Wirkstoff: Kaliumhydroxid</i>	Auge	Handling	Aufbewahrt in	Geplante Verwendung	Verarbeitung	Lagerung	Bemerkung
14a		04:30	6	0,4ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	RE	Retina-WholemoutPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB für 20 Min (at RT). Fixativ in PB auswaschen für 30 Min. Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Sucrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
14b		04:30	6	0,4ml Ketavet in volliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe ca. 721 mW/m²)	LI	Retina-WholemoutPrep - Glaskörper entfernt, Retina wird geteilt. Eine Hälfte (ohne Pektin) für mRNA in-situ, fix in 4% PFA, stored at +4°C. Zweite Hälfte Prep für AK-Fix in 4% PFA in PB für 20 Min (at RT). Fixativ in PB auswaschen für 30 Min. Überführen in Falcon Tube mit 30% sterile Sucrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for mRNA in-situ and Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	MPI -20°C / Oldenburg -20°C	Juli 2003 aufgetaut auf ca. +2°C -> 2 Tage?
15a	01.03.2004 1 RK durch Unfall - Notfallprep /fluvonil, gefangen im Herbst 2003, aktiv in Versuchen Herbst 03/FJ, 04	ca. 12:00	?	Tod durch Unfall, Retinaprep bei Tageslicht	RE	Retina Prep as Wholemout in PB, Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen für 30 Min., Überführen in sterile Sucrose-Reihe 10%-20%-30% im Falcon Tube (30% Sucrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Strek -20°C / Oldenburg -21°C	
15b		ca. 12:00	?	Tod durch Unfall, Retinaprep bei Tageslicht	LI	Retina Prep as Wholemout in PB, Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen für 30 Min., Überführen in sterile Sucrose-Reihe 10%-20%-30% im Falcon Tube (30% Sucrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Strek -20°C / Oldenburg -22°C	
16a	02.03.2004 9 RKS, juvenil, gefangen im Herbst 2003, alle aktiv in Versuchen Herbst 03/FJ, 04	12:00 (wg. Sommerzeit alle Uhrzeiten um eine Stunde nach hinten verschoben)	31	0,9ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün
16b		12:00	31	0,9ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün
17a		12:00	46	0,85ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün
17b		12:00	46	0,85ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün
18a		12:00	8	0,95ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün
18b		12:00	8	0,95ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hammer - Auffüllen der Statistik auf 4 Vögel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hannover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineals durch P. Thailau -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntürkün

PROBENLISTE											
Proben Nr.	Datum	Uhrzeit (Tötungzeitpunkt)	Rotkehlchen Nr. (Ringnummer)	Preparation: <i>Hinzus.: KE/A/E/10mg/ml (Charned/Boyer) Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid</i>	Auge	Handling	Aufbewahrt in	Geplante Verwendung	Verarbeitung	Lagerung	Bemerkung
18a		18:30	24	1,0ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 4 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
18b		18:30	24	1,0ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 4 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
20a		18:30	12	1,0ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 4 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
20b		18:30	12	1,0ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 4 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
21a		18:30	34	0,45ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen for 30 Min.; Überführen in sterile Succrose-Reihe 10% -> 20% -> 30% im Falcon Tube (30%); Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken; store at +4°C overnight, next day; Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Streit - 20°C / Oldenburg -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
21b		18:30	34	0,45ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen for 30 Min.; Überführen in sterile Succrose-Reihe 10% -> 20% -> 30% im Falcon Tube (30%); Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken; store at +4°C overnight, next day; Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Streit - 20°C / Oldenburg -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
22a		18:30	5	0,75ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen for 30 Min.; Überführen in sterile Succrose-Reihe 10% -> 20% -> 30% im Falcon Tube (30%); Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken; store at +4°C overnight, next day; Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Streit - 20°C / Oldenburg -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
22b		18:30	5	0,75ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix in 4% PFA in PB for 1h; Fixativ in PB auswaschen for 30 Min.; Überführen in sterile Succrose-Reihe 10% -> 20% -> 30% im Falcon Tube (30%); Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken; store at +4°C overnight, next day; Überführung der Tubes in -20°C	-20°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	AK Streit - 20°C / Oldenburg -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
23a		23:30	49	0,6ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 3 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -20°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
23b		23:30	49	0,6ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 3 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -21°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
24a		04:30	48	0,6ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	RE	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 3 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -22°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken
24b		04:30	48	0,6ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Phillips Photolampe)	LI	in fl. Stickstoff	-80°C	for cDNA Prep >Hamover - Auffüllen der Statistik auf 3 Vogel	RNA/DNA/Protein; cDNA	Hamover -80°C / -23°C	gleichzeitige Entnahme des Pineaals durch P. Thalaun -> in fl. Stickstoff; Entnahme Ober- und Unterschmelabel zum Verbleib bei G. Fleissner; Entnahme Gehirn zum Verbleib bei O. Güntertkürken

PROBENLISTE											
Proben Nr.	Datum	Uhrzeit (Tötungszeitpunkt)	Rotkehlchen Nr. (Ringnummer)	Preparation Hitzesiz: RETAVET (0,0mg/ml) Wirkstoff: Retamnitrochlorid	Auge	Handling	Aufbewahrt in	Geplante Verwendung	Verarbeitung	Lagerung	Bemerkung
25a	11.04.2005 3 RKs, juvenil, gefangen im Herbst 2004, alle aktiv in Versuchen Herbst (MFEJ_05)	18:30 (wg. Sommerzeit alle Uhrzeiten um eine Stunde nach hinten verschoben)	6	0,7ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
25b		18:30	6	0,7ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
26a		18:30	8	0,3ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: in 2% PFA+0,2% GA in Cacodylatpuffer für 2h at RT, Wash 3x 10min in Cacodylatpuffer, store in Cacodylatpuffer mit 0,05% NON3 NatriumAzid at +4°C	+4°C	for EM-Immuno	noch nicht	AK Fleissner +4°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
26b		18:30	8	0,3ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: in 2% PFA+0,2% GA in Cacodylatpuffer, store in Cacodylatpuffer mit 0,05% NON3 NatriumAzid at +4°C	+4°C	for EM-Feinstruktur	noch nicht	AK Fleissner +4°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
27a		23:30	30	1,0 ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
27b		23:30	30	1,0 ml Ketavet in völliger Dunkelheit, Retinaprep unter Rotlicht (Philips Photolampe)	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
28a	12.04.2005 s.o.	12:00	22	0,65ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	RE	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C
28b		12:00	22	0,65ml Ketavet, Retinaprep bei Tageslicht	LI	Retina Prep as Wholemount in PB; Fix: 2x 10 Min in 2% PFA, Fixativ in PBS auswaschen 3x 10 Min, Überführen in sterile Succrose-Reihe (Kryoprotektion) 10% → 20% → 30% im Falcon Tube (30% Succrose in PB+0,05% NON3 NatriumAzid) - Wechsel jeweils wenn Retina abgesunken, store at +4°C overnight, next day Überführung in Tissue-Tek Blöcke store at -80°C	-80°C	for Immunohisto with Antibody	Kryoschnitte 14µm auf Superfrost Objektträger	Oldenburg -20°C	Oberschnabelentnahme für G. Fleissner; Prep Schabel: 10 Min, Pratik in 0,5% GA (Glutaaldehyd) in PBS+2mM MgCl2 → Schabel 1+2 weiter Fix für EM, 4% GA in PB 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C → Schabel 3+4 weiter Fix für immuno-EM, 2% PFA+0,2% GA, 4h at RT, Wash 3x in PB, store in PB at +4°C

eCRY1a: Total cds mit 3' UTR

Gesamtlänge: 2382 bp (bzw. 1860 bp bis Stop-Codon)

GeneBank Accession-Nr.: AY 58 57 16

geklont in: Klon pAM23 in pGEM[®]-T easy (Promega) oder alternativ pAM8 und pAM6
beide in pCR[®]4-TOPO[®] und pAM11 in pCR[®]II-TOPO[®] (alle Invitrogen)

- a) Sequenz
- b) Spezifische Primer eCRY1a
- c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY1a

a) Sequenz¹

```

1  ATGGGGGTGA ACGCCGTGCA CTGGTTCCGC AAGGGGCTGC GGCTCCACGA CAACCCGGCG CTGCGGGAAT
   >>...am 14...>>

71  GCATCAGGGG CGCCGACACG GTGCGCTGCG TCTACATCCT GGACCCCTGG TTCGCCGGCT CCTCCAACGT

141  GGGCATCAAC AGGTGGCGAT TCCTGCTTCA GTGTCTTGAA GATCTTGATG CCAATCTACG GAAACTGAAC

211  TCACGCTTGT TTGTTATCCG TGGACAGCCA GCAGATGTTT TCCCAGGCT TTTTAAGGAA TGGAACATTG
     HindIII
     -----
281  CAAAGCTTTC TATTGAATAT GATTCTGAAC CATTGGGAA GGAGAGAGAT GCAGCCATCA AGAAGCTGGC

351  CAGTGAAGCT GGAGTGGAGG TCATTGTTTC GATTTCTCAT ACATGTATG ACCTAGACAA AATCATAGAA

421  TTAAATGGGG GACAGCCTCC TCTTACTTAC AAGCGATTCC AGACCCTAAT TAGTAGAATG GAACCCCTGG

491  AGATGCCTGT GGAGACTATA ACCCCAGAAG TAATGAAGAA ATGTACTACT CCAGTCTTCG ATGACCATGA

561  TGAGAAATAC GGTGTGCCAT CACTTGAAGA GCTGGGCTTT GACACAGATG GTCTGCCTTC TGCAATATGG

631  CCAGGGGGAG AACTGAAGC TCTCACACGC TTAGAAAGAC ATTTAGAACG AAAGGCTTCG GTAGCAAAC

701  TTGAAAGACC ACGGATGAAT GCAAATTCCT TTCTGGCAAG CCCTACGGGG CTTAGTCCTT ACCTCCGCTT

771  CGGCTGTCTG TCCTGCCGGC TCTTTTATTT CAAGTTAAGC GATCTGTACA AAAAGGTAAA AAAGAACAGC

```

¹ *Forward Primer* (F) sind in der Sequenz gelb, *Reverse Primer* (R) grün und Restriktionsenzyme violett gekennzeichnet. Rot kennzeichnet das Stop-Codon.

841 TCCCCTCCCC TCTCCCTCTA TGGCCAGCTG TTATGGCGTG AATTTTCTA CACAGCGGCG ACTAACAATC

SacII NcoI

 911 CCGCGTTTGA TAAATGGAG GGAATCCTA TCTGTGTTCA AATCCATGG GATAAGAATC CTGAGGCTTT

981 GGCCAAATGG GCAGAAGGCA GGACAGGTTT TCCTTGATT GATGCAATTA TGACACAAC TCGTCAGGAA

XhoI

 AvaI

 1051 GGTTGGATTC ACCATTTAGC CCGGCATGCT GTCGCATGCT TTTTGACTCG AGGTGACCTC TGGATTAGCT
 >>.....am 1.....>

1121 GGAAGAAGG AATGAAGTC TTTGAAGAGC TGTTACTTGA TGCAGATTGG AGTGTGAATG CTGGAAGCTG
 >>.....am 5.....>
 >.....am 1.....>

1191 GATGTGGCTG TCCTGTAGTT CCTTCTTCA ACAGTTTTTC CACTGCTACT GCCCAGTGGG TTTTGGCAGA

ScaI

 1261 AGAACTGACC CAAATGGGA TTATATCAGA CGGTATTTGC CAGTACTCAG AGGTTTCCT GCAAAAACA
 <<.....am 1064.....<<
 >>.....am 1061.....>>

1331 TCTATGATCC TTGGAATGCC CAGAGAGCA TCCAGAAGGC TGCAAAATGT ATTATAGGAG TTAATTATCC
 <<.....am 6.....<<
 <<.....am 2.....<<

1401 CAAACCAATG GTAACCATG CAGAGGCAAG CCGTCTGAAT ATTGAAAGGA TGAAACAGAT CTACCAGCAG
 <.....am 2.....<<

1471 CTTTCACGAT ACAGAGGACT GGGTCTTCTT GCAACTGTGC CTTCTAATCC AAATGGAAAT GGAAATGGTG

SacI

 1541 GCCTAATGGG CTATTCACCA GGAGAAAGCA TTTCTGGTTG TGGTAGTACA GGAGGAGCTC AGCTGGGAAC

EcoRI

 1611 TGGTGATGGT CATACTGTTG TTCAGTCATG TACCCTGGGA GACTCTCATT CAGGAACAAG TGGAATTCAG

1681 CAGCAAGGTT ACTGTCAAGC AGGTAGTATC TTACTATG CTCATGGAGA CAATCAGCAA TCACACTTAT
 <<.....am 13.....<<
 >>.....am 22.....>>
 >>.....am 16.....>>

1751 TGCAAGCAGG AAGAACGGCC CTTGGTACTG GCATTAGTGC AGGAAACGC CCAATCCAG AAGAAGAAC
 <<.....am 12.....<<
 >>.....am 7.....>>
 <.....<<

1821 TCAGAGCGTT GGACCAAAAG TCCAGCGACA GAGCACAAAT TAAACTGCTT GATGGAAGA GAAGTTTGCC
 << am 17 <<
 << am 23 <<

1891 ACTCAAAGAA CACATGGGAC AAAATTCCTG CTA CTACTCTGTT TGGAGCTAAA GTGTGTGAG AGTTCATGTT

1961 CTAAAATTAC ATAATTTTTC ATAAATTATT TTCAATTGTT CTCAGTTGTT GTAAACAAGT CCAATTTTTC

2031 GAATGCATTA TTTCTAACTG GCATTTCTAT GGTTTTTAAC TTTTAAATGA CTCTTTCACA AAGGGCAAAT

2101 TGAGTTTGT ATATAAAGTA TTTGGTGAAG AATTGCTAA CTTATTGTAA ATATAAATAT TCATGATTAG

2171 TGATAGACCC ATCAATATAT TTTTGATAAT CTTTCATGTA TATGGTAGTA GGAAAAGCTA TAGTGCTGTT

2241 TCTGAAAAC AGATGAAAAT AGAAAGCTTT GGAAGTTTAA AAATGCTAT TATTTT TAGA TTCCGYACTT

2311 GAGCTCTGTA TGATCAACCT TCATATTTTC ATA ACTGTAA GTGCTTAGGA CTGCTGTTCT AATCAA ACTA

2381 CA

b) Spezifische Oligonukleotide (Primer) eCRY1a²

Type	Start	End	Name	Beschreibung
Primer	1	17	am14	am14 Cry1 Start
Primer	1105	1139	am1	am1 Wobbel Chick Cry1 F
Primer	1146	1171	am5	am5 Erithacus Cry F
Primer	1299	1324	am1061	am1061 Erithacus Cry F nested
Primer	1327	1300 C	am1064	am1064 Erithacus Cry R nested
Primer	1381	1352 C	am6	am6 Erithacus Cry R
Primer	1421	1388 C	am2	am2 Wobbel Chick Cry1 R
Primer	1683	1703	am16	am16 Sonde Cry X F
Primer	1690	1704	am22	am22 AK Cry X F
Primer	1757	1733 C	am13	am13 24-2-7 (Cry X) 3' R nested
Primer	1759	1780	am7	am7 24-2-7 (X) for Stopcodon Fish
Primer	1777	1755 C	am12	am12 24-2-7 (Cry X) 3' R
Primer	1860	1845 C	am23	am23 AK Cry X R
Primer	1871	1849 C	am17	am17 Sonde Cry X R

c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY1a³

² Forward Primer (F) sind in der Sequenz gelb, Reverse Primer (R) grün gekennzeichnet. Weitere Details sind der Liste der Oligonukleotide (Primer) zu entnehmen (vgl. Anhang XXIII - XXIV). C = komplementär

Name	Position
Hind III	283
Sac II	910
Nco I	955
Ava I	1097
Xho I	1097
Sca I	1302
Sac I	1595
EcoR I	1673

³ Restriktionsenzyme sind in der Sequenz violett gekennzeichnet.

eCRY1a: Translatiertes Protein

Gesamtlänge/Anzahl der Aminosäuren: 620

Molekulargewicht: ca. 70 kDa (69637.2 g/mol)

Theoretischer pI: 8.25

Formel: $C_{3112}H_{4802}N_{870}O_{896}S_{27}$

Atomanzahl: 9709

GeneBank Accession-Nr.: AA W4 82 90

geklont in: Klon pAM23 in pGEM[®]-T easy (Promega) oder alternativ pAM8 und pAM6 beide in pCR[®]4-TOPO[®] und pAM11 in pCR[®]II-TOPO[®] (alle Invitrogen)

Aminosäuresequenz:

MGVNAVHWFRKGLRLHDNPALRECIRGADTVRCVYILDWPWFAGSSNVGINRWRFLQCLELDANLRKLNLSRFLVIRGQP
ADVFPRLFKEWNIAKLSIEYDSEPFGKERDAAIKKLASEAGVEVIVRISHTLYDLDKI IELNGGQPPLTYKRFQTLISRM
EPLMPVETITPEVMKKCTTPVFDHDEKYGVPSLEELGFDTDGLPSAVWPGGETEALTRLERHLERKASVANFERPRMN
ANSLLASPTGLSPYLRFGCLSCRLFYFKLTDLYKKVKKNSSPPLSLYGQLLWREFFYTAATNNPRFDKMEGNPICVQIPW
DKNPEALAKWAEGRTGFPWIDAIMTQLRQEGWIHHLARHAVACFLTRGDLWISWEEGMKVFEELLDADWSVNAGSWMWL
SCSSFFQQFFHCYCPVGFGRRTDPNGDYIRRYLPVLRGFPKAYIYDPWNAPESIQKAAKCIIGVNYPKPMVNHAEASRLN
IERMKQIYQQLSRYRGLGLLATVPSNPNGNGGGLMGYSPGESISGCGSTGGAQLGTGDGHTVVQSCTLGDSHSGTSGIQ
QQGYCQAGSILHYAHGDNQQSHLLQAGRTALGTGISAGKRPNPEETQSVGPKVQRQSTN*

eCRY1a: Eintrag internationale Gendatenbank (GenBank)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

```

LOCUS      AY585716                1863 bp    mRNA    linear    VRT 12-JAN-2005
DEFINITION Erithacus rubecula cryptochrome-1a (CRY1a) mRNA, complete cds.
ACCESSION  AY585716
VERSION    AY585716.1  GI:57233428
KEYWORDS   .
SOURCE     Erithacus rubecula (European robin)
  ORGANISM Erithacus rubecula
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Passeriformes;
            Turdidae; Erithacus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1863)
  AUTHORS  Moller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
  TITLE    Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible
            transducer for the avian magnetic compass
  JOURNAL  Naturwissenschaften 91 (12), 585-588 (2004)
  PUBMED   15551029
REFERENCE  2 (bases 1 to 1863)
  AUTHORS  Moeller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (30-MAR-2004) ITZ, Ecology & Evolution, TiHo
            Hannover, Buenteweg 17d, Hannover 30559, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..1863
            /organism="Erithacus rubecula"
            /mol_type="mRNA"
            /db_xref="taxon:37610"
            /tissue_type="retina"
  gene    1..1863
            /gene="CRY1a"
            /note="eCRY1a"
  CDS    1..1863
            /gene="CRY1a"
            /note="photoreceptor protein; Cry1a"
            /codon_start=1
            /product="cryptochrome-1a"
            /protein_id="AAW48290.1"
            /db_xref="GI:57233429"

/translation="MGVNAVHWFRKGLRLHDNPALRECIRGADTVRCVYILD PWFAGS
SNVGINRWRFLQLQCLEDLDANLRKLN SRLFVIRGQPADVFPRLFKEWNI AKLSIEYDS
EPFGKERDAAIKKLASEAGVEVIVRISHTLYDLDKIIELNGGQPPLTYKRFQTLISRM
EPLMPVETITPEVMKKCTTPVFDDHDEKYGVP SLEELGFDTDGLPSAVWPGGETEAL
TRLERHLERKASVANFERPRMNANSL LASPTGLSPYLRFGLSCRLFYFKLTDLYKKV
KKNSSPPLSLYGQLLWREFFYTAATNNPRFDKMEGNPICVQIPWDKNPEALAKWAEGR
TGFPWIDAIMTQLRQEGWIHHLARHAVACFLTRGDLWISWEEGMKVFEELLLDADWSV
NAGSWMWLSCSSFFQOFFHCYCPVGFGRRTDPNGDYIRRYLPVLRGFPAKYIYDPWNA
PESIQKAAKCIIGVNYPKPMVNHAEASRLNIERMKQIYQQLSRYRGLGLLATVPSNPN

```


GNGNGGLMGYSPGESISGCGSTGGAQLGTGDGHTVVQSCTLGDSHSGTSGIQQQGYCQ

ASSILHYAHGDNQQSHLLQAGRTALGTGISAGKRPNPEEETQSVGPKVQRQSTN"

ORIGIN

```

1 atgggggtga acgccgtgca ctggttccgc aaggggctgc ggctccacga caaccggcg
61 ctgcccgaat gcatcagggg cgcgcacacg gtgcgctgcg tctacatcct ggaccctgg
121 ttcgccggct cctccaacgt gggcatcaac aggtggcgat tctgcttca gtgtctttaa
181 gatcttgatg ccaatctacg gaaactgaac tcacgcttgt ttgttatccg tggacagcca
241 gcagatgttt tccccaggct ttttaaggaa tggaacattg caaagctttc tattgaatat
301 gattctgaac catttgggaa ggagagagat gcagccatca agaagctggc cagtgaagct
361 ggagtggagg tcattgttgc gatttctcat acattgtatg acctagacaa aatcatagaa
421 ttaaattggg gacagcctcc tcttacttac aagcgattcc agaccctaata tagtagaatg
481 gaaccctctg agatgcctgt ggagactata accccagaag taatgaagaa atgtactact
541 ccagtcttcg atgaccatga tgagaaatac ggtgtgccat cacttgaaga gctgggcttt
601 gacacagatg gtctgccttc tgcagtatgg ccagggggag aaactgaagc tctcacacgc
661 ttagaaagac atttagaacg aaaggcttcg gtagcaaact ttgaaagacc acggatgaat
721 gcaaattccc ttctggcaag ccctacgggg cttagtcctt acctccgctt cggctgtctg
781 tcctgcccgc tcttttattt caagttaacg gatctgtaca aaaaggtaaa aaagaacagc
841 tcccctcccc tctccctcta tggccagctg ttatggcgctg aatttttcta cacagcggcg
901 actaacaatc cgcggtttga taaaatggag gggaaatccta tctgtgttca aatcccatgg
961 gataagaatc ctgaggcttt ggccaaatgg gcagaaggca ggacaggttt tccttggatt
1021 gatgcaatta tgacacaact tcgtcaggaa ggttggattc accatttagc ccggcatgct
1081 gtcgcatgct ttttgactcg aggtgacctc tggattagct ggaagaagg aatgaagtc
1141 tttgaagagc tgttacttga tgcagattgg agtgtgaatg ctggaagctg gatgtggctg
1201 tcctgtagtt cttctttca acagttttc cactgctact gcccagtggg ttttggcaga
1261 agaactgacc caaatgggga ttatatcaga cggatattgc cagtactcag aggtttccct
1321 gcaaaataca tctatgatcc ttggaatgcc ccagagagca tccagaaggc tgcaaaatgt
1381 attataggag ttaattatcc caaaccaatg gtaaaccatg cagaggcaag ccgtctgaat
1441 attgaaagga tgaacagat ctaccagcag ctttcacgat acagaggact gggctcttctt
1501 gcaactgtgc cttctaatac aaatggaaat ggaaatggtg gcctaattggg ctattcacca
1561 ggagaaagca tttctggttg tggtagtaca ggaggagctc agctgggaac tggatgatgg
1621 catactgttg ttcagtcatg taccctggga gactctcatt caggaacaag tggaaatcag
1681 cagcaagggt actgtcaagc aagtagtatc ttacactatg ctcatggaga caatcagcaa
1741 tcacacttat tgcaagcagg aagaacggcc cttggtactg gcattagtgc agggaaacgc
1801 ccaaatccag aagaagaaac tcagagcgtt ggaccaaaag tccagcgaca gagcacaat
1861 taa

```

//

eCRY1b: Total cds mit 3' UTR

Gesamtlänge: 1966 bp (bzw. 1761 bp bis Stop-Codon)

GeneBank Accession-Nr.: AY 58 57 17

geklont in: Klon pAM24 in pGEM[®]-T easy (Promega) oder alternativ pAM8 und pAM4
beide in pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen)

- a) Sequenz
- b) Spezifische Primer eCRY1b
- c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY1b

a) Sequenz⁴

```

1  ATGGGGGTGA ACGCCGTGCA CTGGTTCCGC AAGGGGCTGC GGCTCCACGA CAACCCGGCG CTGCGGGAAT
   >>...am 14...>>

71  GCATCAGGGG CGCCGACACG GTGCGCTGCG TCTACATCCT GGACCCCTGG TTCGCCGGCT CCTCCAACGT

141  GGGCATCAAC AGGTGGCGAT TCCTGCTTCA GTGTCTTGAA GATCTTGATG CCAATCTACG GAAACTGAAC

211  TCACGCTTGT TTGTTATCCG TGGACAGCCA GCAGATGTTT TCCCCAGGCT TTTTAAGGAA TGGAACATTG
      HindIII
      -----
281  CAAAGCTTTC TATTGAATAT GATTCTGAAC CATTGGGAA GGAGAGAGAT GCAGCCATCA AGAAGCTGGC

351  CAGTGAAGCT GGAGTGGAGG TCATTGTTTC GATTTCTCAT ACATTGTATG ACCTAGACAA AATCATAGAA

421  TTAAATGGGG GACAGCCTCC TCTTACTTAC AAGCGATTCC AGACCCTAAT TAGTAGAATG GAACCCCTGG

491  AGATGCCTGT GGAGACTATA ACCCCAGAAG TAATGAAGAA ATGTACTACT CCAGTCTTCG ATGACCATGA

561  TGAGAAATAC GGTGTGCCAT CACTTGAAGA GCTGGGCTTT GACACAGATG GTCTGCCTTC TGCAGTATGG

631  CCAGGGGGAG AACTGAAGC TCTCACACGC TTAGAAAGAC ATTTAGAACG AAAGGCTTCG GTAGCAAAC

701  TTGAAAGACC ACGGATGAAT GCAAATTCCT TTCTGGCAAG CCCTACGGGG CTTAGTCCTT ACCTCCGCTT

```

⁴ Forward Primer (F) sind in der Sequenz gelb, Reverse Primer (R) grün und Restriktionsenzyme violett gekennzeichnet. Rot kennzeichnet das Stop-Codon.

```
771  CGGCTGTCTG TCCTGCCGGC TCTTTTATTT CAAGTTAACG GATCTGTACA AAAAGGTAAA AAAGAACAGC

841  TCCCCTCCCC TCTCCCTCTA TGGCCAGCTG TTATGGCGTG AATTTTCTA CACAGCGGCG ACTAACAATC

SacII                               NcoI
-----                               -----
911  CCGCGGTTTGA TAAAATGGAG GGAATCCTA TCTGTGTTCA AATCCATGG GATAAGAATC CTGAGGCTTT

981  GGCCAAATGG GCAGAAGGCA GGACAGGTTT TCCTTGGATT GATGCAATTA TGACACAAC TCGTCAGGAA

                               XhoI
                               -----
1051 GGTGGATTG ACCATTAGC CCGGCATGCT GTCGCATGCT TTTGACTCG AGTGACCTC TGGATTAGCT
    >>.....am 1.....>

1121 GGAAGAAGG AATGAAGGT CTTGAAGAGC TGTTACTTGA TGCAGATTGG AGTGTGAATG CTGGAAGCTG
    >>.....am 1.....>>
    >>.....am 5.....>>

1191 GATGTGGCTG TCCTGTAGTT CCTTCTTTCA ACAGTTTTTC CACTGCTACT GCCCAGTGGG TTTGGCAGA

                               ScaI
                               -----
1261 AGAACTGACC CAAATGGGGA TTATATCAGA CGGTATTG CAGTACTCAG AGGTTCCCT GCAAAATACA
    <<.....am 1064.....<<
    >>.....am 1061.....>>

1331 TCTATGATCC TTGGAATGCC CCAGAGAGCA TCCAGAAGGC TGCAAATGT ATTATAGGAG TTAATTATCC
    <<.....am 2.....<<
    <<.....am 6.....<<

1401 CAAACCAATG GTAAACCATG CAGAGGCAAG CCGTCTGAAT ATTGAAAGGA TGAACAGAT CTACCAGCAG
    <.....am 2.....<<

1471 CTTTCACGAT ACAGAGGACT GGGTCTTCTT GCAACTGTGC CTTCTAATCC AAATGGAAAT GGAAATGGTG

                               SacI
                               -----
1541 GCCTAATGGG CTATTCACCA GGAGAAAGCA TTTCTGGTTG TGGTAGTACA GGAGGAGCTC AGCTGGGAAC
    >>.....am 18.....>>

                               EcoRI
                               -----
1611 TGGTGATGGT CATACTGTTG TTCAGTCATG TACCCTGGGA GACTCTCATT CAGGAACAAG TGAATTGAG

1681 CAGCAAGGTA TTATGGCAGT GCCTGTCTGT AGAGGATCTC CAAATGCTTG CAACTATGGA AACCCAGACA
    >>...am 24...>>
    <<.....<<

1751 AAACATCAAA ATAGTATGGA TAGATTTGG GTGATAGCTG CTGTCTGCAA CATGAACTGA CCTGTTTCT
    <<.....am 10...<<
    <<.....am 11.....<<
    <<.....am 19.....<<
    <...am 25...<<

1821 GTTCTTGAAA CACTGA AAGT ATTTCTAAGA GTGAACTGC TTGTCTTGTA ATTTTATCT AGAGCAGTAT
    <.....am 10.....<<

1891 TTCCGTGTTT TGAGTGGGAG GGATCATAAG TGTGACTAAA AAAAAAAAAA AAACACTGTC ATGCCGTTAC

1961 GTAGCG
```

b) Spezifische Primer eCRY1b⁵

Type	Start	End	Name	Beschreibung
Primer	1	17	am14	am14 Cry1 Start
Primer	1105	1139	am1	am1 Wobbel Chick Cry1 F
Primer	1146	1171	am5	am5 Erithacus Cry F
Primer	1299	1324	am1061	am1061 Erithacus Cry F nested
Primer	1327	1300 C	am1064	am1064 Erithacus Cry R nested
Primer	1381	1352 C	am6	am6 Erithacus Cry R
Primer	1421	1388 C	am2	am2 Wobbel Chick Cry1 R
Primer	1590	1609	am18	am18 Sonde Cry Z F
Primer	1690	1703	am24	am24 AK Cry Z F
Primer	1761	1743 C	am25	am25 AK Cry Z R
Primer	1798	1778 C	am19	am19 Sonde Cry Z R
Primer	1811	1789 C	am11	am11 24-2-1 (Cry Z) 3' rev. nested
Primer	1836	1808 C	am10	am10 24-2-1- (Cry Z) 3' rev.

c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY1b⁶

Name	Position
Hind III	283
Sac II	910
Nco I	955
Ava I	1097
Xho I	1097
Sca I	1302
Sac I	1595
EcoR I	1673

⁵ *Forward Primer* (F) sind in der Sequenz gelb, *Reverse Primer* (R) grün gekennzeichnet. Weitere Details sind der Liste der Oligonukleotide (Primer) zu entnehmen (vgl. Anhang XXIII - XXIV). C = komplementär

⁶ Restriktionsenzyme sind in der Sequenz violett gekennzeichnet.

eCRY1b: Translatiertes Protein

Gesamtlänge/Anzahl der Aminosäuren: 587

Molekulargewicht: ca. 66 kDa (66055.5 g/mol)

Theoretischer pI: 8.47

Formel: C₂₉₆₂H₄₅₆₈N₈₁₈O₈₄₃S₂₉

Atomanzahl: 9220

GeneBank Accession-Nr.: AA W4 82 91

geklont in: Klon pAM24 in pGEM[®]-T easy (Promega) oder alternativ pAM8 und pAM4
beide in pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen)

Aminosäuresequenz:

MGVNAVHWFRKGLRLHDNPALRECIRGADTVRCVYIILDPWFAGSSNVGINRWRFLQCLELDANLRKLNSRLFVIRGQP
ADVFPRLFKEWNIAKLSIEYDSEPFGERDAAIKKLASEAGVEVIVRISHTLYDLDKI IELNGGQPPLTYKRFQTLISRM
EPLMPVETITPEVMKKCTTPVFDDHDEKYGVPSLEELGFDTDGLPSAVWPGGETEALTRLERHLERKASVANFERPRMN
ANSLLASPTGLSPYLRFGLSCLRFYFKLTDLYKKVKNSSPPLSLYGQLLWREFFYTAATNNPRFDKMEGNPICVQIPW
DKNPEALAKWAEGRTGFPWIDAIMTQLRQEGWIHHLARHAVACFLTRGDLWISWEEGMKVFEELLLDADWSVNAGSMMWL
SCSSFFQQFFHCYCPVGFGRRTDPNGDYIRRYLPVLRGFPKAYIYDPWNAPESIQKAAKCIIGVNYPKPMVNHAEASRLN
IERMKQIYQQLSRYRGLGLLATVPSNPNGNGGMLMGYSPGESISGCGSTGGAQLGTGDGHTVVQSCTLGDSHSGTSGIQ
QQGIMAVPVCGRGSPNACNYGKPKDKTSK*

eCRY1b: Eintrag internationale Gendatenbank (GenBank)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

LOCUS AY585717 1966 bp mRNA linear VRT 12-JAN-2005
 DEFINITION *Erithacus rubecula* cryptochrome-1b (CRY1b) mRNA, complete cds.
 ACCESSION AY585717
 VERSION AY585717.1 GI:57233430
 KEYWORDS .
 SOURCE *Erithacus rubecula* (European robin)
 ORGANISM [Erithacus rubecula](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Passeriformes;
 Turdidae; *Erithacus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1966)
 AUTHORS Moller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
 TITLE Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible
 transducer for the avian magnetic compass
 JOURNAL Naturwissenschaften 91 (12), 585-588 (2004)
 PUBMED [15551029](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1966)
 AUTHORS Moeller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-MAR-2004) ITZ, Ecology & Evolution, TiHo
 Hannover, Buenteweg 17d, Hannover 30559, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1966
 /organism="Erithacus rubecula"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[37610](#)"
 /tissue_type="retina"
 gene 1..1966
 /gene="CRY1b"
 /note="eCRY1b"
 CDS 1..1764
 /gene="CRY1b"
 /note="photoreceptor protein; Cry1b"
 /codon_start=1
 /product="cryptochrome-1b"
 /protein_id="[AAW48291.1](#)"
 /db_xref="GI:57233431"

/translation="MGVNAVHWFRKGLRLHDNPALRECIRGADTVRCVYILDPWFAGS
 SNVGINRWRFLQLQCLEDLDANLRKLNLSRLFVIRGQPADVFPRLFKEWNIAKLSIEYDS
 EPFGKERDAAIKKLASEAGVEVIVRISHTLYDLDKIIELNGGQPPLTYKRFQTLISRM
 EPLEMPVETITPEVMKKCTTPVFDDHDEKYGVPSSLEELGFDTDGLPSAVWPGGETEAL
 TRLERHLERKASVANFERPRMNANSLASPTGLSPYLRFGCLSCRLFYFKLTDLYKKV
 KKNSSPPLSLYGQLLWREFFYTAATNNPRFDKMEGNPICVQIPWDKNPEALAKWAEGR
 TGFPWIDAIMTQLRQEGWIHHLARHAVACFLTRGDLWISWEEGMKVFEELLLDADWSV
 NAGSMMWLSCSSFFQFFHCYCPVGFGRRTDPNGDYIRRYLPVLRGFPKAYIYDPWNA

PESIQKAAKCIIGVNYPKPMVNHAESRLNIERMKQIYQQLSRYRGLGLLATVPSNPN

GNGNGGLMGYSPGESISGCGSTGGAQLGTGDGHTVVQSCTLGDSHSGTSGIQQGGIMA

VPVCRGSPNACNYGKPKDKTSK"

ORIGIN

```

1 atgggggtga acgccgtgca ctggttccgc aaggggctgc ggctccacga caaccggcg
61 ctgcggaat gcatcagggg cgccgacacg gtgcgctgcg tctacatcct ggaccctgg
121 ttcgccgct cctccaacgt gggcatcaac aggtggcgat tcctgcttca gtgtcttgaa
181 gatcttgatg ccaatctacg gaaactgaac tcacgcttgt ttgttatccg tggacagcca
241 gcagatgttt tccccaggct ttttaaggaa tggaacattg caaagctttc tattgaatat
301 gattctgaac catttgggaa ggagagagat gcagccatca agaagctggc cagtgaagct
361 ggagtggagg tcattgttcg gatttctcat acattgtatg acctagacaa aatcatagaa
421 ttaaattggg gacagcctcc tttacttac aagcgattcc agaccctaata tagtagaatg
481 gaacccttgg agatgcctgt ggagactata accccagaag taatgaagaa atgtactact
541 ccagtcttcg atgacatga tgagaaatac ggtgtgccat cacttgaaga gctgggcttt
601 gacacagatg gtctgccttc tgcagtatgg ccaggggggag aaactgaagc tctcacacgc
661 ttagaaagac atttagaacg aaaggcttcg gtagcaaact ttgaaagacc acggatgaat
721 gcaaattccc ttctggcaag ccctacgggg cttagtcctt acctccgctt cggctgtctg
781 tcctgccggc tcttttattt caagttaacg gatctgtaca aaaaggtaaa aaagaacagc
841 tccccctccc tctccctcta tggccagctg ttatggcgtg aatttttcta cacagcggcg
901 actaacaatc cgcggtttga taaaatggag gggaaatccta tctgtgttca aatcccatgg
961 gataagaatc ctgaggcttt ggccaaatgg gcagaaggca ggacaggttt tccttggatt
1021 gatgcaatta tgacacaact tcgtcaggaa ggttggattc accatttagc ccggcatgct
1081 gtcgcatgct ttttgactcg aggtgacctc tggattagct gggagaagag aatgaaggtc
1141 tttgaagagc ttttacttga tgcagattgg agtgtgaatg ctggaagctg gatgtggctg
1201 tcctgtagtt ccttctttca acagtttttc cactgctact gccagtgagg ttttggcaga
1261 agaactgacc caaatgggga ttatatcaga cggtatattg cagtactcag aggtttccct
1321 gcaaaatata tctatgatcc ttggaatgcc ccagagagca tccagaaggc tgcaaaatgt
1381 attataggag ttaattatcc caaaccaatg gtaaaccatg cagaggcaag ccgtctgaat
1441 attgaaagga tgaacagat ctaccagcag ctttcacgat acagaggact ggtcttctt
1501 gcaactgtgc cttctaatec aaatggaaat ggaaatgggt gcctaattgg ctattcacca
1561 ggagaaagca tttctgggtg tggtagtaca ggaggagctc agctgggaac tggtagtgg
1621 catactgttg ttcagtcatg taccctggga gactctcatt caggaacaag tggaaattcag
1681 cagcaaggta ttatggcagt gcctgtctgt agaggatctc caaatgcttg caactatgga
1741 aaaccagaca aaacatcaaa atagtatgga tagattttgg gtgatagctg ctgtctgcaa
1801 catgaactga ccttgtttct gttcttgaaa cactgaaagt atttctaaga gtgaacttgc
1861 ttgtcttgta atttttatct agagcagtat ttccgtggtt tgagtgggag ggatcataag
1921 tgtgactaaa aaaaaaaaaa aaacactgtc atgccgttac gtagcg

```

//

eCRY2: partial cds mit 3' UTR

Gesamtlänge: 647 bp (bzw. 384 bp bis Stop-Codon)

GeneBank Accession-Nr.: AY 77 26 89

geklont in: Klon pAM21 in pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen)

- a) Sequenz
- b) Spezifische Primer eCRY2
- c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY2

a) Sequenz⁷

```

1  GAACCATGGA ATGCCCCAGA GTCTGTGCAG AAGGAAGCCA AGTGCATCAT TGGGGTGGAT TATCCAAGC
                                                                                               PvuII
                                                                                               -----
71  CCATGGTGAA CCACGCAGAG ACCAGCCGAC TGAACATCGA GCGCATGAAG CAGATCTACC AGCAGCTGTC
    <<.....am 42.....>>

141  ACACTACAGG GGCCTCTGTT TACTGGCATC TGTCCCTTCA TGTGTGGAAG ATCTCAGTGG CCCAGTCACA
                                                                                               SmlI
                                                                                               -----
211  GACTCCACTT TGGGGCAGGG CTGCAGCACC AGTACAGCAG TGAGGCTGT C TCAAGCAGAG CAGGCTTCTC
                                                                                               BanII
                                                                                               -----
                                                                                               SapI
                                                                                               -----
281  CTA AACGCAA ACACGAGGGA GCGGAAGAGC CCGCCTCGA AGAACTGTAC AAACGAGCCA AAGTGACAGA

351  TCTGCCCGCT TCAGAGATCC CTGGGAAGAG TTTGTGATTC CAGCGACAAG CACCTTGCAA GTGAAGAGGG
                                                                                               BstEII
                                                                                               -----
421  AGAATGCTGA AGAGGTGACC AGAAGAGTAG GAACTGCTGG CACAGAAGGA CTGGAACCTG CGATCTACAA

491  CAGAAAATCC AGGGTCTCAT ATA AACTGTGT AATTCCAATA GCTGCCACAG AAGGGCACTG CATCTGTGAC
                                                                                               DraI
                                                                                               -----
561  TTCTGTCATT TGGAGAGTTT CATGCTTAGG CAATGGTCTG TAAATAAAAC TTTTATAAA TGCTTTAAA

631  AAAAAAAAAA AAAAAAA

```

⁷ Forward Primer (F) sind in der Sequenz gelb, Reverse Primer (R) grün und Restriktionsenzyme violett gekennzeichnet. Rot kennzeichnet das Stop-Codon.

b) Spezifische Primer eCRY2⁸

Type	Start	End	Name	Beschreibung
Primer	105	88 C	am42	am42 eCRY2 middle fish reverse

Primer *am34*, *am35*, *am32b - am35b* und *am36 - am41* sind nicht in der GeneBank veröffentlichten partiellen Sequenz enthalten, jedoch aus der Liste der Oligonukleotide zu entnehmen (vgl. Anhang XXIII - XXIV).

c) Häufig verwendete Restriktionsenzyme eCRY2⁹

Name	Position
Pvu III	133
Sml I	260
Sap I	304
Ban I	307
BstE II	434
Dra I	625

⁸ *Forward Primer* (F) sind in der Sequenz gelb, *Reverse Primer* (R) grün gekennzeichnet. Weitere Details sind der Liste der Oligonukleotide (Primer) zu entnehmen (vgl. Anhang XXIII - XXIV). C = komplementär

⁹ Restriktionsenzyme sind in der Sequenz violett gekennzeichnet.

eCRY2: Translatiertes Protein (partial)

Partielle Länge/Anzahl der Aminosäuren: 128

Kernlokalisierungssignal (NLS): PKRKHE¹⁰

GeneBank Accession-Nr.: AA V4 06 07

geklont in: Klon pAM21 in pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen)

Aminosäuresequenz:

EPWNAPESVQKEAKCIIGVDYPKPMVNHAETSRLNIERMKQIYQQLSHYRGLCLLASVPSCVEDLSGPVTDSTLGQGCST
STAVRLSQAEQASPKRKHEGAEPCPEELYKRAKVTDLPAEIPGKSL*

¹⁰ in der Sequenz türkis gekennzeichnet

eCRY2: Eintrag internationale Gendatenbank (GenBank)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

LOCUS AY772689 647 bp mRNA linear VRT 02-NOV-2004
 DEFINITION Erithacus rubecula cryptochrome 2 mRNA, partial cds.
 ACCESSION AY772689
 VERSION AY772689.1 GI:54780881
 KEYWORDS .
 SOURCE Erithacus rubecula (European robin)
 ORGANISM [Erithacus rubecula](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Passeriformes;
 Turdidae; Erithacus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 647)
 AUTHORS Moeller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
 TITLE Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible
 transducer for the avian magnetic compass
 JOURNAL Naturwissenschaften (2004) In press
 REFERENCE 2 (bases 1 to 647)
 AUTHORS Moeller,A., Sagasser,S., Wiltschko,W. and Schierwater,B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-OCT-2004) ITZ, Ecology & Evolution, TiHo
 Hannover, Buentweg 17d, Hannover, Lower Saxony 30559, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..647
 /organism="Erithacus rubecula"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[37610](#)"
 <1..387
[CDS](#) /note="eCRY2"
 /codon_start=1
 /product="cryptochrome 2"
 /protein_id="[AAV40607.1](#)"
 /db_xref="GI:[54780882](#)"
 /translation="EPWNAPEVQKEAKCIIGVDYPKPMVNHAE TSRLNIERMKQIYQ
 QLSHYRGLCLLASVPSCEVDLSGPVTDSTLGQGCSTSTAVRLSQAEQASPKRKHEGAE
 EPCPEELYKRAKVTDLPASEIPGKSL"

ORIGIN

```

1 gaaccatgga atgccccaga gtctgtgcag aaggaagcca agtgcacatc tgggggtggat
61 tatcccaagc ccatgggtgaa ccacgcagag accagccgac tgaacatcga gcgcatgaag
121 cagatctacc agcagctgtc acactacagc ggcctctggt tactggcadc tgtcccttca
181 tgtgtggaag atctcagtgag ccaagtcaca gactccactt tggggcaggg ctgcagcacc
241 agtacagcag tgaggctgtc tcaagcagag caggcttctc ctaaaccgcaa acacgagggg
301 gcggaagagc cctgccttga agaactgtac aaacgagcca aagtgcacaga tctgcccgc
361 tcagagatcc ctgggaagag tttgtgattc cagcgacaag caccttgcaa gtgaagaggg
421 agaatgctga agaggtgacc agaagagtag gaactgctgg cacagaagga ctggaacctg
481 cgatctacaa cagaaaatcc agggctcatc ataactgtgt aattccaata gctgccacag
541 aagggcactg catctgtgac ttctgtcatt tggagagttt catgcttagg caatgggtctg
601 taaataaaac tttttataaa tgtctttaa aaaaaaaaa aaaaaaa

```

//

LISTE DER OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)								
Primer#	Primername	for	made by	source	sequence	T _m [°C]	source	comments
Yale:								
1061 (Yale)	cry nested for	Cryptochrome 1	Sagasser	Robin	GCCAGTACTCAGAGGTTCCCTGCAG	69	cdna	for 3' race cryptochrome
1064 (Yale)	cry nested reverse	Cryptochrome 1	Sagasser	Robin	ATTTTGCAGGAAACCTCTGAGTACTGG	68	cdna	nested for 5'RACE
1045 (Yale)	opsin blue	a1 Opsin	Sagasser	Robin	AGGGCTGCAGTGCCTGGT	67	genomic	for opsin blue erithacus
1045 (Yale)	opsin blue	a1 Opsin	Sagasser	Robin	GGGGCGAAACTGCTTGTTCA	68	genomic	for opsin blue erithacus
Hannover/ Frankfurt/ Oldenburg:								
	GeneRacer 5' Primer	23 Basen	Invitrogen	synthetic	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	74		
	GeneRacer 5' Nested Primer	26 Basen	Invitrogen	synthetic	GGACACTGACATGGACTGAAAGGAGTA	78		
	GeneRacer 3' Primer	25 Basen	Invitrogen	synthetic	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAACG	76		
	GeneRacer 3' Nested Primer	23 Basen	Invitrogen	synthetic	CGTACGTAAACGGCATGACAGTG	72		
	Topo T3 Primer		Invitrogen	synthetic	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	53		
	Topo T7 Primer		Invitrogen	synthetic	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	46		
	M13 F Topo		Invitrogen	synthetic	GTA AAA CGA CGG CCA G	53		
	M13 R Topo		Invitrogen	synthetic	CAG GAA ACA GCT ATG AC	45		
	universal Aktin for	20 Basen	W. Schroth	degen.	GGTATYGCTGAYCGTATGCA	55		degenerierter Primer Aktin (Artemia, Drosophila, Xenopus, Podocoryne, Hydra)
	universal Aktin rev	20 Basen	W. Schroth	degen.	GAGATCCACATYTGTTGGAA	55		degenerierter Primer Aktin (Artemia, Drosophila, Xenopus, Podocoryne, Hydra)
am1	chick cry1 for/First Strand PCR genomic	Cryptochrome 1	Möller	Gallus	GAC CTS TGG ATY AGY TGG GAA GAA GGR ATG AAG GT	x	genomic fish	degenerierter Primer für RK Cry1 (Mus, Xenopus, Gallus, Coturnix)
am2	chick cry1 rev/First Strand PCR genomic	Cryptochrome 1	Möller	Gallus	GCA TGG TTY ACC ATT GGT TGG GAT ART TRA CTC	x	genomic fish	degenerierter Primer für RK Cry1 (Mus, Xenopus, Gallus, Coturnix)
am3	coturnix cry1 for	Cryptochrome 1	Möller	Coturnix	CTG CGR CTC CAC GAC AAC CCG GCK YTG C		genomic fish	degenerierter Primer für RK Cry
am4	coturnix cry2 rev	Cryptochrome 2	Möller	Coturnix	AGC AGT GRA ARA ACT GCT GRA ACA ARG MAC TRC AG		genomic fish	degenerierter Primer für RK Cry
am5	Erithacus Cry for	Cryptochrome 1	Möller	Robin	(CGT TG)A GAG CTG TTA CTT GAT GCA GAT TGG A	66	cdna	forward for 3'RACE
am6	Erithacus Cry rev	Cryptochrome 1	Möller	Robin	(TAC ATT) TTG CAG CCT TCT GGA TGC TCT CTG	66	cdna	reverse for 5' RACE
am1061	Erithacus Cry for nested	Cryptochrome 1	Sagasser	Robin	GCC AGT ACT CAG AGG TTT CCC TGC AA	69	cdna	for 3' race cryptochrome
am1064	Erithacus Cry rev nested	Cryptochrome 1	Sagasser	Robin	ATT TTG CAG GGA AAC CTC TGA GTA CTG G	68	cdna	nested for 5'RACE
am7	24-2-7 Cry for Stopcodon fish	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GGA AGA ACG GCC CTT GGT ACT G	66	cdna	forward primer for fishing missing Stopcodon in 24-2-7
am8	24-1-4 Cry 3' rev	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CAA AAC CTC AAT TTG CCC TTT GTG AAA GA	68	cdna	3' UTR reverse for 5' RACE (clone 24-1-4)
am9	24-1-4 Cry 3' rev nested	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CCA TAG AAA TGC CAG TTA GAA ATA ATG C	63	cdna	3' UTR reverse nested for 5' RACE (clone 24-1-4)
am10	24-2-1 Cry 3' rev	Cryptochrome 1	Möller	Robin	TCA GTG TTT CAA GAA CAG AAA CAA GGT CA	67	cdna	3' UTR reverse for 5' RACE (clone 24-2-1)
am11	24-2-1 Cry 3' rev nested	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GTC AGT TCA TGT TGC AGA CAG CA	64	cdna	3' UTR reverse nested for 5' RACE (clone 24-2-1)
am12	24-2-7 Cry 3' rev	Cryptochrome 1	Möller	Robin	TAC CAA GGG CCG TTC TTC CTG CT	69	cdna	3' UTR reverse for 5' RACE (clone 24-2-7)
am13	24-2-7 Cry 3' rev nested	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GCT TGC AAT AAG TGT GAT TGC TGA T	64	cdna	3' UTR reverse nested for 5' RACE (clone 24-2-7)
am14	Cry 1 start	Cryptochrome 1	Möller	Robin	ATG GGG GTG AAC GCC GT	65	cdna	für 5' Ende Cry 1
am15	Cry 2 forward	Cryptochrome 2	Möller	Robin	TCA ACT CTC GCC TGT TTG T	57	cdna	für Cry 2 von Anfang-Ende... if possible!
am16	24-2-7 Sonde F (Cry-X)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GCA AGG TTA CTG TCA AGC AGG	59 / 64	cdna	Für Radioaktivsonde CRY X (PCR hat bei 65°C funktioniert)

LISTE DER OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)

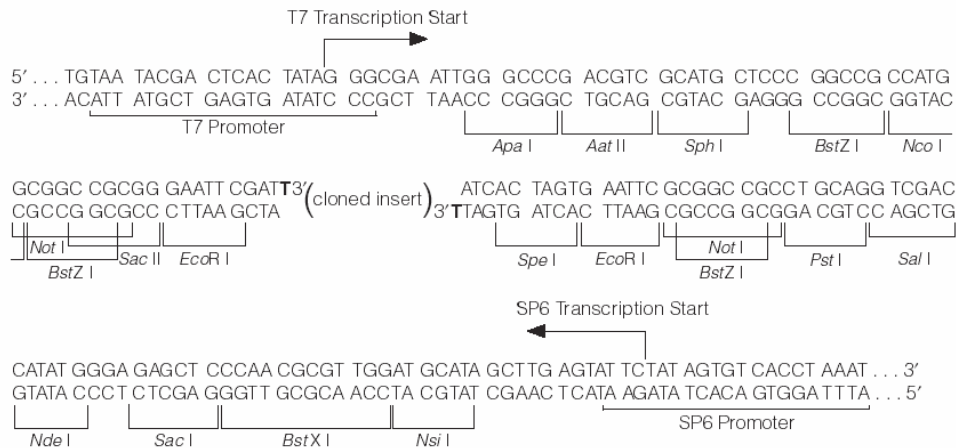
Primer#	Primername	for	made by	source	sequence	T _m [°C]	source	comments
am17	24-2-7 Sonde R (Cry-X)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CAA GCA GTT TAA TTT GTG CTC TG	58 / 64	CDNA	Für Radioaktivsonde CRY X (PCR hat bei 650C funktioniert)
am18	Sonde Cry-Z F	Cryptochrome 1	Möller	Robin	AGG AGG AGC TCA GCT GGG AA	64	cDNA	Für Radioaktivsonde/Q-PCR Cry Z
am19	Sonde Cry-Z R	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GCA GAC AGC AGC TAT CAC CCA	64	cDNA	Für Radioaktivsonde/Q-PCR Cry Z
am20	Aktin Sonde F	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GCC CAG CAC CAT GAA GAT CA	64	cDNA	Für Radioaktivsonde/Q-PCR Aktin
am21	Aktin Sonde R	Cryptochrome 1	Möller	Robin	AGG AGG GGG AGG AAC AGG AG	64	cDNA	Für Radioaktivsonde/Q-PCR Aktin
am 22	AK Cry X F	Cryptochrome 1	Möller	Robin	ATA TAC CAT GGG TTA CTG TCA AGC AGG T	65	cDNA	Für Antikörperherstellung Cry X (28 Basen)
am 23	AK Cry X R	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GGT GCT CGA GAT TTG TGC TCT GTC GC	73	cDNA	Für Antikörperherstellung Cry X (26 Basen)
am 24	AK Cry Z F	Cryptochrome 1	Möller	Robin	ATA TAC CAT GGG TAT TAT GGC AGT GCC	66	cDNA	Für Antikörperherstellung Cry Z (27 Basen)
am 25	AK Cry Z R	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GGT GCT CGA GTT TTG ATG TTT TGT CTG GT	71	cDNA	Für Antikörperherstellung Cry Z (29 Basen)
am 26	Cry 1 Prestart	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GGC ATA TCA TGG GGG TGA ACG CCG T	63	cDNA	künstlicher Beginn für CRYX+Z
am 27	302-5-12 F (Z gen.)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CTT CTC TCA CCT TCT AGC A	50	gen. DNA	forward primer für Plasmid 302-5-12=Z (sequ. AM62) genome walk
am 28	302-5-12 R (Z gen.)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CAG ATC CAA AGC TCT AAT G	50	gen. DNA	reverse primer für Plasmid 302-5-12=Z (sequ. AM65) genome walk
am29	331-1 F (X gen.)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	TCC TAC TAG AAA CTA TCC TGA GT	51	gen. DNA	forward primer für Plasmid 331-1=X (sequ. AM110) genome walk
am30	Extension of seq 124 (X+Z)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GCA ATC TAA TGA CAG CAT TA	50	gen. DNA	Primer in Richtung T7 auf Sequenz am 124 für Cry X u. Cry Z genome walk
am31	Extension of seq 133 - for Cry Z gen.)	Cryptochrome 1	Möller	Robin	GGA CTG AAT TAC ATG AAC TTC	50	gen. DNA	Primer in Richtung Sp6 auf Sequenz am 133 für Cry X u. Cry Z genome walk
am32	Ext. of seq 126/127/138/139 f. CryX gen.	Cryptochrome 1	Möller	Robin	CAA AAA TTT GCT TCC ACA	52	gen. DNA	Primer in Richtung Sp6 auf Sequenz 126/127/138/139 for Cry X genome walk
am33	for gap closing Cry X/Z gen.	Cryptochrome 1	Möller	Robin	TGC AAG ACA GAG AGG TGT	52	gen. DNA	Primer in Richtung Sp6 auf Sequenz am 132/133 for Cry X/Z genome walk
am34	CRY 2 - I Forw.	Cryptochrome 2	Möller/Rump	Genebank	GGC C(AC)T C(AG)T (CGT) AG CCG (ACT) AT GGA	x	gen. DNA	degenerierter Primer für eCRY2 fish
am35	Cry 2- I Rev.	Cryptochrome 2	Möller/Rump	Genebank	ATC CA(CGT) CC(C)T TCC TG(ACT) CTC AGT TG	x	gen. DNA	degenerierter Primer für eCRY2 fish
am32B	CRY2 Primer RACE F	Cryptochrome 2	Sagasser/Möller	Robin	GCT CCT CCA ACG TGG GCA TC	58	cDNA	for 3'RACE eCRY2 auf cDNA 17:30
am33B	CRY2 Primer RACE R	Cryptochrome 2	Sagasser/Möller	Robin	GGC GAT TCC TGC TTC AGT GT	54	cDNA	for 3'RACE eCRY2 auf cDNA 17:30
am34B	CRY2 Primer RACE F	Cryptochrome 2	Sagasser/Möller	Robin	CAA GCC CTA CGG GGC TTA GT	56	cDNA	for 3'RACE eCRY2 auf cDNA 17:30
am35B	CRY2 Primer RACE R	Cryptochrome 2	Sagasser/Möller	Robin	CGG AAC AAT GAC CTC CAC TCC A	57	cDNA	for 3'RACE eCRY2 auf cDNA 17:30
am36	Cry 2 3'RACE Primer partial	Cryptochrome 2	Sagasser/Möller	Robin	GCC TGG GGA AAA CAT CTG CTG	56	cDNA	for 3'RACE eCRY2 auf cDNA 17:30
am37	Cry 2 forward	Cryptochrome 2	Möller	Robin	GGC CAT CGT TAG CCG TAT GGA	56	cDNA	für eCRY2 Kompletierung RACE
am38	Cry 2 reverse	Cryptochrome 2	Möller	Robin	GCC AAA CTG CAG GGG CAA GA	56	cDNA	für eCRY2 Kompletierung (RACE)
am39	Cry 2 forward nested	Cryptochrome 2	Möller	Robin	CCA AAG AAG CCA GTC AGC A	51	cDNA	für eCRY2 Kompletierung (RACE)
am40	Cry 2 reverse nested	Cryptochrome 2	Möller	Robin	GGA AAG CCC AGC TCT TCC A	54	cDNA	für eCRY2 Kompletierung (RACE)
am41	eCRY2 middle Fish forw	Cryptochrome 2	Möller	Robin	ACC CAC CAT CTG GCC	49	cDNA	für eCRY2 Kompletierung (RACE)
am42	eCRY2 middle Fish rev	Cryptochrome 2	Möller	Robin	TTC AGT CCG CTG GTC TC	49	cDNA	für eCRY2 Kompletierung (RACE)

PLASMIDLISTE												
Plasmid Nr.	Plasmid Name	Vector	Plasmid Marker (antibiotic resistance)	Gene/Insert	Insert Size (approx.)	Organism	Origin of DNA	PCR-Nr./ Primers used	Date of Sequencing	E. coli Host	Comments	stored @
pAM 1	Cry 450 (with intron)	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry partial, mit intron	450 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA Retina 11Uhr rechts	am 5/ am 6	Mai 2002	DH5α	produced in Yale	H ₂ O-Stock; EIOH-Stock; Hannover -20°C
pAM 2	Cry 350 (without intron)	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry partial, ohne intron	350 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	am 5/ am 7	Mai 2002	DH5α	produced in Yale	H ₂ O-Stock; EIOH-Stock; Hannover -20°C
pAM 3	24-1-4	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 3' partial	1092 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	PCR #24-1-4; am1061/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Mai 2002	DH5α	produced in Yale	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 4	24-2-1	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 3' partial	668 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	PCR #24-2-1; am1061/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Mai 2002	DH5α	produced in Yale specific eCRY1b-Sequence (Mitte bis Stopcodon) → send to M. Ahmad for protein production	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 5	24-2-4	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 3' partial	413 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	PCR #24-2-4; am1061/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Mai 2002	DH5α	produced in Yale	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 6	24-2-7	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 3' partial	550 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	PCR #24-2-7; am1061/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Mai 2002	DH5α	produced in Yale specific eCRY1a-Sequence Nr.1 (mittlerer Teil) → send to M. Ahmad for protein production	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 7	24-2-15	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 3' partial	515 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 11Uhr rechts	PCR #24-2-15; am1061/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Mai 2002	DH5α	produced in Yale	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 8	107-5-5	pCR-II-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Cry 1 Start	1381 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr links	PCR #107-5-5; am14am6	Jan 2003	TOP 10 (Invitrogen)	specific Start-Sequence for both eCry1a und eCRY1b → send to M. Ahmad for protein production	Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 9	118-5-1	pCR-II-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Non Muscle Actin	700 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 3:30Uhr links	PCR #118-5-1; Actin forw. Universal + 3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Jan 2003	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock; Hannover -20°C
pAM 10	118-5-15	pCR-II-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	Non Muscle Actin	700 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 3:30Uhr links	PCR #118-5-15; Actin forw. Universal + 3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Jan 2003	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock; Hannover -20°C

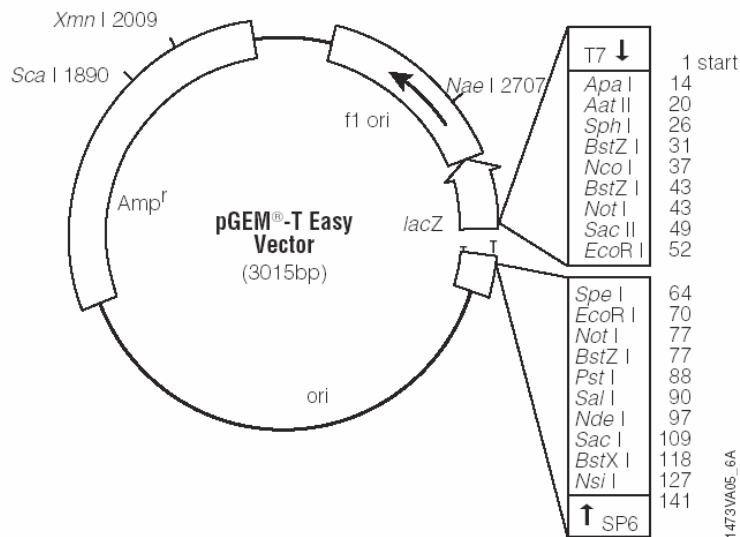
PLASMIDLISTE												
Plasmid Nr.	Plasmid Name	Vector	Plasmid Marker (antibiotic resistance)	Gene/Insert	Insert Size (approx.)	Organism	Origin of DNA	PCR-Nr./ Primers used	Date of Sequencing	E. coli/ Host	Comments	stored @
pAM 11	127-E1	pCR-II-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a Stop	1200 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr links	PCR #127-E1; am 7/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Jan 2003	TOP 10 (Invitrogen)	specific eCRY1a-Sequenz Nr.2 (letzter Teil mit Stopcodon) → send to M. Ahmad for protein production	Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 12	127-E8	pCR-II-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a Stop	1200 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr links	PCR #127-E8; am 7/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Jan 2003	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 13	302-5-5	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1b genomisch	2,1 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA (1:10 verdünnt)	PCR #302-5-5; am5/am25	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 14	302-5-12	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1b genomisch	2,1 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA (1:10 verdünnt)	PCR #302-5-12; am5/am25	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 15	315-15-UB	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a genomisch	1,4 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA-Erithacus	PCR #315-15-UB; am5/am23	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)	Achtung, dieser Klon hat ein CRY-Insert!	Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 16	315-15-UB (real)	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a genomisch	1,4 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA-Erithacus	PCR #315-15-UB (real); am5/am23	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 17	331-1-**	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a genomisch	3 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA (1:10 verdünnt)	PCR #331-1-**; am5/am23	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 18	331-1-***	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a genomisch	3 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	genomische DNA (1:10 verdünnt)	PCR #331-1-***; am5/am23	Jan 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 19	133-B3	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY2 5'RACE partial	700 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr rechts	PCR #133-B3; am38/5' nested Primer (GR, Invitrogen)	August 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 20	133-B4	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY2 5'RACE partial	700 bp	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr rechts	PCR #133-B4; am38/5' nested Primer (GR, Invitrogen)	August 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 21	134-A2	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY2 3'RACE partial	2 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr rechts	PCR #134-A2; am39/3' nested Primer (Gene Racer, Invitrogen)	Sept 2004	TOP 10 (Invitrogen)	specific eCRY2 Sequenz (partial)	Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 22	134-A3	pCR-4-Topo (Invitrogen)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY2 3'RACE partial	2 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Retina 17:30Uhr rechts	PCR #134-A3; am39/3' nested Primer (GR, Invitrogen)	Sept 2004	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 23	334-5-7	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1a Komplettssequenz	2,4 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Pool 17:30Uhr	PCR #334-5-7; am14/am17	Nov 2005	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C
pAM 24	334-8-13	pGem T-easy (Promega)	Ampicillin/ Kanamycin	eCRY1b Komplettssequenz	2,0 kb	<i>Erithacus rubecula</i>	cDNA Pool 17:30Uhr	PCR #334-8-13PCR #334-5-7; am14/am17	Nov 2005	TOP 10 (Invitrogen)		Glycerin-Stock, Hannover -20°C

Vektorkarte pGEM[®]-T Easy (Promega)

pGEM[®]-T Easy Vector



1517MA



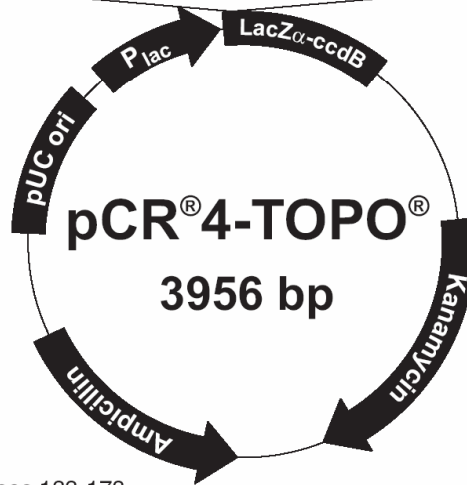
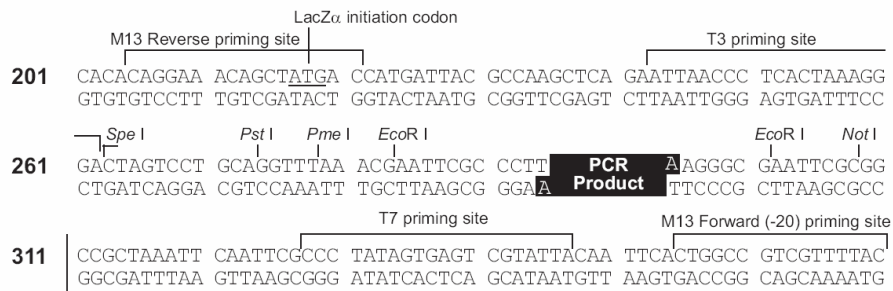
1473VA05_6A

Figure 3. pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

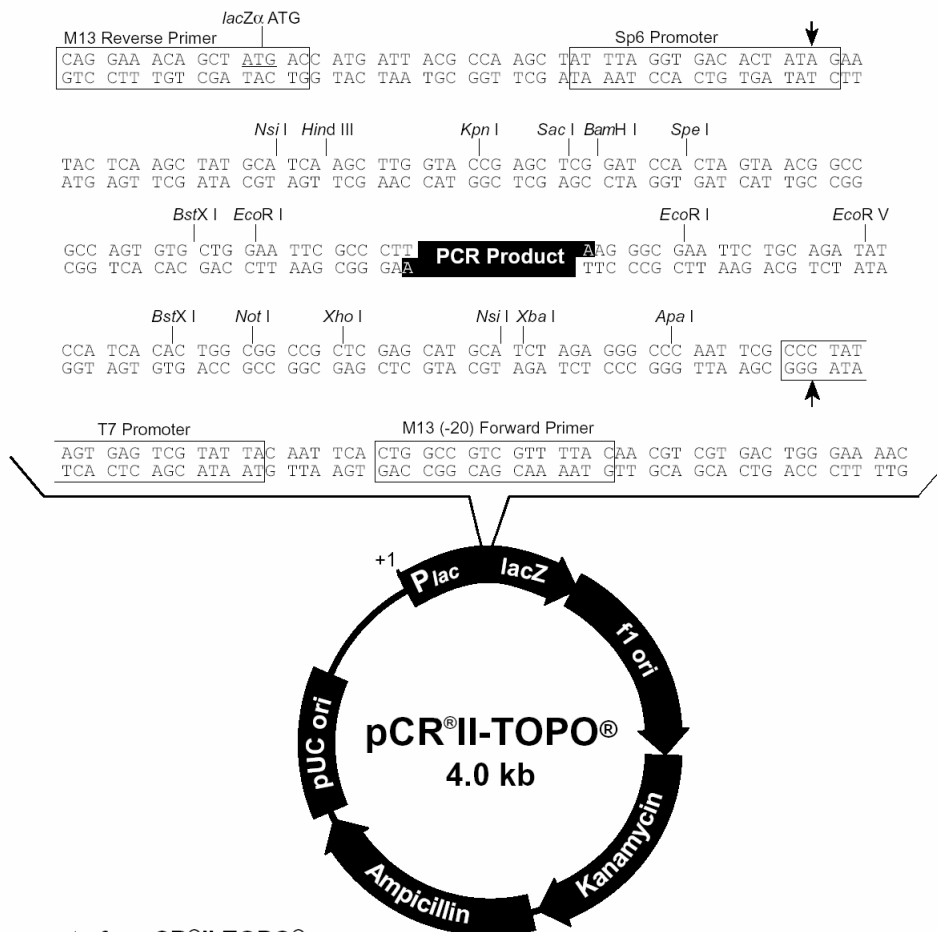
Vektorkarte pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen)



Comments for pCR[®]4-TOPO[®] 3956 nucleotides

- lac* promoter region: bases 2-216
 - CAP binding site: bases 95-132
 - RNA polymerase binding site: bases 133-178
 - Lac repressor binding site: bases 179-199
 - Start of transcription: base 179
 - M13 Reverse priming site: bases 205-221
 - LacZ α -*ccdB* gene fusion: bases 217-810
 - LacZ α portion of fusion: bases 217-497
 - ccdB* portion of fusion: bases 508-810
 - T3 priming site: bases 243-262
 - TOPO[®] Cloning site: bases 294-295
 - T7 priming site: bases 328-347
 - M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
 - Kanamycin promoter: bases 1021-1070
 - Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
 - Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
 - Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3064-3160 (c)
 - pUC origin: bases 3161-3834
- (c) = complementary strand

Vektorkarte pCR®II-TOPO® (Invitrogen)



Comments for pCR®II-TOPO® 3973 nucleotides

LacZ gene: bases 1-589
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 Sp6 promoter: bases 239-256
 Multiple Cloning Site: bases 269-383
 T7 promoter: bases 406-425
 M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
 f1 origin: bases 590-1027
 Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
 Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
 pUC origin: bases 3178-3851

LEBENS LAUF

Andrea Möller

Geburtsdatum: 30. April 1974
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig



▪ Ausbildung

- 06/1993 Allgemeine Hochschulreife
Kopernikusschule Freigericht
- 09/93 - 09/95 Grundstudium Biologie und Englisch
Lehramt für Gymnasien
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- 09/1995 Zwischenprüfung im Fach Biologie (Note: Sehr Gut)
- 09/95 - 07/96 Teaching Assistant in Großbritannien
Unterricht von *GCSE*- und *Advanced-Level*, sowie Internationalem
Baccalaureate in den Fächern Deutsch und Biologie
Malvern College, Malvern/Worcestershire, GB
- 08/96 - 09/97 Fulbright Stipendiatin im Biologie Masters-Programm
Northern Arizona University, Flagstaff/AZ, U.S.A.
- 10/97- 05/2001 Hauptstudium Biologie und Englisch, Nebenfach Spanisch
Lehramt für Gymnasien
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- 05/2001 Erstes Staatsexamen „Mit Auszeichnung“ (Note: 1,0)
Biologie, Englisch und Allgemeine Erziehungswissenschaften
Titel der Examensarbeit: „Ethophysiologische Untersuchungen zur
lichtabhängigen Magnetfeldorientierung“ (Betreuer: Prof. W. Wiltschko)
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- seit 09/2001 Promotion im Fach Biologie
Untersuchungen zu Primärprozessen der lichtabhängigen
Magnetrezeption bei Zugvögeln (Betreuer: Prof. W. Wiltschko)
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- 04/02 - 06/05 Promotionsstipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 04/02 - 07/02 Molekulargenetischer Forschungsaufenthalt im Rahmen der Promotion
als Stipendiatin des Programms Hochschule-Wissenschaft des Landes
Hessen (*HWP*)
Yale University, New Haven/CT, U.S.A.
- seit 10/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologiedidaktik
Lehr- und Lernforschung zum Erwerb naturwissenschaftsmethodischer
Kompetenzen im Biologieunterricht
Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen

▪ Wissenschaftliche Projekte

- 10/96 - 04/97 Eigenständige Forschungsarbeiten im Bereich der kognitiven Verhaltensforschung an hochalpinen Kiefernähern (publiziert)
Betreuer: Prof. Dr. Russell P. Balda
Avian Cognition Lab, Northern Arizona University, Flagstaff/AZ, U.S.A.
- 03/97 - 08/97 Eigenständige Forschungsarbeiten im Rahmen eines binationalen Forschungsprojektes auf dem Gebiet der Field Ecology/Conservation Biology in der Sonorawüste (publiziert)
Betreuer: Prof. Dr. Thomas G. Whitham, Prof. Dr. Rodolfo Dirzo
Northern Arizona University, Flagstaff/AZ, U.S.A. und Universidad Nacional de Mexico, Mexiko City, Mexiko
- 03/01 - 08/01 Idee, Konzeption und Umsetzung einer zweistündigen Führung zum Thema: „Entwicklung des modernen Menschen“ (Alterstufe 9-14)
Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt/Main
- 07/2003 Konzeption und Leitung eines dreiwöchigen meeresbiologischen Kurses für hochbegabte Schüler (Jg. 12/13) im Rahmen der „Deutschen SchülerAkademie“
Verein Bildung und Begabung e.V., Bonn

▪ Tätigkeiten

- 10/99 - 06/00 Studentische Hilfskraft im Fachbereich Biologie (Betreuung der Kurse „Struktur und Funktion der Organismen“ und „Systematik & Ökologie“)
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- 03/98 - 12/05 Freie Mitarbeiterin der Museumspädagogik
Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt/Main
- 02/04 - 12/04 Konzeption des Biologie-Curriculums für das Schülerlabor des Forschungszentrums Jülich (JULAB)
in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe „Biologie und ihre Didaktik“ der Universität Dortmund

▪ Universitäres Engagement

- 1993 - 1995 Aktives Mitglied der Biologie-Fachschaft der J.W. Goethe-Universität
- 04/2003 Vortragsamt Biologie beim 94. Kongress des Deutschen Vereins zur Förderung des mathematischen und naturwissenschaftlichen Unterrichts (MNU) an der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main
in Zusammenarbeit mit S. Hübner und D. Isheim
- 11/2004 Konzeption, Organisation und Durchführung des 4. Doktorandensymposiums im Fachbereich Biologie der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main
in Zusammenarbeit mit T. Gbenro

Publizierte wissenschaftliche Beiträge

Andrea Möller

Stand: September 2006

Originalarbeiten:

- Möller A., Pavlick B., Hile A.G., Balda R.P. (2001): Clark's Nutcrackers *Nucifraga columbiana* remember the size of their cached seeds. *Ethology* 107:451-462.
- Möller A., Gesson M., Noll C., Phillips J.B., Wiltschko R., Wiltschko, W. (2001): Light-Dependent Magnetoreception in Migratory Birds: Previous Exposure to Red Light Alters the Response to Red Light. In: *Orientation and Navigation - Birds, Humans and other Animals*. Royal Institute of Navigation, Oxford: 6-1 – 6-6.
- Möller A. (2003): Steinzeit in deutschen Museen - Eine Auswahl museumspädagogischer Angebote quer durch Deutschland. *Grundschule Sachunterricht* 17, 34-37.
- Wiltschko W., Möller A., Gesson M., Noll C., Wiltschko R. (2004): Light-dependent magnetoreception in birds: analysis of the behaviour under Red light after pre-exposure to Red light. *J. Exp. Biol.* 207, 1193-1202.
- Möller A., Sagasser S., Wiltschko W., Schierwater B. (2004): Retinal Cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* 91, 585-588.
- Möller A. (2006): *Reizbar!* - Bewegungsphänomene bei *Mimosa pudica*. *Unterricht Biologie* 317: 41-45.
- Mayer J., Möller A., Grube C. (2006) Kompetenzen der Erkenntnisgewinnung. *Der mathematische und naturwissenschaftliche Unterricht (im Druck)*.

Abstracts:

- Möller A., Long S. T., Nelson C., Whitham T.G. (1997): The Impacts of Selective Browsing on Arthropod Biodiversity in a Riparian Ecosystem. In: *Changing Ecosystems: Natural and Human Influences*. Supplement to the Bulletin of the Ecological Society of America Vol. 78, Abstracts p.150.
- Möller A., Pavlick B., Hile A.G., Balda R.P. (2000): Erinnerungsvermögen für die Grösse des versteckten Futters beim Kiefernhäher (*Nucifraga columbiana*). 133. Intern. Jahresversammlung der Deutschen Ornithologen-Gesellschaft, Abstracts p.135.
- Wiltschko W., Gesson M., Möller A., Wiltschko R. (2001): Light-dependent Magnetoreception in Birds. 6th Congress of the International Society of Neuroethology, Abstracts p. 259.
- Möller A., Gesson M., Noll C., Phillips J.B., Wiltschko R., Wiltschko W. (2001): Light-Dependent Magnetoreception in Birds: Orientation under Red Light. In: *Advances in Ethology*. Supplement to *Ethology* Vol. 36, Abstracts p. 219.

- Möller A., Sagasser S., Schierwater B., Wiltschko W. (2003): Retinal photopigments as possible transducers for the avian magnetic compass. 4th Conference of the European Ornithologist's Union, Abstracts p.97.
- Möller A., Sagasser S., Schierwater B., Wiltschko W. (2004): Retinal Cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. 7th International Congress of Neuroethology, Abstracts p.457.
- Möller A., Sagasser S., Schierwater B., Wiltschko W. (2005): Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. 350th W.E.-Heraeus-Seminar „Biophysics of Magnetic Orientation in Animals“, Abstracts p.30.
- Möller A., Sagasser S., Schierwater B., Wiltschko W. (2005): Differential Expression of Retinal Cryptochrome in European robin: a possible transducer for the avian magnetic compass In: Orientation and Navigation – Birds, Humans and other Animals. Royal Institute of Navigation, Oxford. Abstracts p.9.
- Möller A., Grube C., Mayer J. (2006): Inquiry Competence in German Biology Education: First Results of the National Research Project “biology in context”. VIth Conference of European Researchers in Didactics of Biology (ERIDOB). Institute of Education, London, Abstracts p.112.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die benutzten Werke im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

Unterschrift