

Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung potenzieller Rezeptoren der Magnetsinnesorgane von Vögeln

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Christine Nießner
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2013

Meiner Familie

Dekan: Prof. Dr. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Günther Fleissner
Prof. Dr. Manfred Kössl
Prof. Dr. Roswitha Wiltschko

Datum der Disputation: 12.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einleitung.....	1
1.1	Das Orientierungssystem der Vögel	1
1.2	Karte und Kompass	1
1.3	Das Erdmagnetfeld.....	3
1.4	Theoretische Möglichkeiten, das Erdmagnetfeld wahrzunehmen.....	4
1.5	Zielsetzung der Arbeit	5
2	Struktur der Magnetrezeptorkandidaten im Auge.....	7
2.1	Einleitung.....	7
2.1.1	Der Magnetkompass	7
2.1.1.1	Der Inklinationskompass	7
2.1.1.2	Lichtabhängigkeit.....	8
2.1.1.3	Kompassorientierung und Fixrichtungen.....	10
2.1.2	Der Magnetkompass im Auge.....	12
2.1.3	Das Radikalpaar-Modell	13
2.1.4	Potenzielles Rezeptormolekül Cryptochrom.....	15
2.1.4.1	Aufbau und Vorkommen von Cryptochrom.....	15
2.1.4.2	Cryptochrom-gesteuerte Vorgänge.....	18
2.1.4.3	Cryptochrome als potenzielles Rezeptormolekül für den Magnetkompass bei Vögeln	19
2.1.5	Problemstellung.....	19
2.2	Material und Methode	21
2.2.1	Retina-Präparation	21
2.2.1.1	Lokalisation von Cry1a und Cry1b	21
2.2.1.2	Bestimmung der Menge von lichtaktiviertem Cry1a	22
2.2.2	Fixierung.....	23
2.2.3	Primäre Antikörper	24

2.2.4	Lichtmikroskopische Immunhistologie	25
2.2.4.1	Kontrollen der lichtmikroskopischen Immunhistologie	26
2.2.4.2	Auswertung der Menge des lichtaktivierten Cry1a	26
2.2.5	Elektronenmikroskopische Immunhistologie.....	27
2.2.6	Western Blot, Dot Blot und Zell-Fraktionierung	28
2.3	Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung von Cryptochrom 1b in der Retina von Hühnern und Rotkehlchen.....	29
2.3.1	Ergebnisse.....	29
2.3.1.1	Lokalisation von Cry1b in den Ganglienzellen	29
2.3.1.2	Nachweis von Cry1b in den Innensegmenten der Fotorezeptoren	31
2.3.2	Diskussion	32
2.3.2.1	Nachweis der Expression von Cry1b in verschiedenen Zellschichten der Retina	32
2.3.2.2	Eignung von Cry1b als Rezeptormolekül für den Magnetkompass.....	34
2.4	Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung von Cryptochrom 1a in der Retina von Hühnern und Rotkehlchen.....	35
2.4.1	Ergebnisse.....	35
2.4.1.1	Lichtmikroskopische Immunhistologie.....	36
2.4.1.2	Elektronenmikroskopische Immunhistologie	37
2.4.1.3	Western Blot und Zell-Fraktionierung.....	38
2.4.2	Diskussion	39
2.4.2.1	Lokalisation von Cry1a	39
2.4.2.2	Cry1a als Rezeptormolekül für den Magnetkompass	40
2.5	Menge von lichtaktiviertem Cryptochrom 1a unter mono- chromatischen Lichtern.....	42
2.5.1	Ergebnisse und Diskussion.....	42
2.5.1.1	Cry1a-Markierung nach der Behandlung in Sonne und Dunkelheit	43
2.5.1.2	Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht.....	44
2.5.1.3	Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht höherer Intensität	46

2.6 Diskussion der Magnetrezeption durch Cryptochrom	49
2.6.1 Potenzielle Funktionen der Proteine Cry1a und Cry1b	49
2.6.2 Was macht den UV/V-Zapfen zum geeigneten Magnetrezeptor?.....	50
2.6.3 Die Trennung von visuellem und magnetischem Signal	51
2.6.4 Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a und Magnetrezeption.....	53
2.6.5 Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a und der Radikalpaar-Mechanismus	55
2.7 Ausblick	56
3 Struktur des Magnetrezeptorkandidaten im Schnabel	57
3.1 Einleitung	57
3.1.1 Das ‘Magnetometer’ der Vögel.....	57
3.1.2 Lokalisation von eisenmineralhaltigen Strukturen im Oberschnabel	58
3.1.3 Hinweise auf die Funktion der Magnetrezeptoren im Schnabel.....	59
3.1.4 Betäubung der Schnabelhaut.....	60
3.1.5 Der mittlere Ast des ophthalmischen Nerven.....	61
3.1.6 Problemstellung.....	62
3.2 Material und Methode	64
3.2.1 Schnabel-Präparation und -Fixierung	64
3.2.2 Berliner Blau und Lichtmikroskopie.....	65
3.2.3 Immunhistologie	66
3.2.4 Elektronenmikroskopie	67
3.2.5 Röntgenstrahlungsmessungen (μ -XRF und μ -XANES)	67
3.3 Feinstrukturelle und immunhistologische Studie zur Lokalisation und Charakterisierung eisenhaltiger Strukturen in Dendriten im Oberschnabel von adulten Hühnern	69
3.3.1 Ergebnisse.....	69
3.3.1.1 Lage und Verteilung der eisenhaltigen Strukturen.....	70

3.3.1.2	Lichtmikroskopischer Aufbau der eisenhaltigen Strukturen.....	72
3.3.1.3	Ultrastruktur der eisenhaltigen Strukturen in Dendriten.....	74
3.3.2	Diskussion	79
3.3.2.1	Vergleich der eisenhaltigen Dendriten von Hühnern mit denen von Tauben	80
3.3.2.2	Modell der Funktionsweise der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel	83
3.4	Entwicklung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren im Oberschnabel von juvenilen Hühnern.....	85
3.4.1	Ergebnisse.....	85
3.4.1.1	Lichtmikroskopische Struktur und μ -XRF-Analysen	85
3.4.1.2	Immunhistologische Charakterisierung	92
3.4.1.3	Charakterisierung der Eisenoxid-Zusammensetzung mit μ -XANES	92
3.4.2	Diskussion	96
3.4.2.1	Möglicher Zusammenhang zwischen eisenhaltigen Makrophagen und eisenhaltigen Magnetrezeptoren	96
3.4.2.2	Biominalisation	97
3.4.2.3	Zeitpunkt des Aufbaus der eisenhaltigen Magnetrezeptoren bei Hühnern	99
3.5	Diskussion der eisenmineral-basierten Magnetrezeption	102
3.5.1	Gibt es wirklich eisenhaltige Dendriten?.....	102
3.5.2	Wofür nutzen Hühner eisenhaltige Magnetrezeptoren?.....	105
3.6	Ausblick	106
3.6.1	Methodische Erweiterungsvorschläge zur Analyse der Funktionsweise des eisenhaltigen Magnetrezeptors.....	106
3.6.2	Korrelation zwischen der Wahrnehmung des Magnetfeldes bei juvenilen Hühnern im Verhalten und dem Aufbau der Magnetrezeptoren.....	106
4	Allgemeine Diskussion.....	108
4.1	Die zwei Magnetrezeptoren der Vögel.....	108
4.1.1	Struktur der Magnetrezeptoren bei verschiedenen Vogelarten.....	108
4.1.2	Mögliche Interaktionen der beiden Magnetrezeptoren	110

4.1.3 Evolution der Magnetrezeptoren	112
4.2 Magnetrezeption bei anderen Tieren	113
4.2.1 Magnetrezeption bei Reptilien.....	113
4.2.2 Magnetrezeption bei Säugetieren	115
4.2.3 Magnetrezeption bei Amphibien	116
4.2.4 Magnetrezeption bei Fischen	116
4.2.5 Magnetrezeption bei Arthropoden und Mollusken	118
4.3 Schlussfolgerungen.....	119
5 Zusammenfassung	121
6 Literatur	123
Anhang	I
Danksagung.....	XXVIII
Verzeichnisse	XXX
Lebenslauf.....	XXXVI
Eidesstattliche Versicherung.....	XXXIX

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Das Orientierungssystem der Vögel

Der Vogelzug fasziniert die Menschen schon sehr lange. Bereits in der ältesten europäischen Dichtung, der Odyssee heißt es III 320ff.: „...den [Menelaos] Sturm und Woge so weithin über das Meer verschlugen, woher auch selbst nicht die Vögel fliegen können im Jahre: so furchtbar und weit ist die Reise!“ (Pischinger 1904). Die erste wissenschaftlich-systematische Beschreibung des Vogelzugs stammt von Aristoteles († 322 v. Chr.). Neben vielen richtigen und heute noch gültigen Beobachtungen setzten er und Plinius der Ältere († 79 n. Chr.) auch manch Sonderbares in die Welt, so z. B. die Behauptung, dass Schwalben nicht zögen, sondern auf dem Grund von Teichen und Seen im Schlamm überwintern würden. Trotzdem wurden ihre Ansichten bis weit in das 18. Jahrhundert in wissenschaftlichen Werken wiederholt (Zfg. Curry-Lindahl 1982, Zfg. Lieckfeld & Strauß 2002). Heute ist bekannt, wo die Brutgebiete und die Überwinterungsquartiere der einzelnen Zugvogelarten liegen und dass Langstreckenzieher auf dem Zug tausende Kilometer zurücklegen können. Die Küstenseeschwalbe (*Sterna paradisaea*) als beeindruckendes Beispiel zieht von der Arktis bis zur Antarktis und zurück (Egevang et al. 2010). Aber auch Standvögel navigieren zwischen Futterplatz und Nest zielgerichtet. Tauben (*Columba livia*) suchen ihr Futter in einem Umkreis bis zu 20 km und steuern dann das Nest im Heimbereich wieder an. Es stellt sich die Frage, wie Vögel dabei die Orientierung behalten, da bei den zurückgelegten Strecken oftmals kein direkter Bezug zum Ziel mehr festgelegt werden kann, direkter Sichtkontakt beispielsweise ist nicht mehr möglich. Für die Orientierung bedarf es folglich eines geeigneten externen Referenzsystems (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999a).

1.2 Karte und Kompass

Das Orientierungssystem der Vögel setzt sich aus diversen Komponenten zusammen. Unabhängig davon gibt es ein allgemein gültiges Orientierungskonzept, das Karte-Kompass-Prinzip. Dieses – von Kramer (1953, 1957) für Vögel beschrieben – ist ein Zweischnitt-Orientierungsverfahren. Der erste Schritt besteht darin, den eigenen Standort zu ermitteln und mit dem Ziel in Bezug zu setzen. Damit wird die Kompassrichtung bestimmt, die später in eine konkrete Flugrichtung umgesetzt werden kann. Dieser erste Schritt kann mittels einer 'erlernten Karte' geschehen oder kann auch durch eine 'angeborene Sollrichtung' wie eine genetisch festgelegte Zugroute vorgegeben sein. Ein Beispiel für das Resultat dieses ersten Schrittes ist: „das Nest ist westlich des aktuellen Standorts“ und daraus folgt „fliege Richtung Osten“. Der zweite Schritt besteht darin, diese Richtung konkret umzusetzen. Hierfür nutzen

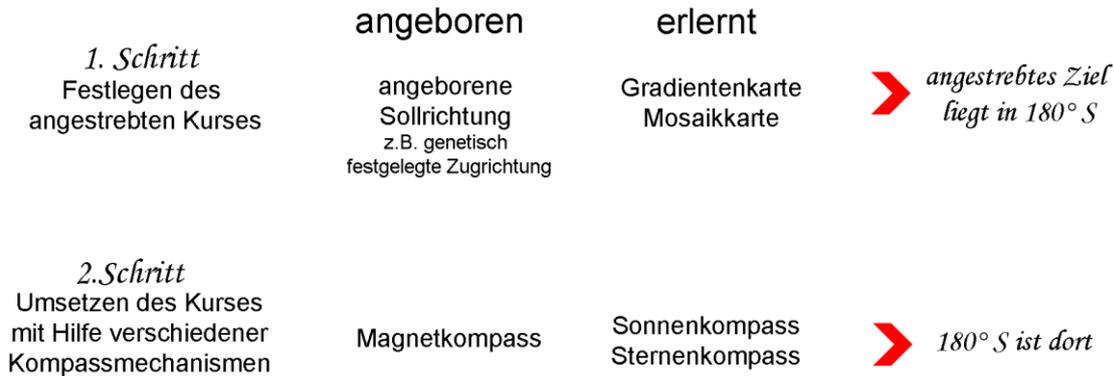


Abb. 1.1 Das Karte-Kompass-Prinzip. Der Orientierungsvorgang ist ein Zwei-Schritt-Verfahren. Im ersten Schritt wird der Kurs festgelegt. Dies kann eine angeborene Zugrichtung sein, oder es kann der Standort bestimmt und in Bezug zum Ziel gesetzt werden. Im zweiten Schritt wird dieser Kurs dann mittels eines Kompasses in eine konkrete Flugrichtung umgesetzt. Aus diesem Zwei-Schritt-Verfahren leiten sich unter anderem Karte und Kompass ab (R. Wiltschko & Wiltschko 1999b mit Ergänzungen).

Vögel verschiedene Kompassmechanismen. Resultat des zweiten Schrittes ist dann: „Osten ist in dieser Richtung“ (Abb. 1.1).

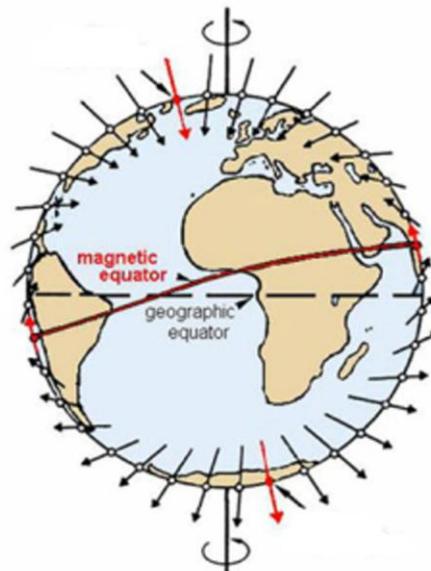
Mit der Karte ist eine innere mentale Repräsentation von äußeren Faktoren gemeint, durch die ein Bezug vom aktuellen Standort zum jeweiligen Ziel festgelegt werden kann. Vermutlich wird sie über das Brutgebiet und das Winterquartier, aber auch über die Zugstrecke angelegt. Insgesamt ist die Karte ein multifaktorielles System, in das verschiedenste Faktoren einbezogen werden können. Um welche es sich dabei handelt, kann selbst für dieselbe Art von Vögeln variieren. So orientieren sich Tauben in Pisa verstärkt nach Gerüchen (Zfg. Gagliardo 2013), während Tauben in Frankfurt vermehrt magnetische Parameter zur Orientierung verwenden (z. B. R. Wiltschko et al. 1981, 2010a). Grundlegend geht man davon aus, dass es zwei verschiedene Karten gibt: die Mosaikkarte und die Gradientenkarte. Die Mosaikkarte setzt sich aus Landmarken zusammen, wie beispielsweise in Frankfurt die markanten Hochhäuser der Skyline als optische Landmarken, und ist auf den sogenannten Heimbereich begrenzt. Die Gradientenkarte basiert auf geophysikalischen Gradienten bestimmter Parameter, die sich über ihren Verlauf kontinuierlich verändern und mit deren Hilfe der aktuelle Standort extrapoliert und in Bezug zum Ziel gesetzt werden kann. Auch für die Gradientenkarte sind mehrere Faktoren vorstellbar, bisher nachgewiesen ist allerdings nur der Verlauf der Intensität des Magnetfeldes (siehe Abschnitt 1.3 und Abschnitt 3.1). Diese Karten werden vom Jungvogel erlernt und zeitlebens erweitert (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999b).

Um Richtungen ermitteln zu können, haben Vögel verschiedene Kompassmechanismen. Wichtig für einen Kompass ist, dass er sich eines überall auf der Erde zugänglichen Faktors bedient, der unabhängig vom Ort Richtungen vorgeben kann. Hierfür eignen sich beispielsweise Sonne, Sterne oder das Magnetfeld der Erde. Alle diese Faktoren werden von Vögeln zur Kompassorientierung genutzt. Man spricht demgemäß von Sonnen-, Sternen- und Magnetkompass. Der Sonnenkompass und der Sternkompass sind erlernt,¹ während der Magnetkompass angeboren ist. Der Magnetkompass ist der einzige, der auf einer direkten Sinneswahrnehmung beruht (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999a, c).

1.3 Das Erdmagnetfeld

Das Magnetfeld der Erde ist sowohl für die Gradientenkarte als auch für den Magnetkompass von entscheidender Bedeutung. Es besitzt wie ein Stabmagnet einen Dipol-Charakter (Skiles 1985, Press & Siever 1995). Die magnetischen Feldlinien treten am magnetischen Südpol aus der Erde aus und am magnetischen Nordpol wieder in die Erde

Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Magnetfeldes der Erde. Die Richtung der Pfeile gibt die Inklination an, die Länge der Pfeile die Intensität. Die magnetischen Pole sind mit roten Pfeilen, die beiden geographischen mit einer schwarzen Achse gekennzeichnet (verändert nach R. Wiltschko & Wiltschko 1995).



ein. Dadurch wird der Verlauf der Feldlinien bestimmt. Diese zeigen auf der südlichen Erdhalbkugel nach oben, auf der nördlichen nach unten. Lokal ergibt sich durch die Feldlinie ein Vektor. Sein Winkel zur Horizontalen wird als Inklination, der zu geographisch Nord als

¹ Zum Erlernen des Sonnenkompasses wird die Veränderung des Sonnenstands im Tagesgang beobachtet und mit dem Magnetkompass geeicht. Der Sonnenkompass wird wohl auch dem Jahresgang angeglichen. Auch der Sternkompass wird durch Beobachtung der Sternbilder während des Zuges mit dem Magnetkompass und der Himmelsrotation geeicht. Vermutlich ist der Magnetkompass nicht geeignet, Richtungen einzuhalten, da Vögel bevorzugt andere visuelle Orientierungsfaktoren wie Sonne und Sterne nutzen, die dann von Zeit zu Zeit mit dem Magnetkompass abgeglichen werden (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999a, c).

Deklination bezeichnet. Die Inklination wird für die Nordhalbkugel mit positivem Vorzeichen notiert und auf der Südhalbkugel mit negativem. Am Äquator ist sie 0° , das heißt, die Feldlinien verlaufen parallel zur Erdoberfläche, an den Polen erreichen sie maximal 90° , also zeigen sie senkrecht nach oben bzw. nach unten.

Durch die Länge des Magnetfeldvektors wird die Intensität dargestellt. Auch diese verändert sich über ihren Verlauf von Pol zu Pol: sie ist am Äquator am niedrigsten und an den magnetischen Polen am höchsten (Abb. 1.2).

Das Magnetfeld der Erde enthält zahlreiche lokale Anomalien, die durch unterirdische Erzlagerstätten etc. hervorgerufen werden. An diesen Stellen verlaufen die Isodynamen² nicht erwartungsgemäß. Es kann auch zu zeitlich befristeten Veränderungen kommen durch sogenannte Sonnenstürme, so wie es auch tageszeitliche Schwankungen aufweist. Insgesamt betrachtet hat das Magnetfeld der Erde allerdings eine hinreichende Konstanz und permanente Zugänglichkeit und ist dadurch gut geeignet, als Referenz für ein Orientierungssystem zu dienen.

1.4 Theoretische Möglichkeiten, das Erdmagnetfeld wahrzunehmen

Prinzipiell sind drei Möglichkeiten vorstellbar, Magnetfelder wahrzunehmen: durch die Messung elektromagnetischer Induktion (Kalmijn 1978), durch die magnetische Beeinflussung chemischer Prozesse (Ritz et al. 2000) und durch die Wechselwirkung mit permanent-magnetischem Material (Kirschvink et al. 1985). Elektrische Induktion setzt ein stromleitendes Außenmedium (z. B. Meerwasser) voraus und ist so nur bei marinen Tieren theoretisch vorstellbar. Die Lorenzinischen Ampullen der Knorpelfische sind so sensitiv, dass sie Änderungen des Magnetfeldes wahrnehmen könnten, die durch die eigene Bewegung der Tiere zustande kommen (Murray 1962). Bis jetzt wurde Magnetrezeption auf Basis von elektrischer Induktion aber bei keinem Tier nachgewiesen. Nach heutigem Erkenntnisstand nutzen Vögel für die Wahrnehmung magnetischer Faktoren sowohl photochemische Prozesse als auch permanent-magnetisches Material.

Die Möglichkeit von Magnetrezeption auf der Basis von chemischen Prozessen wurde erstmals von Leask (1977) beschrieben. Er nannte sein Modell „optical pumping model“ und schlug einen auf Licht basierenden Prozess vor, der durch Magnetfelder beeinflusst wird. Schulten & Windemuth schlugen 1986 ebenfalls einen chemischen Magnetrezeptor vor, der die physikalische Tatsache nutzt, dass Radikalpaare mit Magnetfeldern interagieren können. Ritz et al. (2000) erweiterten dieses Modell und machten erstmals Voraussagen über die Funktionsweise des Systems, die in biologischen Experimenten überprüft werden konnten.

² Isodynamen sind Linien, die in Karten Orte gleicher magnetischer Stärke miteinander verbinden.

2004 gelang der verhaltensbiologische Nachweis, dass der Magnetkompass der Vögel auf einem Radikalpaar-Mechanismus beruht, mit dem die Richtung des Magnetfeldes ermittelt werden kann (siehe auch Abschnitt 2.1.3; Ritz et al. 2004, Thalau et al. 2005).

Magnetrezeption mittels permanentmagnetischen Materials (eisenmineral-basierte oder magnetit-basierte Magnetrezeption) wurde 1979 von Yorke vorgeschlagen. Magnetit kommt in verschiedenen Größen und Formen vor und kann abhängig davon auf unterschiedliche Weise magnetsensitiv sein. Es kommt bei Vertebraten oftmals in der Ethmoidregion vor (Kirschvink et al. 1985). Bei Vögeln, konkret beim Reisstärling (*Dolichonyx oryzivorus*), konnten mit elektrophysiologischen Ableitungen am ophthalmischen Ast des Trigemini Reaktionen auf die Veränderung der Intensität des Magnetfeldes beobachtet werden (Beason & Semm 1987; Semm & Beason 1990). Der ophthalmische Nerv innerviert bei Vögeln den Oberschnabel, der an die Ethmoidregion angrenzt (Stark 1979). In diesem wurden bei verschiedenen Vogelarten eisenmineralhaltige Strukturen nachgewiesen. Diese Strukturen wurden als magnetit- und maghemithaltige Dendriten identifiziert (Holtkamp-Rötzler et al. 1997, Hanzlik et al. 2000, Winklhofer et al. 2001, Fleissner et al. 2003, 2007a, Falkenberg et al. 2010). Magnetit bestimmter Größe und Form kann durch einen starken magnetischen Puls ummagnetisiert werden, und ein auf Magnetit basierender Magnetrezeptor kann auf diese Weise gestört werden. In Verhaltensexperimenten wurden Vögel mit einem solchen Puls behandelt und zeigten danach eine Abweichung von ihrer Zugrichtung (W. Wiltschko et al. 1994, 1998, 2002a). Junge Vögel hingegen zeigten keinerlei Beeinträchtigung durch eine solche Behandlung, vermutlich weil sie noch keine Karte besitzen (siehe auch Abschnitt 3.1.1, Munro et al. 1997). Man schließt daraus, dass unter anderem der eisenmineral-basierte (magnetit-basierte) Magnetrezeptor im Schnabel der Vögel die Karte mit Information versorgt.

Vögel nutzen also zur Orientierung beide physikalischen Parameter des Erdmagnetfeldes, die Richtung und die Intensität. Die Intensität ist ein Faktor der Gradientenkarte und wird wahrscheinlich im Schnabel wahrgenommen (R. Wiltschko et al. 2010a), die Richtung wird vom Magnetkompass genutzt und wird mit dem Auge wahrgenommen (Abschnitt 2.1.2, W. Wiltschko et al. 2002b).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der anatomischen Grundlage der beiden bei Vögeln bekannten Magnetsinnesorgane, dem Magnetkompass im Auge und dem Magnetometer im Schnabel.

Es war bisher nicht bekannt, wo der Rezeptor des Magnetkompasses innerhalb der Retina lokalisiert ist und welches Protein genau das Rezeptormolekül für den Magnetkompass ist. Cryptochrome werden seit 2000 als potenzielle Rezeptormoleküle für den Magnetkompass diskutiert, da sie die chemischen Voraussetzungen des physikalischen Modells erfüllen (Ritz et al. 2000). Mittlerweile sind bei diversen Vogelarten verschiedene Cryptochrome in der Retina nachgewiesen worden (Haque et al. 2002, Mouritsen et al. 2004, Möller et al. 2004, Watari et al. 2012). Laut dem zugrunde liegenden Modell ist für das gesuchte Rezeptormolekül nicht nur die chemische Eigenschaft, Radikalpaare bilden zu können (siehe auch 2.1.3), sondern auch die Lokalisation im Gewebe und in den Zellen selbst relevant. Ich habe deshalb die Lokalisation von zwei verschiedenen Cryptochrom-Formen, Cryptochrom 1a (Cry1a) und Cryptochrom 1b (Cry1b), in der Retina von Hühnern (*Gallus gallus*) und Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) immunhistologisch und feinstrukturell untersucht und auf deren Eignung als Rezeptormolekül hin diskutiert. Weil der Magnetkompass der Vögel nur in bestimmten Wellenlängen des Lichtes funktioniert, habe ich auch die biochemische Reaktion von Cry1a auf verschiedene Wellenlängen des Lichts betrachtet.

Über den strukturellen Aufbau des Magnetrezeptors des 'Magnetometers' der Vögel ist bereits mehr bekannt. 1997 wurden bei Tauben eisenhaltige Strukturen in Nervenfasern (Dendriten) im Oberschnabel beschrieben. Deren Aufbau und Lage macht es wahrscheinlich, dass es sich um die Magnetrezeptoren handelt, die die Intensität des Magnetfeldes messen, welche in der Karte Verwendung findet (Holtkamp-Rötzler et al. 1997, Hanzlik et al. 2000, Winklhofer et al. 2001; Fleissner et al. 2003, 2007a). Bislang wurde nur bei Tauben detailliert beschrieben, wie der intrazelluläre Aufbau der Strukturen und deren Anordnung in einer Feldstruktur aussehen. Ich habe im zweiten Teil meiner Arbeit die Struktur und Anordnung (Mikroarchitektur) von eisenhaltigen Dendriten bei Hühnern untersucht und mit den Daten verglichen, die bei Tauben erhoben wurden. Dazu stand auch die Entwicklung dieser Strukturen bei Hühnerküken im Fokus. Hierfür habe ich die Lage der eisenhaltigen Strukturen und die röntgenspektrale Charakterisierung der Eisenoxid-Zusammensetzung im Verlauf der Ontogenie vom Schlupf bis zum Alter von 4 Wochen beschrieben und mit denen von adulten Hühnern verglichen.

2 Struktur der Magnetrezeptorkandidaten im Auge

2.1 Einleitung

2.1.1 Der Magnetkompass

Dass Vögel die Richtung des Magnetfeldes der Erde zur Orientierung nutzen und somit über einen Magnetkompass verfügen, wurde 1965 von Merkel und Wiltschko entdeckt. Die ersten Versuche wurden an Rotkehlchen durchgeführt. Mittlerweile ist der Magnetkompass an über 20 Arten von ziehenden und nicht ziehenden Vögeln nachgewiesen worden (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007). Bei den frühen Versuchen wurde die Zugunruhe ausgenutzt, ein Verhalten mit gesteigerter Aktivität, bei dem die Vögel auch im Käfig bevorzugt in Zugrichtung streben (Kramer 1949). Die Vögel wurden in automatischen Registriercäfigen oder Trichterkäfigen auf die Richtung hin untersucht, in der sie sich während ihrer Zugzeit bevorzugt aufhalten (bzw. in welche Richtung sie streben) (Kramer 1949, Emlen & Emlen 1966). Diese Methode hat bis heute Bestand und ist eine der sichersten Vorgehensweisen, den Magnetkompass zu untersuchen, da sie ein angeborenes Verhalten ausnutzt. 1968 konnte Wiltschko auf diese Weise beim Rotkehlchen zeigen, dass nach Drehung des Magnetfeldes mit sogenannten Helmholtzspulen auch die Zugrichtung der Vögel in entsprechender Weise gedreht ist. Seit einigen Jahren gelingen auch Nachweise des Magnetkompasses mittels Dressur. Hierbei werden magnetische Richtungen mit Futter oder Prägungsreizen verbunden und die so trainierten Vögel beobachtet, ob sie die Richtung oder die magnetisch manipulierte Stelle im Raum wieder auffinden können. Auf diese Weise kann der Magnetkompass auch an nichtziehenden Vogelarten untersucht werden (z. B. Freire et al. 2005, Keary et al. 2009, Wilzeck et al. 2010).

2.1.1.1 Der Inklinationskompass

Durch die Drehung des Magnetfeldes mittels Helmholtzspulen konnte bei Rotkehlchen festgestellt werden, dass sie sowohl bei Drehung der Vertikalkomponente wie auch bei Drehung der Horizontalkomponente ihre Zugrichtung umkehren. Bei der Umkehrung der Vertikalkomponente bleibt Norden gleich, und lediglich die Inklination dreht sich um (Abb. 2.1 A). Man schließt daraus, dass der Magnetkompass der Vögel ein Inklinationskompass ist. Das bedeutet, Vögel nehmen nicht die Polarität des Magnetfeldes und damit nicht Norden und Süden wahr wie ein technischer Kompass, sondern die Feldlinien und leiten aus deren Neigung die Richtungen 'polwärts' und 'äquatorwärts' ab (W. Wiltschko & Wiltschko 1972). Mit dem Inklinationskompass ziehen Vögel auf beiden Erdhalbkugeln

während des Zugs im jeweiligen Herbst zuerst in Richtung Äquator (W. Wiltschko et al. 1993).

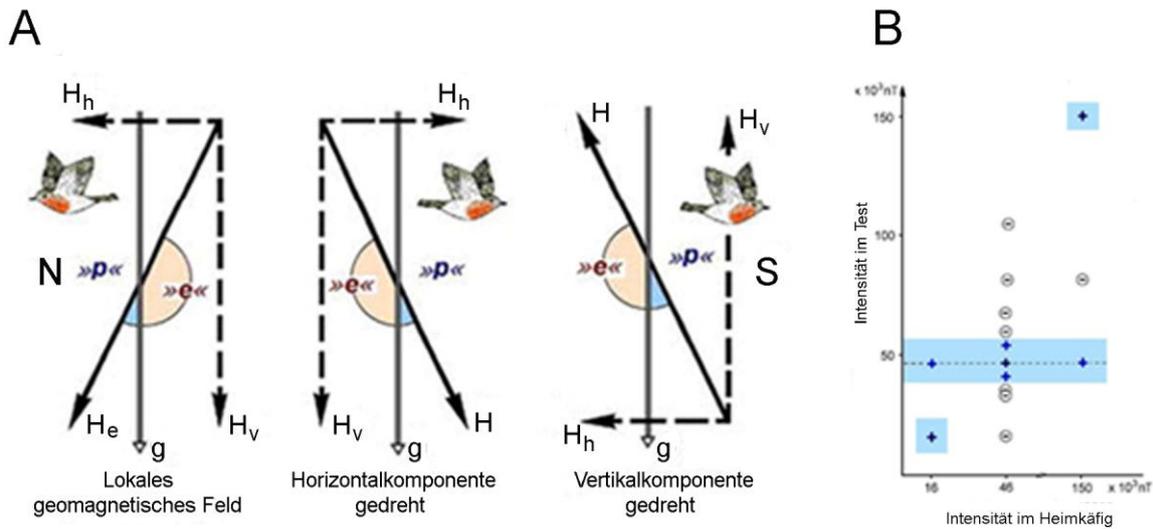


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Inklinationskompasses der Vögel. (A) Durch den Inklinationskompass dreht sich die bevorzugte Zugrichtung bei getesteten Rotkehlchen im Verhaltensversuch um, und zwar sowohl bei Drehung der Horizontalkomponente als auch bei der Umkehrung der Vertikalkomponente. Links: im Erdmagnetfeld, Mitte: Horizontalkomponente H_h umgekehrt, Rechts: Vertikalkomponente H_v umgekehrt. H – Magnetfeldvektor, g – Gravitation der Erde, S – Süden, N – Norden. (B) Verhaltensantwort zugunruhiger Rotkehlchen in verschiedenen Intensitäten des magnetischen Feldes. Auf der Y-Achse ist die Intensität während der Versuche, auf der X-Achse die Intensität im Wohnkäfig aufgetragen. Der Magnetkompass funktioniert nur in einem bestimmten biologischen Fenster, eine Gewöhnung an andere Intensitäten ist möglich (aus Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2005).

Eine weitere Eigenschaft des Inklinationskompasses der Vögel ist, dass er nur in einem bestimmten biologischen Fenster bezüglich der Magnetfeldstärke funktioniert. Eine Abweichung um 20-30% führt im verhaltensbiologischen Experiment bei Rotkehlchen zu Desorientierung. Eine Gewöhnung an andere Intensitäten ist möglich, der Bereich wird aber nicht erweitert, sondern ein zweites Fenster kommt hinzu, in dem sich die Vögel dann auch orientieren können (Abb. 2.1 B; W. Wiltschko 1978, W. Wiltschko et al. 2006). Dies ermöglicht es den Vögeln vermutlich, sich auf langen Zügen an verschiedene Intensitäten in anderen Bereichen auf der Erde anzupassen.

2.1.1.2 Lichtabhängigkeit

Der Magnetkompass der Vögel ist abhängig von Licht. Dressurversuche mit Hühnern (Freire et al. 2005, W. Wiltschko et al. 2007a) und Zebrafinken, *Taeniopygia guttata* (Keary et al. 2009), aber auch Verhaltensversuche mit australischen Brillenvögeln, *Zosterops lateralis* (W. Wiltschko et al. 1993), Gartengrasmücken, *Sylvia borin* (Rappl et al. 2000) und

Struktur der Magnetrezeptoren im Auge: **Einleitung**

Rotkehlchen (W. Wiltschko & Wiltschko 2001) sowie Verfrachtungsversuche mit Tauben (R. Wiltschko & Wiltschko 1998) zeigten, dass der Magnetkompass der Vögel unter dem vollen Spektrum des Tageslichts funktioniert. Um die Lichtabhängigkeit des Magnetkompasses besser charakterisieren zu können, wurden Verhaltensversuche in verschiedenen monochromatischen Lichtbedingungen durchgeführt. Man konnte zeigen, dass Orientierung mit dem Magnetkompass unter monochromatischem Licht in einem Bereich von 370 nm UV Licht bis 565 nm grünem Licht möglich ist (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). So flogen bei Verfrachtungsversuchen junge Tauben nach dem Transport im vollen Spektrum des Lichtes oder in grünem Licht in Heimrichtung ab, während Dunkelheit oder rotes Licht zu Desorientierung führten (W. Wiltschko & Wiltschko 1981; R. Wiltschko & Wiltschko 1998). Auch Dressurversuche mit Hühnern zeigten orientiertes Verhalten unter blauem Licht und Desorientierung unter rotem (W. Wiltschko et al. 2007a). Dieselbe Wellenlängenabhängigkeit besteht auch bei den Zugvogelarten australischer Brillenvogel und Gartengrasmücke (Abb. 2.2; Rappl et al. 2000, Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2002).

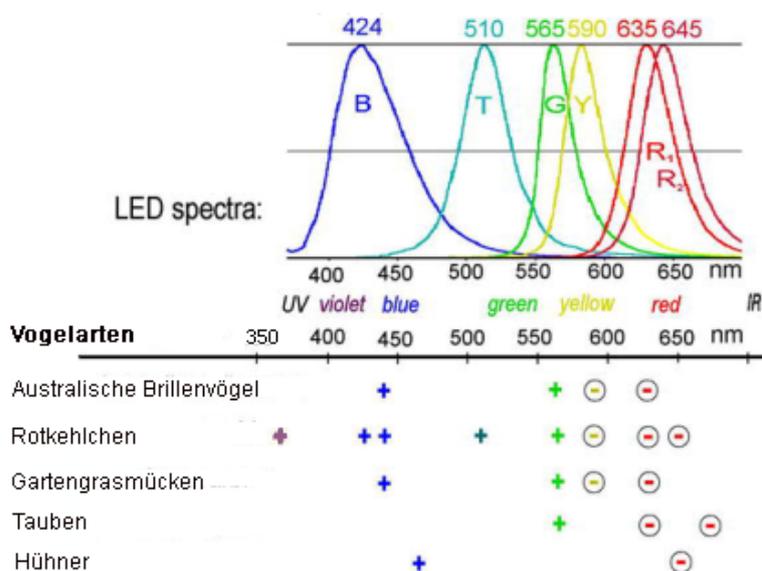


Abb. 2.2 Wellenlängenabhängigkeit des Magnetkompasses der Vögel. Im oberen Bereich sind die Spektren der verwendeten LEDs dargestellt. Im unteren Bereich ist mit + gekennzeichnet, wenn Orientierung mit dem Magnetkompass möglich ist, mit - gekennzeichnet bei negativem Ergebnis. Magnetorientierung mit dem Magnetkompass ist bei allen bis jetzt getesteten Vogelarten im Bereich von 373 nm ultraviolettem Licht bis 565 nm grünem Licht möglich (Graphik nach Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2005, ergänzt durch die Ergebnisse für Hühner aus W. Wiltschko et al. 2007a).

2.1.1.3 Kompassorientierung und Fixrichtungen

Die meisten Versuche wurden an zugunruhigen Rotkehlchen durchgeführt. Sie wurden mit LEDs (lichtemittierende Diode), deren Spektrum auf 30-40 nm begrenzt ist, in Verhaltensversuchen mit Emlen-Trichtern in verschiedenen Wellenlängen und auch unterschiedlichen Intensitäten dieser Wellenlängen getestet. Bei niedrigen Intensitäten konnten sie sich wie oben beschrieben unter ultraviolettem (370 nm bei $0,8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$), blauem (424 nm bei $8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$), türkistem (502 nm bei $8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$) und grünem (565 nm bei $8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$) Licht mit dem Magnetkompass in Zugrichtung orientieren. Rotes oder gelbes Licht führt auch bei niedriger Intensität zu Desorientierung der Vögel (Abb. 2.3; Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

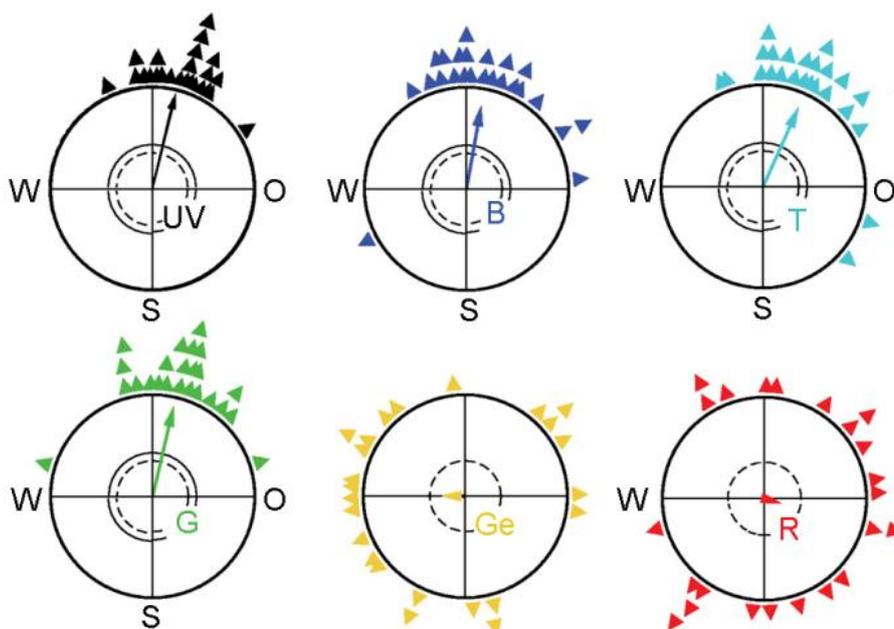


Abb. 2.3 Ergebnisse der Verhaltensversuche bei Rotkehlchen unter monochromatischen Lichtern niedriger Intensitäten. Als niedrige Intensität gelten hier Lichtintensitäten von $7-8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Eine Ausnahme bildet UV-Licht, in dieser Wellenlänge wurde nur eine Intensität von $0,8 \times 10^{15}\text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$ verwendet. Orientierung mit dem Magnetkompass ist unter ultraviolettem, blauem, türkistem und grünem Licht der angegebenen Lichtintensität möglich. Gelblicht und Rotlicht führt zu Desorientierung (verändert nach Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

Charakteristisch für Orientierung in Zugrichtung vermittelt durch den Magnetkompass sind im verhaltensbiologischen Experiment:

- die Umkehrung der Richtung in der jeweiligen Jahreszeit, also im Herbst nach Süden und im Frühjahr nach Norden (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b),
- die Drehung der Zugrichtung bei Drehung der Vertikalkomponente oder auch der Horizontalkomponente (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b),

Struktur der Magnetrezeptoren im Auge: Einleitung

- die Behandlung mit Hochfrequenzfeldern führt zu Desorientierung (Ritz et al. 2004, Thalau et al. 2005), und
- die Betäubung des Schnabels hat keinen Einfluss auf die Kompassorientierung (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

Bei höheren Intensitäten von monochromatischem ultravioletten, blauen, türkisen und grünen Licht kommt es zu einem Zusammenbruch der normalen Zugorientierung. Z. B. führt die

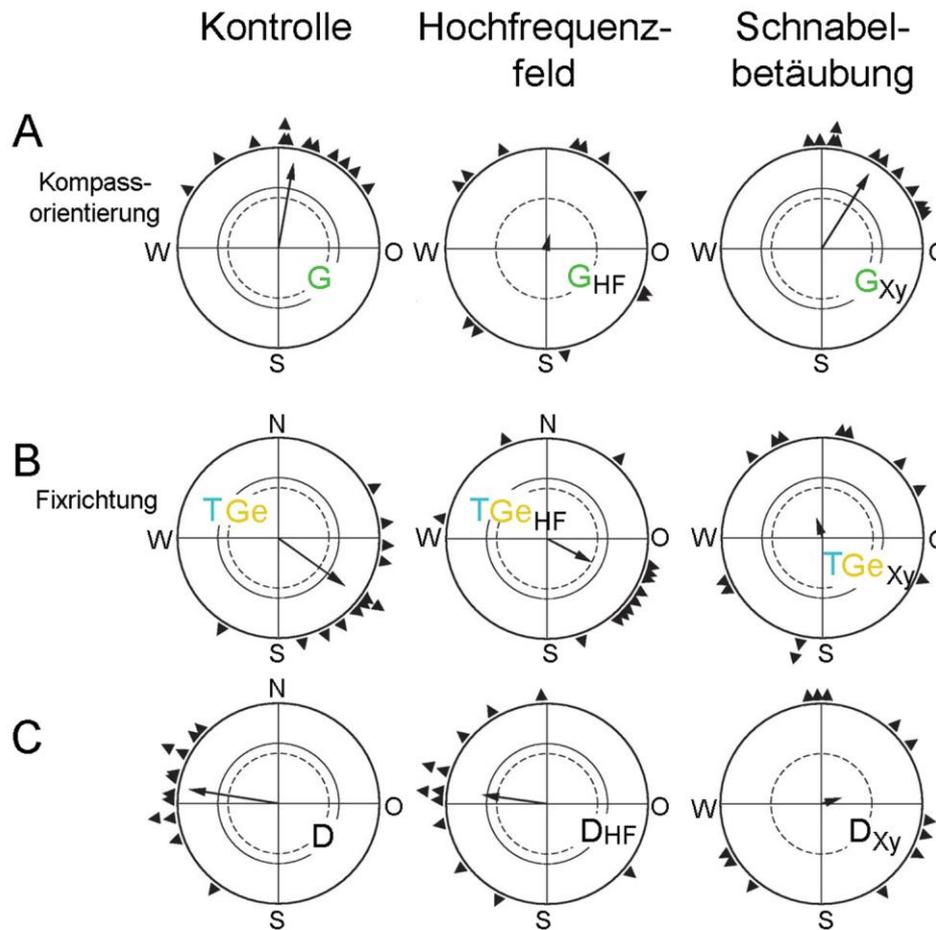


Abb. 2.4 Effekte von Hochfrequenz und Betäubung des Schnabels auf Kompassorientierung und sogenannte Fixrichtungen. (A) In grünem Licht niedriger Intensität stört das HF-Feld die Kompassorientierung, die Betäubung des Schnabels hat keinen Einfluss. Sogenannte Fixrichtungen kehren sich zwischen Herbst und Frühjahr nicht um. Bei diesen Fixrichtungen, in (B) ausgelöst durch gelbes und türkises Licht oder in (C) durch Dunkelheit, hat das HF-Feld keine Auswirkung, die Betäubung des Schnabels allerdings führt zu Desorientierung. Dies bedeutet, Fixrichtungen unterliegen nicht dem Magnetkompass, sondern werden von den Magnetrezeptoren des Schnabels bestimmt. G – Grün, T – Türkis, Ge – Gelb, D – Dunkelheit (verändert nach R. Wiltschko et al. 2010b).

Erhöhung der Intensität auf $36 \times 10^{15} \text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$ bei grünem Licht zu Desorientierung. Eine weitere Erhöhung auf $54 \times 10^{15} \text{ quanta s}^{-1}\text{m}^{-2}$ führt zu einer axialen Verteilung der

Orientierung in Ost-West-Richtung und eine noch weitere Erhöhung auf 72×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$ zu einer axialen Verteilung in Nord-Süd-Richtung (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

Bei Türkis mit einer Intensität von 36×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$ zeigen Rotkehlchen auch axiale Verhaltensantworten in Ost-West-Richtung, bei 54×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$ streben sie nur in Nord-Richtung. Diese Nord-Richtung ist allerdings, wie vermutlich auch die axialen Richtungen, eine sogenannte Fixrichtung. Fixrichtungen sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass die Vögel ihre Richtung nicht mehr zwischen Herbst und Frühjahr drehen und die gewählte Richtung von der Zugrichtung abweicht (R. Wiltschko et al. 2005, Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

Werden in solchen Verhaltensversuchen kurzweilige monochromatische Lichter, unter denen allein Kompassorientierung möglich ist, mit langwelligen Lichtern gemischt, kommt es, wie übrigens auch im Dunkeln, ebenfalls zu Fixrichtungen. Fixrichtungen sind auch gerichtetes Verhalten, lassen sich aber nicht durch ein Hochfrequenzfeld stören. Sie gehen also nicht auf einen Radikalpaar-Mechanismus zurück. Auch dreht die Richtung nicht mit der vertikalen Komponente des Magnetfeldes mit, sondern nur mit der horizontalen Komponente. Das bedeutet, dass diesem Verhalten ein polares System zugrunde liegt. Betäubung des Oberschnabels führt bei Fixrichtungen zur Desorientierung, eine Behandlung, die auf den Kompass, dem der Radikalpaar-Mechanismus zugrunde liegt, keine Auswirkungen hat (Abb. 2.4). Daraus ist zu schließen, dass die Fixrichtungen vom eisenmineral-basierten System aus dem Oberschnabel gesteuert werden und nicht vom Magnetkompass. Die biologische Funktion dieser Fixrichtungen ist nicht bekannt (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

2.1.2 Der Magnetkompass im Auge

In verhaltensbiologischen Studien wurde gezeigt, dass der Magnetkompass der Vögel im Auge lokalisiert ist. Rotkehlchen sind nur mit dem rechten Auge magnetisch orientiert (W. Wiltschko et al. 2002b). Wird dieses mit einer Kappe verdeckt, bricht die normale Zugorientierung zusammen. Wird das linke Auge abgedeckt, hat dies keinen Einfluss auf die Zugorientierung.³ Auch australische Brillenvögel, *Zosterops lateralis* (W. Wiltschko et al. 2003), Tauben (Wilzeck et al. 2010) und Hühner (Rogers et al. 2008) zeigen diese Lateralisierung des Magnetkompasses.

³ In Untersuchungen von Hein et al. (2011) waren Rotkehlchen auch mit dem linken Auge orientiert. Hein et al. (2011) testeten ihre Rotkehlchen ausschließlich im Herbst, W. Wiltschko et al. (2002b) führten ihre Versuche nur im Frühjahr durch. Gehring et al. (2012) konnten dann abschließend zeigen, dass es im ersten Herbst noch keine Lateralisierung gibt, diese im ersten Frühjahr noch flexibel ist und sich erst dann manifestiert.

Ein zweiter Hinweis für die Lokalisierung des Magnetkompasses im Auge ergibt sich aus der Lichtabhängigkeit, die in Abschnitt 2.1.1.2 bereits beschrieben wurde. Die Lichtabhängigkeit allein lässt allerdings noch keine Rückschlüsse auf die Lokalisation zu, allerdings scheint auch Bildverarbeitung (Kontursehen etc.) eine entscheidende Rolle zu spielen. So sind Rotkehlchen desorientiert, wenn ihre Augen durch matte Scheiben abgedeckt waren. Diese Scheiben sind zwar lichtdurchlässig, ermöglichen aber kein Kontursehen (Stapput et al. 2010). Dies lässt auf eine Beteiligung des visuellen Bildes am Magnetkompass schließen.

Einen dritten Hinweis auf die Lokalisation im Auge ergeben Ableitungen und neuronale Aktivitätsmarker, die in bestimmten optischen Zentren des Gehirns nach magnetischer Reizung neuronale Aktivität anzeigen. So haben elektrophysiologische Untersuchungen an Tauben und an amerikanischen Reisstärklingen (*Dolichonyx oryzivorus*) gezeigt, dass der *nBOR* (nucleus of the basic optic root) und das Tectum opticum auf Richtungsänderungen des Magnetfeldes reagieren (Semm et al. 1984, Semm & Demaine 1986, Beason & Semm 1987). Auch Studien mit neuronalen Markierungen wie ZENK oder C-FOS zeigen bei nachtaktiven Zugvögeln während der Zugzeit eine neuronale Aktivität im Cluster N, einem Teil des visuellen Wulstes, die bei Abdeckung der Augen verschwindet⁴ (Mouritsen et al. 2005; Liedvogel et al. 2007a, Heyers et al. 2007).

2.1.3 Das Radikalpaar-Modell

Das Modell des chemischen Kompasses wurde 1986 von Schulten & Windemuth vorgeschlagen, im Jahr 2000 von Ritz et al. erweitert und erstmalig für biologische Experimente testbar gemacht. Das Radikalpaar-Modell basiert darauf, dass Radikalpaare in der Lage sind, mit dem Magnetfeld zu interagieren. Um ein Radikalpaar zu bilden, muss ein Makromolekül zunächst durch Zufuhr von Energie beispielsweise durch Photonenabsorption in einen angeregten Zustand übergehen, anschließend werden durch einen Elektronentransfer die Radikalpaare gebildet. Sie können in zwei unterschiedlichen Zuständen auftreten, die ineinander übergehen: Singulett- und Triplett-Zustand. Beim Singulett-Zustand ist der Elektronenspin entgegengesetzt ausgerichtet, während er beim Triplett-Zustand parallel ausgerichtet ist. Diese beiden Zustände liegen in einem chemischen Gleichgewicht vor (Abb. 2.5). Je nach Winkel des Radikalpaars zum Magnetfeldvektor verschiebt sich das Verhältnis der beiden Zustände zueinander.

⁴ Versuche an tag- und nachtziehenden Wiesenpiepern (*Anthus pratensis*) zeigen neuronale Aktivitäten des Cluster N nur bei wenig Licht und nicht bei vollem Tageslicht (Zapka et al. 2010). Dass die Aktivität in Cluster N eine reine Beteiligung an der Zugsteuerung ist, konnte durch Verhaltensversuche, bei denen Cluster N operativ zerstört wurde, ausgeschlossen werden. Die betroffenen Rotkehlchen konnten sich nicht mehr mit dem Magnetkompass orientieren, mit dem Sonnenkompass allerdings schon (Zapka et al. 2009).

Struktur der Magnetrezeptoren im Auge: **Einleitung**

Die Produkte dieser Radikalpaare verhalten sich chemisch unterschiedlich und können so zum Ablesen der magnetischen Richtung genutzt werden. Dieses Modell lässt sich gut mit dem Inklinationskompass der Vögel vereinen, denn Radikalpaar-Prozesse zeigen lediglich axiale Richtungen des Magnetfeldes an.

Der Radikalpaar-Prozess kann durch ein oszillierendes Feld im Megahertz-Bereich gestört werden (Ritz et al. 2000, 2004). Seit 2004 wurde in verhaltensbiologischen Experimenten an Rotkehlchen gezeigt, dass im Versuch mit oszillierenden Feldern einer Frequenz von 7,0 MHz und 1,315 MHz im Winkel von 24° zum Vektor des Erdmagnetfeldes der Magnetkompass nicht mehr funktioniert (Ritz et al. 2004, Thalau et al. 2005). Dies wurde als Nachweis gewertet, dass der Magnetkompass der Vögel auf einem Radikalpaar-Mechanismus basiert.

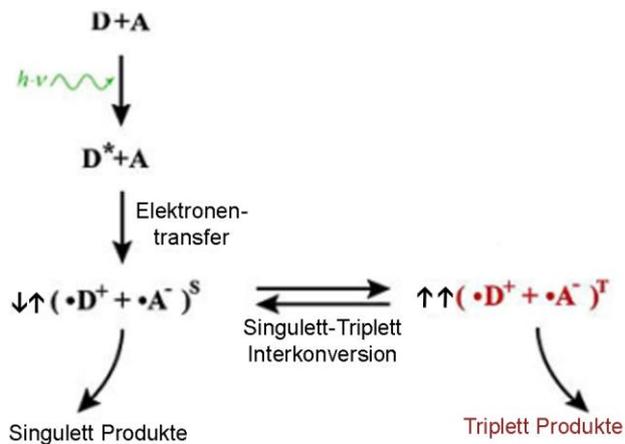


Abb. 2.5 Das Radikalpaar-Modell. Donor D und Akzeptor A werden durch ein Photon in einen angeregten Zustand versetzt, und ein Singulett-Radikalpaar wird gebildet. Dieses kann dann in den Triplett-Zustand übergehen. Diese beiden Zustände gehen ein chemisches Gleichgewicht zueinander ein. Ist die Inklination des Magnetfeldes parallel zu diesem Radikalpaar, verschiebt sich dieses Gleichgewicht. Aus beiden Zuständen können sich Folgeprodukte bilden, deren Menge ausgewertet werden könnte (aus Ritz et al. 2000).

Ritz et al. (2000) überlegten auch, wie das Muster aussehen müsste, das durch einen Radikalpaar-Prozess auf der Retina entstehen würde. Das erwartete Muster ist zentralsymmetrisch um die Feldlinien herum gruppiert. Das bedeutet, es würde dort ein dunkler (oder hellerer) Fleck entstehen, an der die Feldlinie die Retina schneidet (Abb. 2.6 A). Um eine solche Verteilung auslesen zu können, müssen vermutlich verschiedene Stellen der Retina, die verschiedene Winkel zum Magnetfeldvektor einnehmen, miteinander verglichen werden. Dieses Muster ist allerdings auch abhängig von der Magnetfeldstärke (Abb. 2.6 B).

Vermutlich muss jeder Mustertyp, der durch die verschiedenen Intensitäten des Magnetfeldes hervorgerufen wird, neu von den verarbeitenden Zentren im Gehirn interpretiert werden. Diese theoretischen Überlegungen passen gut zu den Befunden in den

Verhaltensversuchen: Rotkehlchen müssen erst etwas länger in einem Magnetfeld anderer Intensität verweilen, bis sie sich dort orientieren können (Vergleiche Abschnitt 2.1.1.1 und Abb. 2.1 B). Auch ist übereinstimmend, dass der Bereich dann nicht erweitert wird, da jedes Muster immer neu erlernt werden muss (W. Wiltschko 1978, W. Wiltschko et al. 2006).

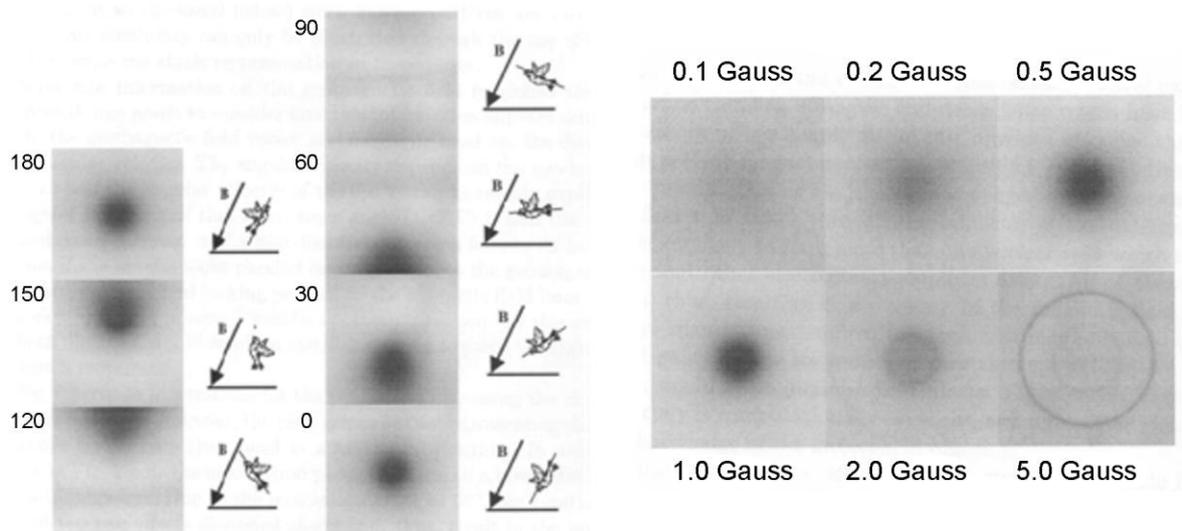


Abb. 2.6 Hypothetische Empfindlichkeitsmuster, die durch einen Radikalpaar-Mechanismus auf der Retina entstehen könnten. (A) Es entsteht ein dunkler Fleck an der Stelle, an der die Feldlinie die Retina schneidet. Die Position des Vogels variiert zum Magnetfeldvektor, und das Bild auf der Retina verschiebt sich mit. (B) Die Intensität des Magnetfeldes variiert, und das dadurch entstehende Muster ist unterschiedlich (aus Ritz et al. 2000).

2.1.4 Potenzielles Rezeptormolekül Cryptochrom

Schulten & Windemuth (1986) erwogen eine Beteiligung der Opsine am Magnetkompass der Vögel. Opsine sind zwar lichtsensitiv, bilden aber keine Radikalpaare. Bei Vertebraten sind die einzigen bekannten Photopigmente, die Radikalpaare bilden, Cryptochrome (Giovani et al. 2003, Biskup 2009). So postulierte Ritz et al. (2000) Cryptochrome als potenzielle Rezeptormoleküle, da auch damals schon bekannt war, dass die verwandten Photolyasen Radikalpaare bilden.

2.1.4.1 Aufbau und Vorkommen von Cryptochrom

Cryptochrome sind blaulicht-sensitive Proteine. Im gesamten Bakterien-, Pflanzen- und Tierreich gibt es fünf Klassen von blaulicht-sensitiven Photopigmenten (phylogenetischer Stammbaum der Cryptochrome und Photolyasen: siehe Anhang Abb. A 2.1, Zfg. van der Horst & Hellingwerf 2004). Die Photolyase/Cryptochrom-Familie ist die einzige, die sowohl bei Bakterien als auch bei Pflanzen und Tieren vorkommt.

In dieser Photolyase/Cryptochrom-Super-Familie gibt es wiederum eine Unterteilung in 5 verschiedene Unterfamilien. Bei den Photolyasen gibt es zwei: die CPD-Photolyasen (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren-Photolyasen) und die 6-4 Photolyasen. Photolyasen sind Proteine, die durch UV-Licht hervorgerufene DNA-Schäden reparieren (Ozer et al. 1995). Cryptochrome sind mit den 6-4 Photolyasen am nächsten verwandt, haben allerdings die Fähigkeit zur DNA-Reparatur verloren (Hsu et al. 1996; Zfg. Oztürk et al. 2007). Diese ultraviolett- (UV-A) und blaulicht-sensitiven Photopigmente wurden erst 1993 im

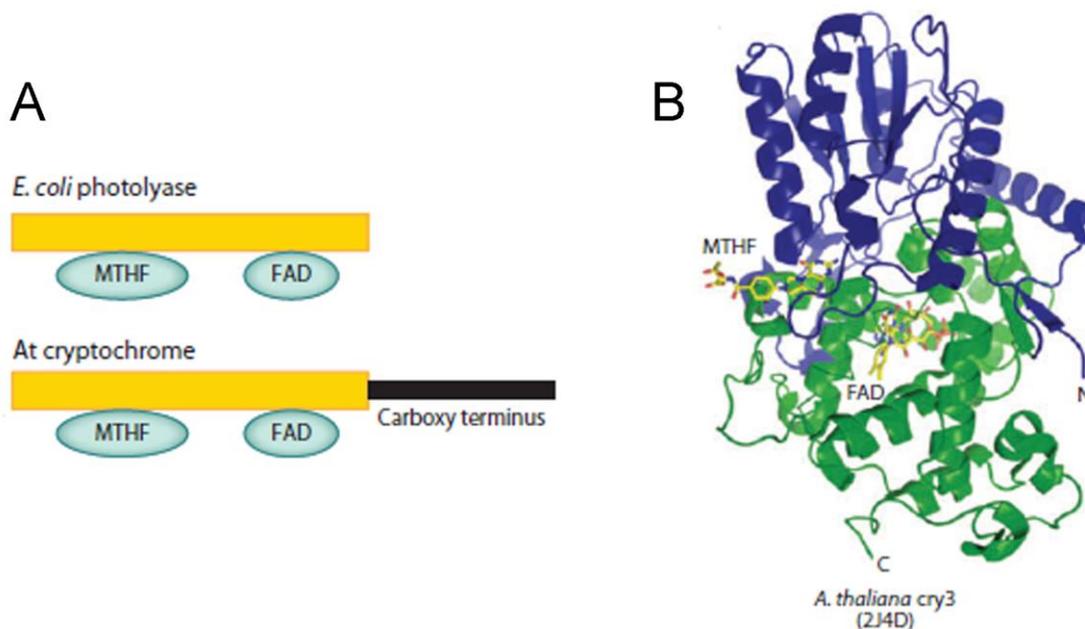


Abb. 2.7 Aufbau und Struktur von Cryptochrom. (A) Domänenstruktur von *A. thaliana*-Cryptochrom und einer *E. coli*-Photolyase im Vergleich. Der N-Terminus bindet das Antennenpigment MTHF. Dann folgt das katalytische FAD. Der C-Terminus ist bei Cryptochromen länger und auch völlig unterschiedlich zu dem der Photolyasen. (B) Theoretische Konformation des *A. thaliana*-Cryptochrom 3. Das Antennenpigment MTHF ist in Blau, der katalytische und photoreaktive C-Terminus in Grün dargestellt. In diesem ist auch das FAD gebunden (neu kombiniert aus Chaves et al. 2011).

Pflanzenreich entdeckt (Ahmad & Cashmore 1993). Da sie so spät gefunden wurden, wurden sie, abgeleitet von einem Spitznamen aus dem Laborjargon, Cryptochrom (von „kryptisch“) genannt. Mittlerweile sind Cryptochrome auch bei diversen Tieren nachgewiesen worden: bei Insekten (Ishikawa et al. 1999), Fischen (Kobayashi et al. 2000), Amphibien (Zhu & Green 2001), Säugetieren (Hsu et al. 1996) und auch bei verschiedenen Vögeln (Bailey et al. 2002; Haque et al. 2002, Möller et al. 2004, Mouritsen et al. 2004, Helfer et al. 2006; Zfg. z. B. Cashmore et al. 1999, Sancar 2003, Liedvogel & Mouritsen 2010).

Cryptochrome lassen sich in die Pflanzen-Cryptochrome, die Tier-Cryptochrome und die DASH-Cryptochrome⁵ aufteilen. Es gibt zwei Typen von Tier-Cryptochromen: die Insekten-Typ I- und die Mammalia-Typ II-Cryptochrome. Typ I-Cryptochrome sind lichtempfindliche circadiane Photopigmente. Typ II-Cryptochrome sind nicht lichtempfindlich und unterdrücken Transkription (Zfg. Lin & Shalitin 2003, Zfg. Lin & Todo 2005, Zfg. Oztürk et al. 2007, Zfg. Chaves et al. 2011).

Tier- und Pflanzen-Cryptochrome sind mit den 6-4-Photolyasen in ca. 500 Aminosäuren fast identisch. Diese homologe Region von Cryptochromen zu Photolyasen wird die PHR-Region

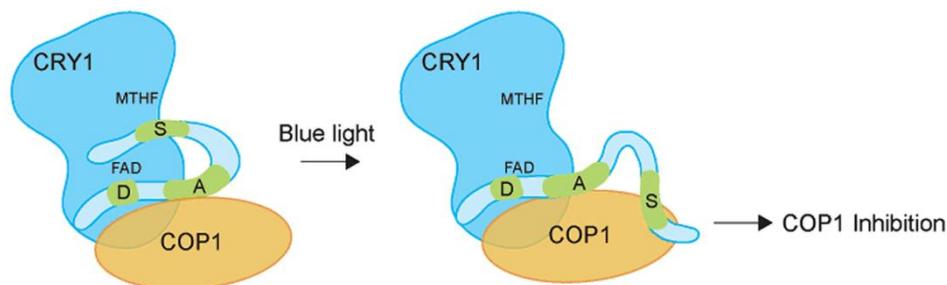


Abb. 2.8 Konformationsänderung des *Arabidopsis*-Cryptochroms (atCry1) nach Lichtaktivierung. Nach Lichtaktivierung löst sich die Bindung zwischen einem Teil des STAESS-Motivs mit der PHR-Region des Cryptochroms, vollzieht eine Konformationsänderung und bindet an COP1, welches dadurch gehemmt wird. COP 1 unterdrückt die Lichtsignaltransduktion in Pflanzen während der Dunkelheit. DAS – DQXVP-acidic-STAESSS, STAESS – Ser-Thr-Ala-Glu-Ser-Ser-Ser (aus Partch et al. 2005).

genannt (Photolyase Homologe Region), die aus einem Photo-Antennenpigment, dem Folat (Methenyltetrahydrofolat (MTHF)) und dem katalytischen Chromophor, dem Flavin (FAD)⁶ besteht. MTHF absorbiert Licht im Bereich von 360 nm, wird bei Cryptochromen allerdings nur theoretisch angenommen. Flavin ist im volloxidierten Zustand blaulicht-sensitiv (450 nm) und in seiner Semichinonform blau-, grün- und teilweise gelblicht-sensitiv (siehe auch Abschnitt 2.5.1.1). Das Flavin bildet innerhalb des gesamten Redox-Zyklus an zwei Stellen Radikalpaare (siehe auch Abschnitt 2.6.5, Zfg. Chaves et al. 2011, Müller & Ahmad 2011). Daran anschließend folgen bei Cryptochromen aus dem Pflanzen- und Tierreich 30 bis 250 Aminosäuren als C-Terminale Region (Abb. 2.7 A, Zfg. Chaves et al. 2011). Diese C-Terminale Region ist der signalgebende Teil des Cryptochroms. Bei Lichtaktivierung des

⁵ DASH steht für *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und *Homo*. DASH-Cryptochrome sind bei Cyanobakterien bekannt geworden. Sie unterscheiden sich am stärksten von den anderen Unterfamilien der Photolyase/Cryptochrom-Familie. DASH-Cryptochrome reparieren wie Photolyasen DNA, allerdings einzelsträngige DNA (ssDNA), ihre weitere Funktion ist unbekannt (Selby & Sancar 2006).

⁶ Photolyasen haben teilweise ein zweites Antennenpigment, das 8-Hydroxy-7,8-Didemethyl-5-Deazariboflavin (8-HDF), das im Bereich von 420 nm absorbiert.

Flavins vollzieht der C-Terminus eine Konformationsänderung. Er ist erst innerhalb des Proteins gebunden, kommt dann an die Oberfläche und interagiert dort mit einem weiteren Protein, um beispielsweise eine Signalkaskade anzustoßen. Dieser Vorgang ist in Abb. 2.8 am Beispiel von *Arabidopsis*-Cryptochrom 1 (atCry1) gezeigt (Partch et al. 2005, Laubinger 2006).

2.1.4.2 Cryptochrom-gesteuerte Vorgänge

Bei Pflanzen sind Cryptochrome an der Steuerung von Wachstum und anderen Entwicklungsprozessen wie beispielsweise Hypokotylwachstum, Blühinduktion und Steuerung von Transkriptionsfaktoren beteiligt (Ahmad & Cashmore 1993; Lin et al. 1998; Zfg. Lin 2002). Auch bei Tieren ist eine Beteiligung an der Steuerung von circadianen Rhythmen bekannt (Zfg. Oztürk et al. 2007). Hier wirken Cryptochrome sowohl als fotosensitive Proteine (Typ I), beispielsweise bei der inneren Uhr von *Drosophila*,⁷ als auch als nicht-fotosensitive Proteine (Typ II) in einem für circadiane Prozesse, beispielsweise bei der inneren Uhr von Mäusen⁸, typischen negativen Feedbackloop (Zfg. Cashmore 2003, Zfg. Sancar 2003; Zfg. Chaves et al. 2011).

Beim Monarchschmetterling (*Danaus plexippus*) wurde eine Beteiligung von Cryptochromen (Typ I) an der Steuerung des Sonnenkompasses gefunden (Zfg. Kyriacou 2009). Beim Sonnenkompass allgemein gilt, dass der Stand der Sonne nur Richtungen vorgeben kann, wenn dieser mit der Tageszeit und der Jahreszeit verrechnet werden kann, da die Sonne ihren Stand am Himmel sowohl über den Tag als auch über das Jahr verändert. In Verbindung mit Magnetfeldrezeption sind cryptochrom-gesteuerte Vorgänge aus dem Pflanzenreich von *Arabidopsis thaliana* und aus dem Tierreich von *Drosophila melanogaster* bekannt. Bei *A. thaliana* wurde ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Intensität des Magnetfeldes und der Länge des Hypokotylwachstums beobachtet. Eine Erhöhung der Intensität des Magnetfeldes unter blauem Licht bewirkte eine Hemmung des Hypokotylwachstums. Unter rotem Licht oder in Dunkelheit und auch bei Cry-Defekt-Mutanten trat dieser Effekt nicht auf. Dies legt nahe, dass die hier beobachtete Magnetfeldsensitivität durch Cryptochrom vermittelt wurde (Ahmad et al. 2007). Harris et al.

⁷ Die circadiane Uhr der *Drosophila* funktioniert durch mehrere ineinandergeschaltete negative Feedbackloops der circadianen Proteine CYCLE und CLOCK so wie TIM (timeless) und PER (period). CYCLE und CLOCK wirken auf die Transkription von TIM und PER, diese zusammen unterdrücken wiederum die Transkription von CYCLE und CLOCK und damit auch ihre eigene. Das lichtaktivierte Typ I-Cryptochrom der *Drosophila* wirkt auf TIM (timeless) und unterstützt dessen Abbau. Die Transkription des Cryptochroms wird hier wiederum von CYCLE und CLOCK gesteuert.

⁸ Knockout-Mäuse zeigen in Abhängigkeit der Expression von Cry1 oder Cry2 eine längere bzw. kürzere Tagesrhythmik. Werden beide Proteine nicht exprimiert, sind Mäuse komplett arrhythmisch. Beide Cryptochrome wirken zusammen mit PER in einem negativen Feedbackloop unterdrückend auf CLOCK und BMAL, die wiederum die Translation von CRY und PER und einen zweiten negativen Feedbackloop steuern (Zfg. Cashmore 2003, Zfg. Sancar 2003; Zfg. Chaves et al. 2011).

(2009) konnte diesen Versuch nicht reproduzieren. Bei *Drosophila* wurde ein durch Cryptochrom vermittelter Zusammenhang zwischen der inneren Uhr und dem Magnetfeld nachgewiesen. Fruchtfliegen wurden unter verschiedenen Licht- und Magnetfeldbedingungen auf ihre Tagesrhythmik hin untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass diese sich in verschiedenen Magnetfeldbedingungen unter blauem Licht verändert, unter rotem Licht und bei Cryptochrom-Mutanten nicht. Dies wird so interpretiert, dass die circadiane Uhr von Fruchtfliegen durch Cryptochrom magnetsensitiv ist (Yoshii et al. 2009).

2.1.4.3 Cryptochrome als potenzielles Rezeptormolekül für den Magnetkompass bei Vögeln

Bei Vögeln sind vier verschiedene Cryptochrome bekannt: Cryptochrom 2, Cryptochrom 4 und zwei Spliceprodukte von Cryptochrom 1: 1a und 1b (Bailey et al. 2002, Haque et al. 2002, Mouritsen et al. 2004, Möller et al. 2004, Watari et al. 2012). Auf der Suche nach einem potenziellen Kandidaten für das Rezeptormolekül für den Magnetkompass wurde Cryptochrom 2 auf Grund eines Kern-Lokalisierungssignals als ein kernlokalisiertes Protein eingestuft (Möller 2006). Da ein Rezeptormolekül im Zellkern kein neuronales Signal generieren kann, ist Cryptochrom 2 als potenzielles Rezeptormolekül für den Magnetkompass nicht wahrscheinlich. Cryptochrom 4 ist hauptsächlich in den Ganglienzellen, aber auch in verschiedenen Interneuronen der inneren Körnerschicht und im Pigment lokalisiert. Welche potenzielle Funktion es dort übernimmt, ist nicht bekannt (Watari et al. 2012). Cryptochrom 1 wurde bei Gartengrasmücken in der Zugzeit in den Ganglien- und in deplatzierten Ganglienzellen in der Retina nachgewiesen. Bei nomadisch lebenden Zebrafinken konnte kein Cryptochrom 1 in den Ganglienzellen oder deplatzierten Ganglienzellen nachgewiesen werden (Mouritsen et al. 2004). In dieser Studie wurde allerdings nicht zwischen Cry1a und Cry1b unterschieden. 2006 wurde von Möller Cry1b in den Innensegmenten der Fotorezeptoren von Rotkehlchen beschrieben. In diesen beiden Studien wurde das beschriebene Cryptochrom als mögliches Rezeptormolekül für den Magnetkompass diskutiert. Allerdings eignen sich sowohl Ganglienzellen als auch das Innensegment nach den Bedingungen des Radikalpaar-Modells (Abschnitt 2.1.5) eher nicht, um den Rezeptormolekülen des Magnetkompasses die notwendige Ausrichtung zu ermöglichen. Eine mögliche Bindung an bestimmte Zellbestandteile und somit eine potenzielle Ausrichtung wurden in beiden Studien nicht untersucht.

2.1.5 Problemstellung

Um als Rezeptormolekül für den Magnetkompass nach dem Radikalpaar-Mechanismus (siehe 2.1.3) wirken zu können, müssen neben der Lichtsensitivität und dem Vermögen der

Radikalpaar-Bildung noch andere Kriterien erfüllt sein (Ritz et al. 2000, Ritz et al. 2010). Für die Wirkung als magnetsensitives Molekül ist auch die Lebensdauer des Radikalpaares entscheidend. Maeda et al. (2008) konnten zeigen, dass bei Cryptochromen die Ausbeute von Singulett- und Triplett-Produkten durch die Stärke des Erdmagnetfeldes beeinflusst werden kann. Daraus kann man unter anderem schließen, dass die Lebensdauer des Radikalpaares ausreichend ist. Für die Lokalisation des potenziellen Rezeptormoleküls nach dem Radikalpaar-Mechanismus (Ritz et al. 2000) müssen die folgenden strukturellen Kriterien erfüllt sein:

1. Licht muss das Rezeptormolekül erreichen können,
2. die Rezeptormoleküle innerhalb einer Rezeptorzelle müssen alle in dieselbe Richtung fixiert sein,
3. die Rezeptorzellen in ihrer Gesamtheit müssen alle Raumrichtungen abdecken, und
4. die Rezeptormoleküle/Rezeptoren müssen die Möglichkeit haben, ein Rezeptorpotential auszulösen.

Diese vier Kriterien bilden die Grundlage meiner histologischen Studien in diesem Abschnitt meiner Arbeit. Ziel war es, ein Cryptochrom zu finden, das diese Bedingungen in seiner Lokalisation erfüllt und damit als Rezeptormolekül für den Magnetkompass infrage kommt. Daraus resultierten die folgenden Fragestellungen:

- Erfüllt Cry1b in seiner Lokalisation innerhalb der Retina, aber besonders innerhalb der Zelle die oben aufgeführten Kriterien?
- In welchen Zellen und wo innerhalb der Zelle ist Cry1a lokalisiert, und erfüllt dieses Cryptochrom die oben aufgeführten Kriterien?
- Falls eine der beiden Cry1-Splice-Varianten die Bedingungen erfüllt, resultieren für meine Arbeit daraus folgende Fragestellungen:
 - Ist die Konformationsänderung des Proteins durch einen Antikörper *in situ* nachweisbar?
 - Bei welchen monochromatischen Wellenlängen des Lichts vollzieht das potenzielle Rezeptormolekül eine Konformationsänderung, und stimmen diese mit dem Flavin-Zyklus überein?
 - Hat die Intensität des monochromatischen Lichtes einen Einfluss auf die Aktivierung des Proteins?
 - Wie lassen sich diese histologischen Ergebnisse mit der bekannten Wellenlängenabhängigkeit des Magnetkompasses (Abschnitt 2.1.1.2) in Übereinstimmung bringen?

2.2 Material und Methode

Die verwendeten Materialien wie Chemikalien, primäre und sekundäre Antikörper (Anhang Tab. A 1.1 - A 1.4) und auch die verwendeten Proben sind im Anhang (Tab. A 1.5 und A 1.6) aufgeführt. Ebenso die Beschreibung der Systematik und Lebensweise von Hühnern und Rotkehlchen (Anhang A 1.2).

2.2.1 Retina-Präparation

Für alle Teilstudien zusammengenommen wurden die Retinae von 79 Hühnern und 7 Rotkehlchen getestet. Die in dieser Arbeit verwendeten Rotkehlchen sind Zugvögel, Durchzügler vermutlich aus Skandinavien, die im Herbst im Botanischen Garten der Goethe-Universität in Frankfurt mit Japannetzen gefangen wurden. Es handelte sich ausschließlich um Jungvögel auf ihrem ersten Zug.

2.2.1.1 Lokalisation von Cry1a und Cry1b

Für die histologischen Studien zur Lokalisation von Cry1a und Cry1b wurden die Retinae von 20 Hühnern und die der 7 Rotkehlchen verwendet. Die Hühner wurden zu verschiedenen Tageszeiten abgetötet, meistens morgens und mittags, aber auch ein Exemplar um 21:00 Uhr und eines um 2:30 Uhr (siehe Anhang Tab. A 1.5). Drei der Rotkehlchen wurden vorab in verschiedenen verhaltensbiologischen Versuchen getestet und erst anschließend abgetötet. Diese drei Rotkehlchen wurden bereits Anfang Januar physiologisch in Zugunruhe versetzt. Dies geschieht, in dem die Tageslänge künstlich auf 13 Stunden Licht verlängert wird (z. B. W. Wiltschko & Wiltschko 2001). Von diesen drei Rotkehlchen befanden sich zwei, nämlich RK A2 und RK A6, am Tag der Tötung dadurch nicht mehr in Zugunruhe. Sie wurden abends um 20:00 Uhr und mittags um 13:00 Uhr abgetötet. Das dritte Tier, RK A4, verstarb während der Verhaltensversuche tageszeitlich um 17:30 Uhr und befand sich folglich in Zugstimmung. Drei Rotkehlchen wurde bereits im Herbstzug abgetötet, eines davon, nämlich RK A7, direkt nach der Entnahme aus der Natur. RK A7 wurde um 8:00 Uhr, RK A5 um 12:00 Uhr und RK A1 um 19:30 Uhr abgetötet. Rotkehlchen A3 wurde im natürlichen Frühjahrszug nach einem tödlichen Unfall die Retina entnommen (siehe Anhang Tab. A 1.5)⁹. Sowohl die Rotkehlchen als auch die Hühner wurden durch eine Überdosis Narcoren (Merial GmbH) in eine finale Narkose versetzt. Die Rotkehlchen, die tödlich verunglückt waren, und Hühner, die in einer landwirtschaftlichen Schlachtung getötet wurden, waren gerade verstorbene Tiere, bei denen es noch nicht zu Veränderungen durch enzymatische Gewebeverdauung gekommen war.

⁹ Das Abtöten der Rotkehlchen wurde genehmigt unter 7922-1.62-EA 07-0005 von der Naturschutzbehörde in Frankfurt am Main, das der Hühner unterliegt § 4 Teil 3 des Tierschutzgesetzes.

2.2.1.2 Bestimmung der Menge von lichtaktiviertem Cry1a

Für die Studie zur Bestimmung der Menge von lichtaktiviertem Cry1a wurden die Retinae von 59 Hühnern entnommen (siehe auch Tab. 2.1 und Anhang Tab. A 1.6), die für 30 Minuten einer definierten Lichtbedingung ausgesetzt waren¹⁰. Die Tiere wurden vorher im Tageslicht gehalten bzw. in einigen Tests für 30 Minuten im Dunkeln. Der Versuchsaufbau entspricht dem, der in Verhaltensversuchen mit Rotkehlchen verwendet wird (z. B. R. Wiltschko et al. 2007). Die LEDs sind in eine Scheibe eingelassen, die oben auf dem Versuchsaufbau liegt. Das Licht wird durch zwei Diffusoren geleitet, um eine gleichmäßige

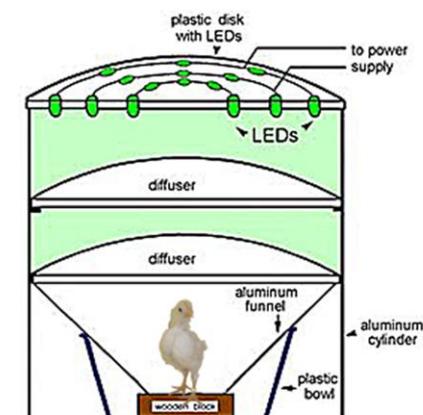


Abb. 2.9 Versuchsaufbau zur Beleuchtung mit monochromatischen Lichtern. Oben befindet sich eine Scheibe mit den eingelassenen LEDs, das Licht wird dann über zwei Diffusoren in den Erlen-Trichter geleitet, in dem das Tier sitzt. Der gesamte Aufbau ist von einer lichtundurchlässigen Tonne umgeben (verändert nach R. Wiltschko et al. 2007).

Beleuchtung zu garantieren. Der Vogel sitzt im unteren Bereich. Der gesamte Aufbau ist von einer lichtundurchlässigen Tonne umgeben (Abb. 2.9). Der Versuchsraum selbst ist ebenfalls dunkel. Die Hühner wurden für 30 bzw. 60 Minuten im Versuchsaufbau belassen (siehe Tab. 2.1). Zur Vermeidung von Adaptationsvorgängen wurden die Lichtbedingungen über den Tod der Versuchstiere hinaus beizubehalten. Hierfür wurden sie nach der finalen Narkose mit einer Überdosis des Betäubungsmittels Narcoren wieder in die Versuchsanlage gelegt und erst nach Eintreten des Todes daraus entnommen. Auch die Präparation wurde unter der jeweiligen LED-Scheibe durchgeführt – bei dunkler oder ultravioletter Bedingung allerdings bei schwachem Rotlicht.

Um die höchsten Intensitäten der jeweiligen monochromatischen Lichter zu erreichen, wurden die beiden Diffusoren im Versuchsaufbau weggelassen. Die Emissionsmaxima der verwendeten LEDs liegen für UV (HR 370F, Lasertechnik) bei 373 nm, für Blau (OL-UB 34180, Börsig) bei 424 nm, für Türkis (HLMP-CE 30, Lasertechnik) bei 502 nm, für Grün (HLMP-3950HP, Mütron) bei 565 nm, für Gelb (182885, Conrad) bei 590 nm und für Rot (182249, Conrad) bei 645 nm (siehe auch Abb. 2.2; Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2005).

¹⁰ Die Belichtung der Hühner wurde unter V54-19c 20/15-F 104/58 vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

Die Intensität wurde mit einem Optometer (P9719 Gigahertz Optik mit RW-3703-2) gemessen.

Tab. 2.1 Lichtbedingungen, in denen die Hühner adaptiert wurden.

Vorbehandlung	Behandlung	Wellenlänge in nm	Wellenlänge mit halber Intensität	Intensität in quanta s ⁻¹ m ⁻²	Dauer der Behandlung	Abkürzung	Anzahl getesteter Tiere
Tageslicht	Dunkelheit	----			30 min	D	3
Tageslicht	Sonne	----			30 min	S	3
Tageslicht	UV	373 nm	368, 381	0,8 x 10 ¹⁵	30 min	UV ^{XS}	3
Tageslicht	UV	373 nm	368, 381	8 x 10 ¹⁵	30 min	UV ^S	4
Tageslicht	UV	373 nm	368, 381	20 x 10 ¹⁵	30 min	UV ^M	1
Tageslicht	Blau	424 nm	403, 459	8 x 10 ¹⁵	30 min	B ^S	2
Tageslicht	Blau	424 nm	403, 459	54 x 10 ¹⁵	30 min	B ^L	2
Tageslicht	Blau	424 nm	403, 459	200 x 10 ¹⁵	30 min	B ^{XL}	1
Tageslicht	Türkis	502 nm	486, 518	8 x 10 ¹⁵	30 min	T ^S	3
Tageslicht	Türkis	502 nm	486, 518	54 x 10 ¹⁵	30 min	T ^L	4
Tageslicht	Türkis	502 nm	486, 518	230 x 10 ¹⁵	30 min	T ^{XL}	1
Tageslicht	Grün	565 nm	550, 583	8 x 10 ¹⁵	30 min	G ^S	4
Tageslicht	Grün	565 nm	550, 583	54 x 10 ¹⁵	30 min	G ^L	3
Tageslicht	Grün	565 nm	550, 583	230 x 10 ¹⁵	30 min	G ^{XL}	2
Tageslicht	Gelb	590 nm	571, 604	8 x 10 ¹⁵	30 min	Y ^S	2
Tageslicht	Rot	645 nm	625, 666	8 x 10 ¹⁵	30 min	R ^S	3
Tageslicht	UV	373 nm	368, 381	0,8 x 10 ¹⁵	1 h	1hUV ^{XS}	2
Tageslicht	Blau	424 nm	403, 459	8 x 10 ¹⁵	1 h	1hB ^S	2
Tageslicht	Türkis	502 nm	486, 518	8 x 10 ¹⁵	1 h	1hT ^S	2
Tageslicht	Grün	565 nm	550, 583	8 x 10 ¹⁵	1 h	1hG ^S	2
Dunkelheit	UV	373 nm	368, 381	0,8 x 10 ¹⁵	30 min	D/UV ^{XS}	2
Dunkelheit	Blau	424 nm	403, 459	8 x 10 ¹⁵	30 min	D/B ^S	2
Dunkelheit	Türkis	502 nm	486, 518	8 x 10 ¹⁵	30 min	D/T ^S	2
Dunkelheit	Grün	565 nm	550, 583	8 x 10 ¹⁵	30 min	D/G ^S	2
Dunkelheit	UV	373 nm	368, 381	0,8 x 10 ¹⁵	5 min	D/5minUV ^{XS}	2

2.2.2 Fixierung

Die Fixierung der Retinae für lichtmikroskopische Immunfärbungen erfolgte nach der Entnahme im Augenbecher in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M Phosphatpuffer (Phosphat buffer Saline, PBS, pH 7.4) für 4 Stunden bei Raumtemperatur, die für die immunhistologische Studie am Elektronenmikroskop auch in 2% Paraformaldehyd (PFA), 0,25% Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer. Die Proben werden in den korrespondierenden Puffern gewaschen. Um transversale Schnitte am Kryostat (Schnittdicke 12-15 µm) anfertigen zu können, werden die Retinae in Saccharose (10%, 20%, 30% in PBS) überführt und in Tissue Freezing Medium (Sakura) eingebettet, anschließend auf Super-Frost-Plus-Objektträger aufgeschmolzen und bei -20°C gelagert. Retinae für Whole Mounts wurden möglichst schnell weiterverarbeitet, Retinae für die immunhistologische elektronenmikroskopische Studie in Agarose eingebettet und am Vibratom geschnitten (Schnittdicke 60-100 µm). Diese Schnitte wurden in Saccharose (10%, 20%, 30% in PBS) inkubiert, dann

zum Aufbrechen der Membranen dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert.

Für die Western Blot-Studien wurden die Retinae und die Zunge des gleichen Tieres als Kontrolle direkt in RIPA-Puffer lysiert oder nach Anleitung in ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit Manual (Calbiochem) fraktioniert.

2.2.3 Primäre Antikörper

1. Anti-Cry1b (GEN): Cry1b-Antiserum aus *Rabbit* (auf Bestellung produziert von GENOVAC GmbH, Freiburg, Germany), gegen die Aminosäuren Aa 577-587: CNYGK PDKTS K.

2. Anti-Cry1b (Bio): Cry1b-Antiserum aus *Rabbit* (auf Bestellung produziert von Firma BioScience Göttingen, Germany), gegen die Aminosäuren Aa 577-587: CNYGK PDKTS K (charakterisiert in Möller 2006). Beide Antikörper gegen Cry1b sind durch Western Blots getestet und für spezifisch befunden worden.

3. Cry1a-Antiserum aus *Guinea pig* (auf Bestellung produziert von GENOVAC GmbH, Freiburg, Germany), gegen die Aminosäuren 601-621 von Cry1a: RPNPE EETQS VGPKV QRQST. Diese Peptidsequenz ist im Hühner- und Rotkehlchen-Cry1a identisch (Yamamoto et al. 2001; Möller et al. 2004). Durch Western Blot-Analysen ist sichergestellt, dass dieser Antikörper bei Rotkehlchen und Hühnern spezifisch für Cry1a ist.

4. Antiserum sc-14363 aus *Goat*, gegen 20-aa N-Terminal Epitop von human-S-(blau)-Zapfen-Opsin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), charakterisiert von Schiviz et al. (2008). Phylogenetisch ist das Blau-Zapfen-Opsin (S) der Säuger homolog zum UV/V (SWS1) Opsin der Vögel (Hart & Hunt 2007); die Sequenz des verwendeten sc-14363-Antikörper ist der Sequenz der UV/V-Zapfen-Op sine der Vögel sehr ähnlich, den anderen Opsinen der Vogel-Zapfen allerdings nicht (siehe Tab. 2.2). Auch ein anderer Antikörper gegen Säuger-S-Opsin CERN 933 färbt bei Hühnern den Violett-Zapfen (Seydewitz et al. 2004).

5. Antiserum JH492 aus *Rabbit*, gegen das C-Terminale Epitope von human-M/L-Zapfen-Opsin (J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore; charakterisiert in Wang et al. (1992). In Vögeln sollte dieser Antikörper das Rot-Zapfen-(LWS)-Opsin markieren, allerdings sind Kreuzreaktionen mit dem Grün-Zapfen-(MWS)-Opsin wahrscheinlich.

Tab. 2.2 Vergleich der Aminosäuren des Epitops des Säuger-SWS1-Zapfen-Opsin-Antikörpers (sc-14363) mit den Sequenzen der verschiedenen Zapfen vom Huhn und stellvertretend für das Rotkehlchen denen des Kanarienvogels (*Serinus canaria*). Die Aminosäuresequenzen der Rotkehlchen-Opsine sind nicht bekannt. In Rot sind die Übereinstimmungen der AS markiert. Die meisten Übereinstimmungen ergeben sich sowohl beim Huhn als auch beim Kanarienvogel im UV/V-Opsin (Nießner et al. 2011).

Opsin	Teilsequenz	GenBank
Epitop von Antikörper sc-14363	EFYLFKNISSVGPWDGPQYH	
<i>Gallus gallus</i> , UV/V-Zapfen-Opsin (AA 6-25)	DFYLF TNGS-V PGPW DGPQYH	NP_990769.1
<i>Gallus gallus</i> , Blau-Zapfen-Opsin (AA 13-37)	DFY IPMALDAPNITALSPFLV PQ TH	NP_990848.1
<i>Gallus gallus</i> , Grün-Zapfen-Opsin (AA 8-30)	NFY VPMSNKTGVVRS PFEY PQYY	NP_990821.1
<i>Gallus gallus</i> , Rot-Zapfen-Opsin (AA 24-43)	VFTYTNSN TRGPFEG PNYH	NP_990771.1
<i>Serinus canaria</i> , UV/V-Zapfen-Opsin (AA 5-24)	EFYLF KNQSS VGPW DGPQYH	CAB91993.1
<i>Serinus canaria</i> , Blau-Zapfen-Opsin (AA 1-19)	NLDTPNVTALSPFLV PQ TH	CAB91994.1
<i>Serinus canaria</i> , Grün-Zapfen-Opsin (AA 1-19)	PMSNKTGVVRS PFEY PQYY	CAB91995.1
<i>Serinus canaria</i> , Rot-Zapfen-Opsin (AA 1-19)	FTYTNSN TRGPFEG PNYH	CAB91996.1

2.2.4 Lichtmikroskopische Immunhistologie

Um den gesamten Fotorezeptor (bestehend aus Zellkern, Innensegment und Außensegment) in der Immunfluoreszenz sichtbar zu machen, kann sowohl bei Kryoschnitten wie auch bei Whole Mounts vorab das Schirmpigment gebleicht werden (5 ml 1.8% NaCl in Aqua dest., 4 ml 30% H₂O₂, 1 ml Aqua dest., 1 Tropfen NH₃ etwa 20-30 min (Hemmi & Grünert 1999)). Dies wurde sowohl für die lichtmikroskopischen Studien von Cry1a als auch für die von Cry1b gemacht. Da Cry1b allerdings durch seine Lokalisation nicht vom Schirmpigment verdeckt wird, ist das Schirmpigment in den gezeigten Bildern nicht gebleicht. Die Chemikalien werden anschließend mit PBS entfernt, und die Proben werden in 10% Normal-Donkey-Serum (NDS) in 0.25% Triton X-100, 2% Bovine-Serum-Albumin (BSA) in PBS für 60 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Der primäre Antikörper wurde über Nacht (in 3% NDS, 0.25% Triton X-100, 2% BSA, in PBS) bei 4°C in den folgenden Konzentrationen inkubiert:

- Cry1a-Antiserum aus *Guinea pig* (1:100, nach einer Aufreinigung 1:500),
- Antiserum sc-14363 aus *Goat* (1:500),
- Antiserum JH492 aus *Rabbit* (1:10000),
- Cry1b-Antiserum aus *Rabbit* (GEN) (1:100) und
- Cry1b-Antiserum aus *Rabbit* (Bio) (1:1000).

Um den primären Antikörper zu visualisieren, wurde nach wiederholtem Waschen am nächsten Tag für eine Stunde bei RT der zweite Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen

CY5, CY3 oder Rhodamin Red-X (Dianova, Hamburg, in 3% NDS, 0.25% Triton X-100, 2% BSA, in PBS) inkubiert. Die Schnitte wurden mit Aqua-Poly-Mount (Polysciences Europe) eingedeckt und mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (Zeiss Typ 510 META) ausgewertet.

Bei den Retina-Whole Mounts wurde das oben beschriebene immunhistologische Protokoll ohne Fixierung am Objektträger (frei schwimmend) durchgeführt. Hierfür entfernt man vorab das Pecten und verlängert die Waschschrte deutlich. Die Proben wurden anschließend mit der Fotorezeptor-Seite nach oben mit Aqua-Poly-Mount (Polysciences Europe) eingedeckt und mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (siehe oben) ausgewertet.

2.2.4.1 Kontrollen der lichtmikroskopischen Immunhistologie

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. (1) Bei der Kontrolle durch Prä-Immunsrum wird der primäre Antikörper durch das entsprechende Serum ersetzt, das dem gleichen Tier vor der Immunisierung mit dem Antigen entnommen wird. Hierbei werden unspezifische Reaktionen durch Antikörper, die bereits im Blutserum des verwendeten Tieres vorhanden waren, sichtbar. (2) Zur weiteren Kontrolle, ob Bestandteile des Serums außer dem primären Antikörper an Proteine der Vogelretina binden, wird der primäre Antikörper mit dem entsprechenden Antigen zusammengegeben. Hierdurch wird nur der spezifische Antikörper gebunden, alle anderen unspezifischen Antikörper binden weiter ans Gewebe. (3) Zur Kontrolle, ob es zu unspezifischen Reaktionen des sekundären Antikörpers kommt, wird der primäre Antikörper weggelassen. (4) Für die Doppelfärbungen, wie in der Studie von Cry1a verwendet, wird des Weiteren noch überprüft, ob es zu Kreuzreaktionen zwischen den sekundären Antikörpern kommt. Hierfür wurde Anti-Cry1a aus *Guinea pig* als primärer Antikörper mit dem Anti-Goat als sekundärem Antikörper kombiniert und das Antiserum sc-14363 aus *Goat* mit einem Anti-*Guinea pig* als sekundärem Antikörper.

2.2.4.2 Auswertung der Menge des lichtaktivierten Cry1a

Von den 118 Retinae, die unter den oben beschriebenen Lichtbedingungen für die Bestimmung der Menge des lichtaktivierten Cry1a entnommen wurden, wurden 18 Retinae am Kryostat in transversale Schnitte geschnitten (wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben) und 100 als Whole Mounts verarbeitet. Bei den Schnitten wurden jeweils 3-4 Retinae nebeneinander aufgefroren und so gemeinsam auf einen Objektträger aufgebracht, um Farbeunterschiede zu vermeiden. 20 Retinae der Whole Mounts wurden am nächsten Tag direkt immunhistologisch bearbeitet, die verbleibenden Retinae wurden in Saccharose (10%, 20%, 30% in PBS) geführt, dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert.

Als primäre Antikörper wurden immer sc-14363 und Anti-Cry1a eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach dem folgenden Schema, um eine möglichst unbeeinflusste Auswertung der Proben durchführen zu können: Zuerst wurde eine geeignete Stelle der Retina durch die Auswertung der immunhistologischen Färbung der UV-Rezeptoren in der Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Als geeignet gilt hier, dass die UV-Opsine gleichmäßig gefärbt sind, die Retina an der Stelle also nicht während der Färbung eingefaltet war und die Außensegmente der Fotorezeptoren nicht durch die Präparation beschädigt, z. B. abgerissen sind. An diesen Stellen wurde anschließend die Cryptochrom-Immunfärbung fotografiert. Die Auswertung erfolgte in verschiedenen Arealen der Retina, wobei nachher möglichst die gleichen Stellen der verschiedenen Retinae miteinander verglichen wurden. Erst im zweiten Schritt erfolgte die Auswertung der Immunfärbung des Cryptochroms im gesamten Präparat durch Inaugenscheinnahme.

2.2.5 Elektronenmikroskopische Immunhistologie

Für die elektronenoptische Immunhistologie wurden manche Retinae mit dem Zusatz von Glutardialdehyd fixiert (siehe auch Abschnitt 2.2.2). Glutardialdehyd enthält Bindungsstellen, die von einigen Antikörpern unspezifisch erkannt werden. Um dem vorzubeugen, wurde das Gewebe, das vorab mit Zusatz von Glutardialdehyd fixiert wurde, für eine Stunde in Ammoniumchlorid gegeben. Die Präinkubation erfolgte in 10% Normal-Goat-Serum (NGS) und 2% BSA in PBS für 60 min bei RT. Anschließend wurden die Vibratomschnitte mit Anti-Cry1a (1:100), bzw. mit Anti-Cry1b (GEN) (1:100) und Anti-Cry1b (Bio) (1:1000) in 3% NGS und 2% BSA für 3-4 Tage bei 4°C inkubiert. Zur Visualisierung wurde als sekundärer Antikörper ein biotinylierter Anti-*Guinea pig*-IgG bzw. ein biotinylierter Anti-*Rabbit*-IgG (beide Vector Laboratories) in 3% NGS und 2% BSA für 2 h eingesetzt und mit einem auf Peroxidase basierenden enzymatischen System (Vectastain Elite ABC Kit; Vector, Hsu et al. 1981) reagiert. Um diesen Komplex sichtbar zu machen, wurde 0.025% Diaminobenzidin für 15 Minuten eingesetzt. Um dieses Signal zu verstärken, wurde eine Silberintensivierung (Sassoe-Pognetto et al. 1994) verwendet und dann in 0.5% Osmiumtetroxid für 30 Minuten bei 4°C osmiert. Für die Einbettung in Agar Low Viscosity Resin (Plano GmbH, Agar Scientific Limited, Essex) wurden die Proben noch vorher in einer Alkoholreihe dehydriert. Die Ultradünnschnitte (50-60 nm) wurden mit einem Ultra S-Mikrotom (Reichert, Leica) angefertigt, auf Kupfergrids gebracht und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (CM12, Philips, Hamburg). Tests mit Prä-Immunsereum und ohne den primären Antikörper dienten der Kontrolle.

2.2.6 Western Blot, Dot Blot und Zell-Fraktionierung

Für die Western Blots wurden sowohl die Hühner-Retinae als auch die Zungen nach der Entnahme in RIPA-Puffer (0.5% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet P 40, 0.1% SDS, 1 mM EDTA in PBS mit Protease-Inhibitor (Roche)) für 30 Minuten auf Eis lysiert und durch Zentrifugation von Schwebstoffen befreit. Anschließend wurde eine Probe von 20 µg durch ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel nach Proteingröße aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran für 2 h bei 180 mA übertragen, mit 5% BSA präinkubiert und mit Anti-Cry1a aus *Guinea pig* (1:500) bzw. Anti-Cry1b (GEN) aus *Rabbit* (1:500) und Anti-Cry1b (Bio) aus *Rabbit* (1:500) inkubiert. Ein meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-*Guinea pig*-IgG (polyklonales Antiserum aus *Goat*) bzw. Anti-*Rabbit*-IgG (polyklonales Antiserum aus *Goat*) (beide Dianova, Hamburg, Germany) wurde eingesetzt und mit einer Lösung von 2.5 mM Luminol, 0.4 mM p-Coumarinsäure, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5 und 0.009% H₂O₂ visualisiert. Die Zell-Fraktionierung wurde mit einem ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) nach Anleitung durchgeführt. Diese Proben wurden dann genau wie oben beschrieben im Western Blot und im Immunverfahren behandelt.

Die Zunge als Gewebe ohne Cryptochrom dient der Kontrolle. Da die Zunge nicht fraktioniert, sondern in RiPA-Puffer lysiert wurde, wurden auch Retinaprobe entsprechend aufgearbeitet. Zur Kontrolle der Fraktionierung werden weitere Proteine nachgewiesen, deren Vorkommen bekannt ist. Hierfür wurden verwendet:

- Antiserum Protein-Kinase C aus *Rabbit* (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) als Kontrolle für die zytosolische Fraktion,
- Antiserum E-cadherin aus *Mouse* (clone 36, BD Transduction Laboratories, Los Angeles, CA, USA) als Kontrolle für die Membran-Fraktion,
- Antiserum RARalpha aus *Mouse* (Abcam, Cambridge, UK) und Antiserum Histon H3 aus *Mouse* (Sigma, St. Louis, MO, USA) als Kontrolle für die Zellkern-Fraktion und
- Antiserum Aktin aus *Rabbit* (Sigma, St. Louis, MO, USA) als Kontrolle für die Zytoskelett-Fraktion.

Dot Blots wurden hauptsächlich mit den beiden Anti-Cry1b Antikörpern durchgeführt. Hierfür wurde das Peptid, das für die Herstellung von Anti-Cry1b (GEN) verwendet worden war, in den Konzentrationen 2 µg, 500 ng, 50 ng und 5 ng und lysiertes Retina-Gewebe (Ripa-Extrakt) in einer Konzentration von 1 µg, 100 ng und 10 ng auf eine Membran (SDS-Page) aufgetropft. Die primären Antikörper gegen Cry1b wurden in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (1:10000, Dianova, Deutschland) und einem Chemilumineszenz-Nachweis, wie bereits für die Western Blots beschrieben (Gross 2009).

2.3 Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung von **Cryptochrom 1b** in der Retina von Hühnern und Rotkehlchen

2.3.1 Ergebnisse

Die Kontrollen der beiden verwendeten Cry1b-Antikörper waren negativ und sind im Anhang dargestellt (Abb. A 2.2 und A 2.3).

2.3.1.1 Lokalisation von Cry1b in den Ganglienzellen

Cry1b ist bei Rotkehlchen lichtmikroskopisch in den Ganglien- und deplatzierten Ganglienzellen exprimiert (Abb. 2.10 A). Fünf der hierfür verwendeten Rotkehlchen befanden

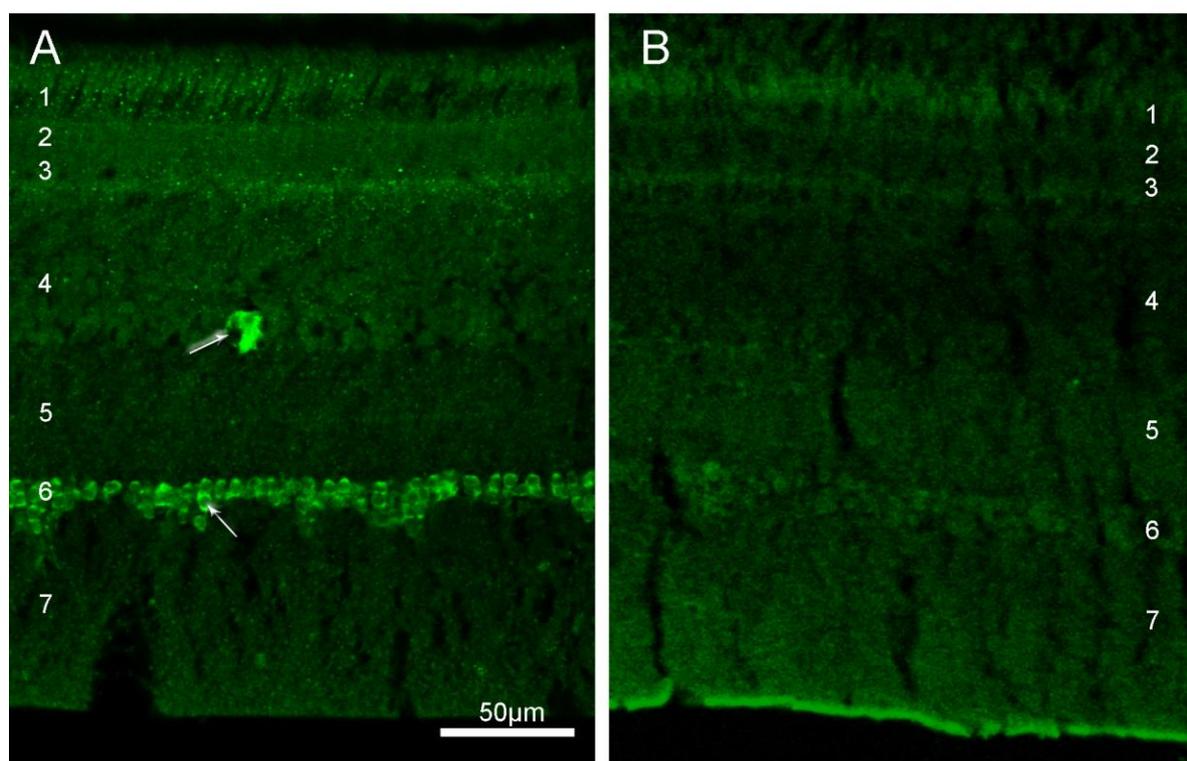


Abb. 2.10 Lokalisation von Cry1b in der Retina von Rotkehlchen innerhalb und außerhalb der Zugzeit. (A) Retina eines zugunruhigen Rotkehlchens, (B) Retina eines nicht-zugunruhigen Rotkehlchens. (A) Cry1b ist im Zytoplasma der Ganglien- und deplatzierten Ganglienzellen exprimiert. Die beiden Pfeile markieren als Beispiel zwei Zellkerne. Cry1b liegt ausschließlich zytoplasmatisch und nicht im Zellkern vor. Die Retina des Tieres, welches nicht in Zugunruhe war (B), enthält keine erkennbare Immunmarkierung. Die Zellschichten der Retina sind mit Zahlen gekennzeichnet: 1 Außen- und Innensegment des Fotorezeptors mit dem Öltröpfchen in der Mitte; 2 Äußere Körnerschicht; 3 Äußere plexiforme Schicht; 4 Innere Körnerschicht; 5 Innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht; 7 Sehnerv.

sich physiologisch in Zugunruhe (siehe auch 2.2.1.1). In den Retinae der zwei Rotkehlchen, die sich physiologisch nicht in Zugunruhe befanden, war Cry1b nicht (Abb. A 2.10 B) oder nur schwach nachweisbar (Anhang Abb. A 2.4). Die Markierung im Innensegment in Abb. 2.10 B ist nicht spezifisch, da sich die Innensegmente auch in der Kontrolle angefärbt haben (siehe auch Anhang Abb. A 2.4). Auch in Hühnerretinae konnte ich mit diesem Antikörper keine Färbung erzielen, die deutlich über der Eigenfluoreszenz der Retina liegt (Anhang Abb. A 2.5). Allerdings stimmt die Aminosäuresequenz von Cry1b bei Hühnern nicht mit dem Antigen des Antikörpers überein (Petra Bolte, pers. Mitt.). Bei der Expression von

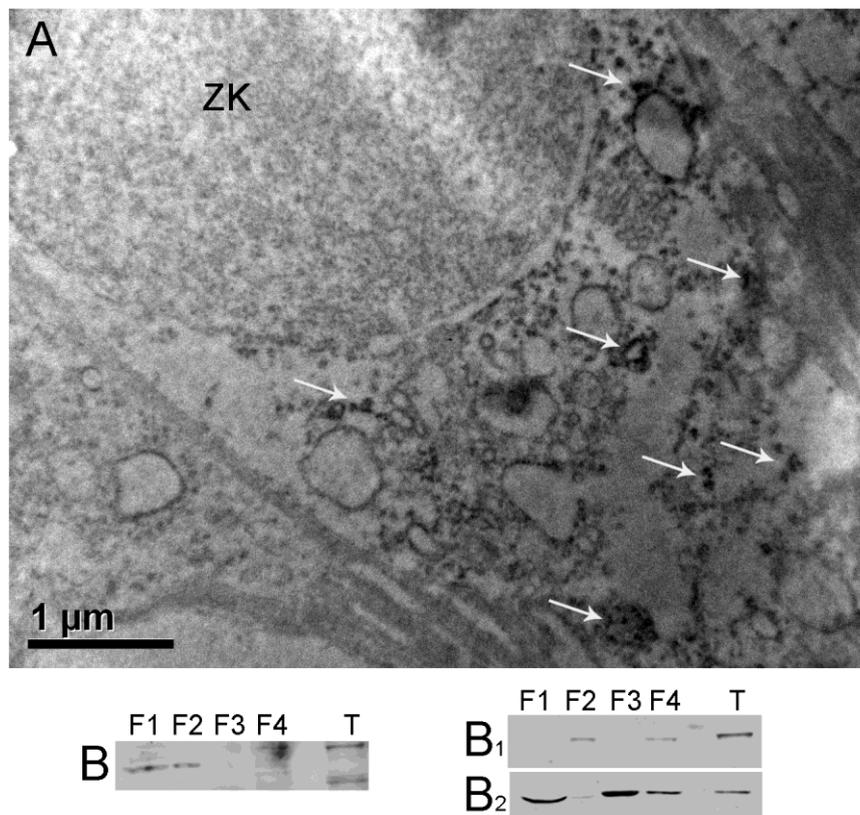


Abb. 2.11 Lokalisation von Cry1b innerhalb der Zelle. (A) Elektronenmikroskopisches Bild einer Ganglienzelle aus der Retina eines zugunruhigen Rotkehlchens, immunhistologisch markiert mit Anti-Cry1b (GEN). ZK - Zellkern. Pfeile deuten auf das Reaktionsprodukt (Diaminobenzidin mit einer Silberintensivierung) der immunhistologischen Markierung. Cry1b ist an Membranen assoziiert, liegt aber auch zytosolisch vor. In welchen Zellbestandteilen es vorliegt, ist nicht zu erkennen. (B) Zell-Fraktionierung mit anschließendem Western Blot von der Retina eines Rotkehlchens. F1: Zytosolische Fraktion; F2: Membran-Fraktion; F3: Zellkern-Fraktion; F4: Zytoskelett-Fraktion; T: Zunge des jeweils selben Tieres als Gewebe ohne Cry1b zur Kontrolle. (B) Cry1b ist sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch in der Membran-Fraktion enthalten. Als Beispiel für die Kontrolle der Reinheit der Fraktionen dient (B1) E-cadherin für Membranen, (B2) RARalpha für Zellkerne. Die Kontrollen zeigen in F4, der letzten Fraktion, einen Überschuss anderer Proteine. Auch in F1 scheinen sich schon RARalpha gelöst zu haben. Da Cry1b allerdings nicht in F3 vorkommt, gibt es hierfür keine Vermischung der Fraktionen, vermutlich da Cry1b nicht in so großen Mengen im Gewebe vorkommt wie andere Proteine.

Cry1b in Rotkehlchenretinae ist zu erkennen, dass sich Cry1b nicht im Zellkern der Ganglien- und deplatzierten Ganglienzellen befindet, sondern ausschließlich im Zytoplasma dieser Zellen konzentriert ist (Abb. 2.10 A durch Pfeile markiert). Dies wird auch in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 2.11 A) deutlich. Die einzelnen Zellbestandteile sind durch die Behandlung nicht mehr zu identifizieren. Cry1b ist teilweise an Membranen assoziiert und liegt teilweise ungebunden vor. Die membranösen Strukturen könnten endoplasmatisches Retikulum sein. Auch in Western Blots, denen eine Zell-Fraktionierung vorausgegangen war, kommt Cry1b in der zytosolischen Fraktion und in der Membran-Fraktion vor. Sowohl die Zellkern- als auch die Zytoskelett-Fraktion enthält kein Cry1b (Abb. 2.11 B, C). Dies bestätigt den entsprechenden Eindruck der elektronenmikroskopischen Studie über die Lokalisation innerhalb der Zelle.

2.3.1.2 Nachweis von Cry1b in den Innensegmenten der Fotorezeptoren

Mit einem anderen Antikörper (Anti-Cry1b (Bio)) habe ich auch in Hühnerretinae einen positiven Befund erzielen können und zwar in den Innensegmenten der Fotorezeptoren (Anhang Abb. A 2.6 A). Es sind wahrscheinlich nicht alle Innensegmente der Fotorezeptoren Cry1b-positiv, aber die meisten. Die Färbung konzentriert sich nur auf einen Teil des Innensegments, vermutlich auf den Myoid. Allerdings entspricht die Peptidsequenz des hierfür verwendeten Antiserums der des oben verwendeten Anti-Cry1b (GEN) und stimmt folglich nicht mit der Aminosäuresequenz von Cry1b bei Hühnern überein. Elektronenmikroskopisch habe ich bereits in meiner Diplomarbeit mit Anti-Cry1b (Bio) Cry1b im Innensegment und auch in Ganglienzellen von Rotkehlchen nachgewiesen. In beiden Zellstrukturen lag Cry1b sowohl an Membranen assoziiert als auch zytosolisch vor (Anhang Abb. A 2.6). Auch in dieser Färbung handelte es sich bei den membranösen Strukturen vermutlich um endoplasmatisches Retikulum. In Dot Blots wurden keine Unterschiede zwischen der Reaktion der beiden Antikörper deutlich. Beide Antikörper binden das Antigen von Anti-Cry1b (GEN) und das Protein aus dem lysierten Retinagewebe (Anhang Abb. A 2.6 B, C).

2.3.2 Diskussion

Cry1b kommt bei zugunruhigen Rotkehlchen in allen Ganglienzellen der Retina vor. Somit haben meine Versuche die in der Literatur beschriebene Expression von Cry1 in den Ganglienzellen (Mouritsen et al. 2004) bestätigt. In der Retina der Rotkehlchen, die keine Zugunruhe mehr zeigten, konnte ich Cry1b nur schwach in den Ganglienzellen darstellen. In Hühnerretina konnte ich mit diesem Antikörper gar kein Cry1b nachweisen. Die Aminosäuresequenz der Hühner ist allerdings im Bereich des C-Terminus, an den der Antikörper bindet, eine andere. Die fehlende Färbung könnte man als weitere Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers werten. Cry1b liegt innerhalb der Zellen zytosolisch, aber auch an Membranen gebunden vor.

Mit dem Antiserum von Möller (2006) konnte ich Cry1b in der Retina von Hühnern in den Innensegmenten der Fotorezeptoren markieren. Das Färbepild entspricht dem bei Rotkehlchen (Möller 2006), allerdings stimmt die Aminosäuresequenz von Cry1b bei Hühnern ja nicht mit dem Antigen, gegen die die beiden Cry1b-Antikörper spezifisch sind, überein. Es könnte folglich sein, dass das Antiserum hier ein anderes Protein unspezifisch markiert. Da Möller (2006) allerdings auch die RNA von Cry1b im Innensegment nachgewiesen hat, gehe ich weiterhin davon aus, dass Cry1b sowohl in den Ganglienzellen wie auch im Innensegment der Fotorezeptoren lokalisiert ist. In meiner Diplomarbeit konnte ich Cry1b mit diesem Antikörper zumindest auf elektronenmikroskopischer Ebene sowohl in den Innensegmenten als auch in den Ganglienzellen bei einem Rotkehlchen parallel nachweisen. Lichtmikroskopisch konnte ich Cry1b damals nur im Innensegment zeigen. Ich gehe davon aus, dass die fehlende Ganglienzellfärbung im Lichtmikroskop daraus resultiert, dass sich dieses Rotkehlchen nicht mehr in Zugunruhe befand. Elektronenoptisch konnte ich bei allen Rotkehlchen, die sich außerhalb der Zugstimmung befanden, noch Cry1b nachweisen. Da auch lichtmikroskopisch die Färbung teilweise noch schwach vorhanden ist, ist es nicht verwunderlich, dass auf Zellebene Cry1b noch nachweisbar ist. Auch Haque et al. (2002) beschreibt mRNA von Cryptochrom 1 unter anderem in den Ganglienzellen und Innensegmenten der Fotorezeptoren bei Hühnern, wobei es sich hierbei natürlich auch um die mRNA von Cry1a handeln könnte, da dort nicht zwischen den beiden Splice-Formen von Cry1 unterschieden wurde.

2.3.2.1 Nachweis der Expression von Cry1b in verschiedenen Zellschichten der Retina

Es stellt sich hier die Frage, warum die Lokalisation von Cry1b im Innensegment der Fotorezeptoren und in den Ganglienzellen meist nicht parallel von dem gleichen Antikörper

gebunden wird und so in der Vergangenheit auch nicht innerhalb einer Studie beschrieben wurde.

Diese Frage kann hier nicht beantwortet, es können lediglich Vermutungen angestellt werden. Im Dot Blot verhalten sich die beiden Antikörper gleich: beide binden das gleiche Peptid und das lysierte Gewebe. Bei diesem Verfahren liegt das Protein oder das Peptid allerdings im lysierten Zustand vor. Das bedeutet, dass die Konformation des Proteins aufgehoben ist. In diesem Zustand ist das Antigen des Proteins offensichtlich für beide Antikörper zugänglich. Im untersuchten Gewebe hat das Protein allerdings seine tertiäre Struktur behalten. Dort reagieren die beiden Antikörper unterschiedlich, obwohl sie gegen dasselbe Antigen hergestellt wurden. Bei der Herstellung der Antikörper ist nicht nur die Aminosäurekette des Antigens entscheidend, sondern auch dessen dreidimensionale Faltung. Diese kann durchaus zwischen den beiden Antigenen, die für die Immunisierung verwendet wurden, variieren, und demzufolge ist die dreidimensionale Struktur der Antigenbindungsstelle der Antikörper ebenfalls unterschiedlich. Wie auch später für Cry1a und für die Opsine beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.5), kommt es dann dazu, dass das Protein nur in diesem bestimmten Konformationszustand von dem jeweiligen Antikörper gebunden werden kann. Eine mögliche Erklärung für die Färbeunterschiede wäre, dass sich Cry1b in den Innensegmenten vielleicht in einer anderen Konformation als in den Ganglienzellen befindet und kann deshalb nicht von beiden Antikörpern gleich gebunden werden.

Bei Mouritsen und Kollegen (2004) wurde Cry1 bei Gartengrasmücken in den Ganglienzellen nachgewiesen, im Gegensatz dazu bei Zebrafinken nicht immer. In dieser Studie wurde durch den verwendeten Antikörper nicht zwischen den beiden Cry1-Splice-Varianten unterschieden. Auf Grund meiner Befunde gehe ich davon aus, dass es sich bei der von Mouritsen und Kollegen (2004) beschriebenen Lokalisation von Cry1 um Cry1b handelt. Es wurde sogar ein tageszeitlicher Unterschied gefunden: hier war die Expression in den Abendstunden, der Zugzeit von Gartengrasmücken, höher als am Tag. Solche Unterschiede konnte ich nicht finden, ich habe allerdings auch keine gezielte Studie dazu durchgeführt. Die von Möller (2006) untersuchten Rotkehlchen, die ja alle keine Expression von Cry1b in den Ganglienzellen zeigten, waren allerdings alle erst nach Beendigung der Zugunruhe abgetötet worden (W. & R. Wiltschko pers. Mitteilung). Die fehlende Ganglienzellfärbung könnte daran liegen, dass Cry1b zumindest bei Rotkehlchen nach meinen Befunden nur innerhalb der Zugsaison in den Ganglienzellen exprimiert wird. Der Todeszeitpunkt der beiden Rotkehlchen aus meiner Arbeit, die sich nicht mehr in Zugstimmung befanden entspricht ungefähr dem der Tiere aus der Studie von Möller (2006). Wenn Cry1b auch bei anderen

Vogelarten hauptsächlich während der Zugzeit exprimiert wird, könnte dies erklären, warum der Nachweis nicht immer gelingt.

2.3.2.2 Eignung von Cry1b als Rezeptormolekül für den Magnetkompass

Ich konnte Cry1b im Elektronenmikroskop in beiden Zelltypen sowohl zytosolisch als auch membran-assoziiert nachweisen. Die Western Blots, denen eine Zell-Fraktionierung vorausgegangen war, bestätigen dies. Dadurch liegt bei Cry1b allerdings keine Ausrichtung der Proteine in eine bestimmte Richtung vor. Die Membranen innerhalb der Ganglienzellen oder auch im Innensegment der Fotorezeptoren sind nicht in eine Richtung ausgerichtet, so wie es im Außensegment der Fotorezeptoren der Fall ist. Allerdings haben Lau et al. (2012) gezeigt, dass eine feste Ausrichtung der Proteine nicht unbedingt notwendig ist. Möller (2006) spekuliert über die Funktion von Cry1b in den Innensegmenten der Fotorezeptoren als Rezeptormolekül für den Magnetkompass. Auch Mouritsen et al. (2004) diskutieren bei Cry1 in den Ganglienzellen über die Funktion als Rezeptormolekül für den Magnetkompass. Es wurde von Mouritsen et al. (2004) bei Zebrafinken aber auch bei Gartengrasmücken ein tageszeitlicher Unterschied in der Expression von Cry1 in den Ganglienzellen gefunden und eine insgesamt deutlich schwächere Expression von Cry1 bei Zebrafinken. Zebrafinken haben allerdings wie Gartengrasmücken oder Rotkehlchen denselben Typ von Magnetkompass (Keary et al. 2009). Ich habe große Unterschiede in der Expression von Cry1b bei Rotkehlchen innerhalb der Zugzeit und außerhalb dieser Zeit gefunden. Ich würde bei der Funktion als Rezeptormolekül des Magnetkompasses keine solchen tageszeitlichen oder jahreszeitlichen Unterschiede erwarten, da Orientierung davon unabhängig ist. Dies macht meiner Meinung nach Cry1b als Rezeptormolekül für den Magnetkompass unwahrscheinlich.

2.4 Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung von Cryptochrom 1a in der Retina von Hühnern und Rotkehlchen

2.4.1 Ergebnisse¹¹

Die Expression von Cry1a in der Retina von Rotkehlchen und Hühnern ergab keine Unterschiede zwischen dem linken und dem rechten Auge. Auch an verschiedenen Tageszeitpunkten ergaben sich keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Proben.¹² Die

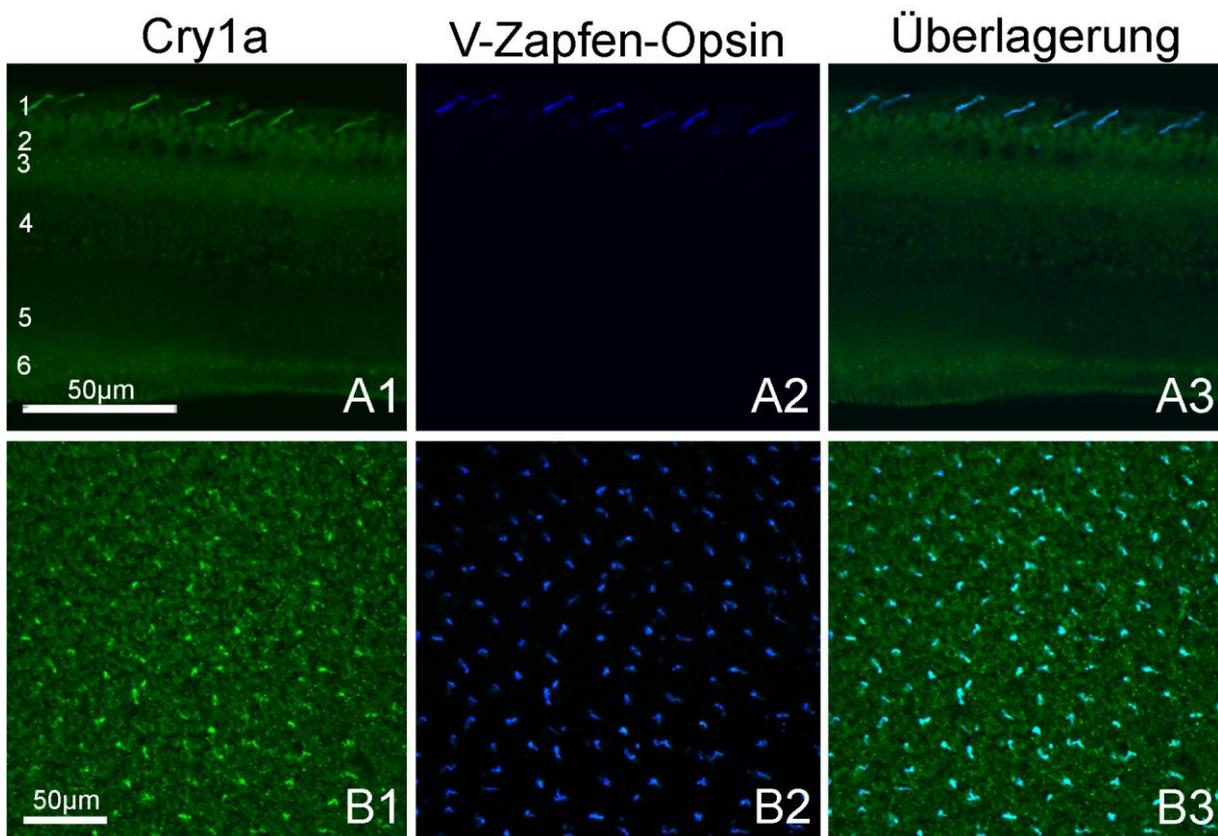


Abb. 2.12 Immunmarkierung von Cry1a und UV/V-Zapfen-Opisin und deren Kolokalisation in der Retina von Hühnern. (A) Vertikaler Schnitt durch die Retina; (B) Whole Mount. Die Zellschichten der Retina sind mit Zahlen gekennzeichnet: 1 Außen- und Innensegment des Fotorezeptors mit dem Öltröpfchen in der Mitte; 2 Äußere Körnerschicht; 3 Äußere plexiforme Schicht; 4 Innere Körnerschicht; 5 Innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht. Linke Spalte (A1 und B1): Die Cry1a-Immunfluoreszenz (dargestellt in Grün) ist innerhalb des Außensegmentes eines morphologisch sehr schlanken Fotorezeptors. Mittlere Spalte (A2 und B2): Die UV/V-Zapfen-Opisin-Immunfluoreszenz (dargestellt in Blau) ist im selben Fotorezeptor im gleichen Zellbereich. Rechte Spalte (A3 und B3): Überlagerung der beiden Bilder. Cry1a und das UV/V-Zapfen-Opisin kolokalisieren in allen Zellen.

¹¹ Die hier beschriebenen Ergebnisse wurde bereits in PlosOne (Nießner et al. 2011) veröffentlicht.

¹² Ich habe allerdings keine gezielte Analyse über den Tag/Nachtrhythmus oder den Jahreszyklus durchgeführt.

in Material und Methode beschriebenen Kontrollen, die zeigen, dass der Antikörper spezifisch für Cry1a ist, waren alle negativ und sind im Anhang (Abb. A 2.7 - A 2.9) illustriert.

2.4.1.1 Lichtmikroskopische Immunhistologie

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen immunhistologischen Studie zeigen, dass Cry1a sowohl bei Hühnern (Abb. 2.12) als auch bei Rotkehlchen (Abb. 2.13) in den Außen-

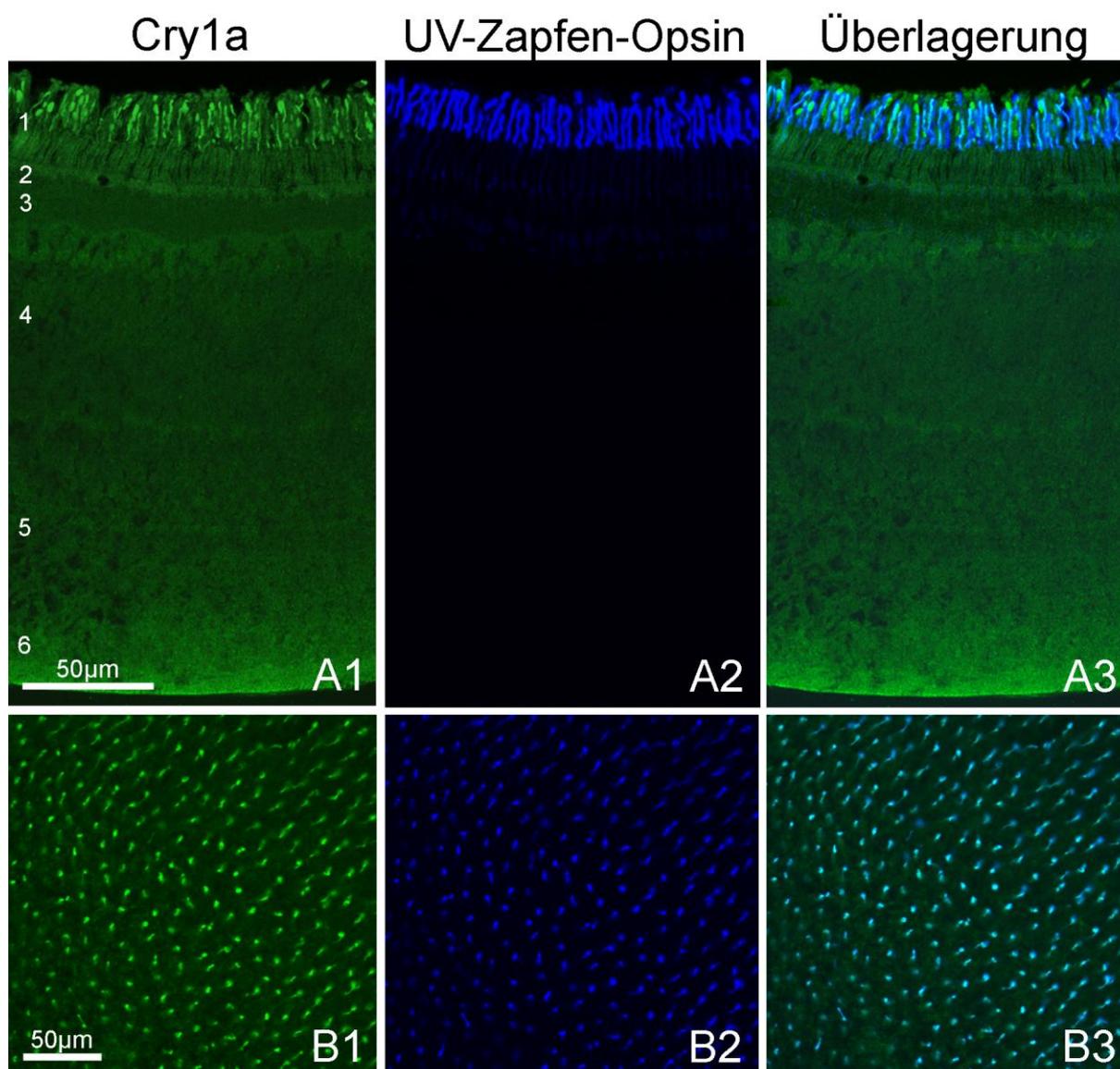


Abb. 2.13 Immunmarkierung von Cry1a und UV/V-Zapfen-Opsin und deren Kolokalisation in der Retina von Rotkehlchen. (A) Vertikaler Schnitt durch die Retina; (B) Whole Mount. Die Zellschichten der Retina sind mit Zahlen gekennzeichnet, die in Abb. 2.12 beschrieben sind. Linke Spalte (A1 und B1): Cry1a-Immunfluoreszenz (dargestellt in Grün). Mittlere Spalte (A2 und B2): UV/V-Zapfen-Opsin-Immunfluoreszenz (dargestellt in Blau). Rechte Spalte (A3 und B3): Überlagerung der beiden Bilder. Auch bei Rotkehlchen kolokalisieren Cry1a und UV/V-Opsin in allen Außensegmenten des UV/V-Zapfens. Die Dichte der Cry1a/UV/V-Fotorezeptoren ist bei Rotkehlchen deutlich höher bei Hühnern (siehe Abb. 2.12).

segmenten von Fotorezeptoren vorkommt. Die Morphologie legt nahe, dass es sich hier um einen bestimmten Fotorezeptortyp handelt, da dieser Zapfen (erkennbar an dem für Zapfen der Vögel typischen Öltröpfchen) auffällig lang und schlank ist. Cry1a ist ausschließlich im Außensegment dieses Zapfentyps erkennbar, obwohl alle Proteine im Innensegment hergestellt und erst anschließend in das Außensegment transportiert werden.

Doppelfärbungen mit verschiedenen Antikörpern gegen die Sehpigmente (Opsine) der verschiedenen Zapfen der Vögel zeigten, dass (1) Cry1a ausschließlich in den UV/V-Zapfen (SWS1) vorkommt, und zwar sowohl bei Rotkehlchen als auch bei Hühnern, und (2) auch sämtliche UV/V-Zapfen Cry1a enthalten. Dies ist am deutlichsten in den Bildern der Whole Mount-Studie (Abb. 2.12 B und 2.13 B) zu erkennen. Diese Studie zeigt auch, dass die Cry1a/UV/V-Zapfen über die gesamte Retina verteilt sind. Unterschiede in der Dichte der Zapfen-Population sind optisch nicht erkennbar. Die Dichte der Cry1a/UV/V-Zapfen ist in der Rotkehlchenretina deutlich höher als bei Hühnern. Dies ist sowohl im Schnitt als auch im Whole Mount klar zu erkennen (Abb. 2.13). Doppelfärbungen mit den roten Zapfen (bzw. den roten und den grünen, siehe auch Material und Methode) bestätigen das ausschließliche Vorkommen in den UV/V-Zapfen und zeigen keine Kolo-kalisation.

2.4.1.2 Elektronenmikroskopische Immunhistologie

Das Substrat, das im Elektronenmikroskop Cry1a markiert, ist als dunkler Punkt zu erkennen (Abb. 2.14). Deutlich zu sehen ist das Öltröpfchen und darüber die Diskmembranen des Außensegmentes eines sehr schlanken Zapfens, welcher vorher in der Lichtmikroskopie als UV/V-Zapfen identifiziert wurde (Abb. 2.14 A). Cry1a ist entlang der Diskmembranen angeordnet, allerdings nicht an allen (Abb. 2.14 A, B). Es wechseln sich Zonen mit und ohne Cry1a ab, so dass ein Streifenmuster entsteht. In der höheren Vergrößerung ist gut zu erkennen, dass Cry1a an den Membranen angeordnet ist. Unklar bleibt, ob und, wenn ja, in welcher Weise Cry1a an die Membran gebunden ist.

Weiter ist zu erkennen, dass sich Cry1a auf der Seite des Ziliums, welches das Innen- und das Außensegment verbindet, bis zu der den Rezeptor umgebenden Membran ausbreitet, auf der gegenüberliegenden Seite aber nicht (Abb. 2.14 B). Die Seite des Ziliums ist die Seite des Außensegmentes, an der die Proteine eingeschleust werden. Alle Proteine des Außensegments werden im Innensegment produziert und dann extrazellulär transportiert. Im Innensegment selbst ist allerdings auch im Elektronenmikroskop kein Cry1a nachweisbar (siehe Anhang Abb. A 2.10). Auch gibt es keinen Hinweis darauf, dass Cry1a aus dem Rezeptor ausgeschleust und in das Pigmentepithelium verbracht wird, wie es mit dem Retinal geschieht (siehe auch 2.4.2.1).

2.4.1.3 Western Blot und Zell-Fraktionierung

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Studie weisen darauf hin, dass Cry1a an die Diskmembran gebunden sein könnte. Durch die Behandlung der Retinae in verschiedenen, aufeinanderfolgenden Puffersystemen werden die vorhandenen Proteine je nach Vorkommen in vier Fraktionen gelöst. Dies sind die zytosolische, die Membran-, die Zellkern-

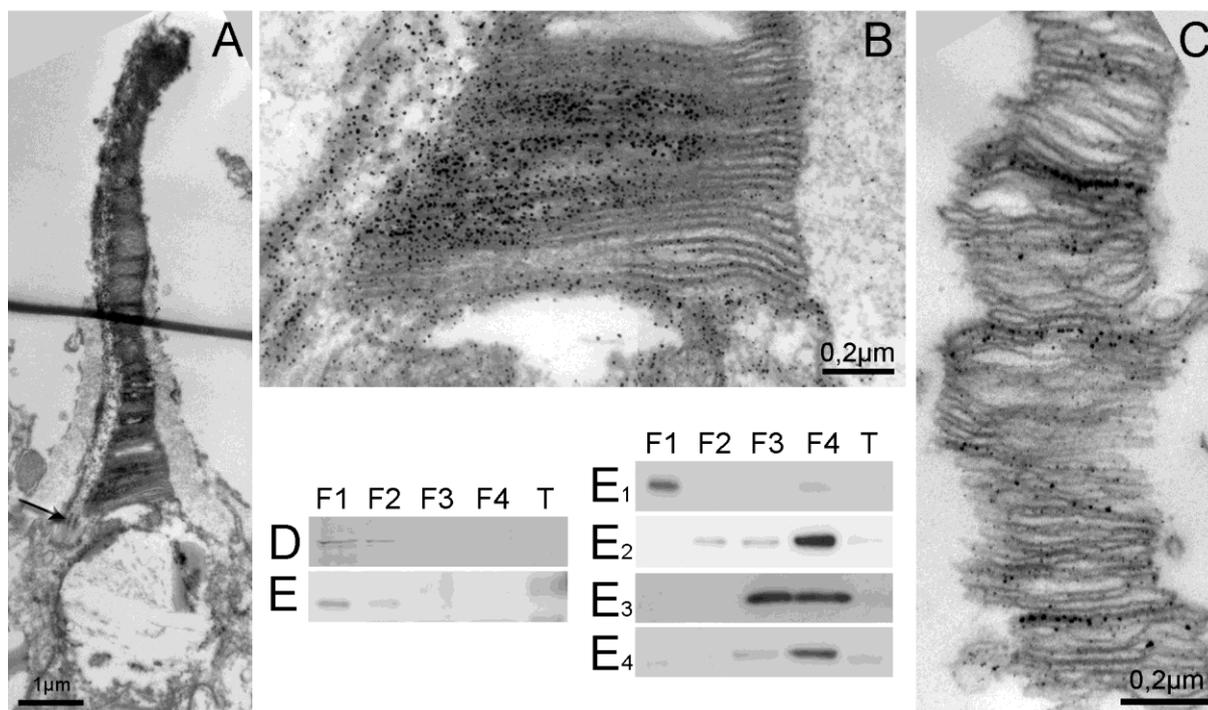


Abb. 2.14 Elektronenmikroskopische Immunhistologie und Western Blots. (A) Außensegment eines langen, schlanken Fotorezeptors einer Hühnerretina. Unterhalb der Diskmembranen ist das Öltröpfchen zu sehen. An der Seite ist mit einem Pfeil das Zilium gekennzeichnet. Cry1a ist mit den dunklen Punkten markiert, die aus Diaminobenzidin und der Silber-Intensivierung bestehen. (B) Höhere Vergrößerung des basalen Teiles des Außensegmentes von (A). Cry1a ist entlang der Diskmembranen aufgereiht. Nicht alle Diskmembranen enthalten Cry1a, und es kommt zu einer optischen Streifung. Auf der Seite des Ziliums werden die Proteine vom Innen- in das Außensegment transportiert, so auch hier das Cry1a. Hier ist es vermutlich zytosolisch und wird dann an die Diskmembranen gebunden. (C) Außensegment eines Zapfen-Fotorezeptors in einer Rotkehlchenretina. Auch hier ist zu sehen, dass nicht alle Diskmembranen Cry1a enthalten. Western Blot einer Rotkehlchen- (D) und einer Hühnerretina (E). F1: Zytosolische Fraktion; F2: Membran-Fraktion; F3: Zellkern-Fraktion; F4: Zytoskelett-Fraktion; T, Zunge des jeweils selben Tieres als Kontrolle. Cry1a ist in der zytosolischen Fraktion und in der Membran-Fraktion in beiden Arten. Zur Kontrolle der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden andere Proteine markiert, hier an der Hühnerretina gezeigt: (E1) Protein-Kinase C für Zytosol, (E2) E-cadherin für Membranen, (E3) Histone H3 für Zellkern, (E4) Aktin fürs Zytoskelett. Die Kontrollen zeigen, dass F1 und F2 keine Proteine anderer Fraktionen enthalten (siehe Protein-Kinase C und E-cadherin). E-cadherin bindet ebenso an Aktin in F4, allerdings gibt es einen Überlauf in F3. Dasselbe gilt für Aktin, die Kontrolle für die Zytoskelett-Fraktion. Histone H3 ist in F3 aber auch in F4 zu sehen auf Grund der großen Menge dieses Proteins in diesem Gewebe.

und die Zytoskelett-Fraktion. Sowohl in Hühner- wie auch in Rotkehlchenretinae ist Cry1a in der zytosolischen Fraktion und in der Membran-Fraktion vorhanden (Abb. 2.14 D, E). Dies stimmt insofern mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Studie überein, dass Cry1a nach der Synthese an die Membran gebunden wird. Die Synthese selbst war im Transmissions-Elektronenmikroskop nicht nachweisbar.

2.4.2 Diskussion

Cry1a ist im Außensegment aller UV/V-Zapfen von Rotkehlchen und Hühnern lokalisiert. Diese Cry1a/UV/V-Zapfen sind über die gesamte Retina verteilt. Elektronenmikroskopisch wird klar, dass Cry1a innerhalb der Außensegmente an den Diskmembranen entlang aufgereiht ist. Die Zell-Fraktionierung mit anschließenden Western Blots zeigt, dass Cry1a an die Diskmembranen gebunden vorliegt.

2.4.2.1 Lokalisation von Cry1a

Es gibt verschiedene Erklärungen, warum Cry1a im Innensegment, wo es hergestellt wird, nicht nachgewiesen werden kann. Eventuell kann der Antikörper durch eine spezifische räumliche Konformation der Antigenbindungsstelle Cry1a in seiner Produktions- und Transportform nicht detektieren. Möglich ist auch, dass Cry1a zu der untersuchten Tageszeit in zu geringer Konzentration im Innensegment vorlag. Allgemein ist dies aber kein ungewöhnliches Phänomen, auch das UV/V-Opsin lässt sich z. B. mit dem hier verwendeten Antikörper nur im Außensegment nachweisen.

Die Produktion der Opsine unterliegt einer starken circadianen Rhythmik. Es gibt mehrere Tageshochs, der Hauptpeak liegt bei den Zapfen in der frühen dunklen Periode, bei den Stäbchen ca. 12 Stunden versetzt dazu (LaVail 1976, Besharse et al. 1977, Young 1978, Haque et al. 2002). Cry1a bildet im Elektronenmikroskop optisch Streifen, da nicht alle Disks Cry1a enthalten, aber immer mehrere aufeinanderfolgende Cry1a positiv sind. Diese Streifung könnte mit der Tagesperiodik erklärt werden. Die Disks werden immer basal erneuert und apikal abgestoßen, bei Hühnern mit einer Rate von ca. 40 Disks pro Tag (Young 1978). Der Abstand der Disks mit Cryptochrom ist enger als diese 40 Disks pro Tag, könnte aber einer eigenen Produktionsrhythmik unterliegen. Quantitative RNA-Untersuchungen geben Hinweise auf eine Tagesrhythmik von Cry1a. Die Menge der Cry1a-RNA stieg hier im linken Auge zu den Entnahmezeitpunkten 17:30 Uhr und 22:30 Uhr gegenüber den Zeitpunkten am Tag deutlich an, im rechten Auge blieb sie über den gesamten Tag gleich (Möller 2006). Der Anstieg des RNA-Levels lässt allerdings nicht automatisch Rückschlüsse auf einen Anstieg des Protein-Levels zu. Somit lässt er sich auch

nicht so einfach auf den Zeitpunkt des Transportprozesses hin interpretieren. Proteinlevel können beispielsweise auch einfach konstant gehalten werden.

Das Retinal, der Teil des Opsins, der bei Belichtung eine Konformationsänderung vollzieht, wird zur Re-Isomerisierung in das Pigmentepithel verbracht und anschließend wieder in die Diskmembran eingeschleust. Die immunhistologische Färbung für das Elektronenmikroskop ergab keine Hinweise, dass auch Cry1a zwischenzeitlich in das Pigmentepithelium ausgeschleust wird. Im Redox-Zyklus des Flavins werden sowohl im Oxidationsprozess als auch während der Re-Oxidation Radikalpaare gebildet. Vermutlich sind die Radikalpaare, die während der Re-Oxidation gebildet werden, die für den Magnetkompass entscheidenden (Ritz et al. 2009, siehe auch 2.6.5). Würde Cry1a während dieser Phase ins Pigmentepithel verbracht, wäre dies mit einer potenziellen Funktion als Rezeptormolekül nur schwer vereinbar.

2.4.2.2 Cry1a als Rezeptormolekül für den Magnetkompass

Als erste Bedingung leitet sich vom Radikalpaar-Modell (Ritz et al. 2000) ab, dass Licht das Rezeptormolekül erreichen muss. Dies ist innerhalb der Retina automatisch erfüllt.

Die zweite Bedingung, dass alle Rezeptormoleküle innerhalb einer Rezeptorzelle in eine Richtung ausgerichtet sind, ist durch eine Fixierung an den Diskmembranen, die parallel angeordnet sind, wahrscheinlich erfüllt. Eine Membran ist zwar fluid, allerdings ist die Bewegung der Proteine lediglich innerhalb und nicht durch sie hindurch möglich. Eine Rotation in der Ebene um 360° spielt keine Rolle, und eine gewisse Bewegung im Winkel wirkt sich nicht störend aus (Hill & Ritz 2010, Lau et al. 2010, Solovjov & Schulten 2012). Lau et al. (2012) haben gezeigt, dass Magnetrezeption mittels eines Radikalpaarprozesses sogar ohne eine feste Ausrichtung der Proteine möglich ist. Allerdings ist die Bedingung der gleichmäßigen Ausrichtung durch die Bindung an die Diskmembranen innerhalb einer Rezeptorzelle erfüllt, und eine weitere Stabilisierung des Cryptochroms auf der Membran ist durch andere Proteine vorstellbar. Cryptochrom 1 ist kein Transmembran-Protein (Liedvogel & Mouritsen 2010) und benötigt einen Interaktionspartner, der es an der Membran gebunden hält. Da beide Cryptochrom 1-Splice-Varianten dieselben Bindungseigenschaften haben – beide konnten sowohl Membran gebunden als auch zytosolisch nachgewiesen werden –, liegt die Bindungsstelle für die Membran, bzw. für einen Interaktionspartner in der Membran vor dem C-Terminus, da beide Proteine bis auf den C-Terminus identisch sind. Über den Interaktionspartner selbst lässt sich zurzeit nur spekulieren. Von diesem hängen jedoch sicherlich zukünftige Untersuchungen zur Beweglichkeit des Cryptochroms innerhalb der Diskmembranen ab.

Die dritte Bedingung ist, dass die einzelnen Rezeptorzellen in jeder Raumrichtung der Retina vorhanden sein müssen. Vögel haben insgesamt vier Farbrezeptoren (Zapfen) und die Stäbchen. Die vier Farbrezeptoren sind der rote (LWL), der grüne (MWL), der blaue (SWL) und der ultraviolette oder violette (SWS1) Zapfen. Der Bereich des ultravioletten oder violetten Sehens variiert von Vogelart zu Vogelart etwas. So sehen Hühner beispielsweise im violetten Bereich, Rotkehlchen im ultravioletten Bereich (Zfg. Hart 2001). Der Unterschied zwischen der ultravioletten und der violetten Form wird nur durch Veränderung einer Aminosäure bedingt (Wilkie et al. 1998, Hart & Hunt 2007, Carvalho et al. 2011). Die UV/V-Zapfen sind über die ganze Retina verteilt und machen bei Hühnern etwa 9% der Zapfentypen aus (Zfg. Hart 2001, Kram et al. 2010). Ich konnte die Verteilung bestätigen und so auch zeigen, dass es kein Zentrum des UV-Sehens und damit der Magnetrezeption wie eine 'Magnetfovea' gibt. Dies deckt sich mit der Vorstellung von Ritz et al. (2000). Sie postulierten, dass das Muster des Magnetfeldes durch die Verschiebung von Singulett- und Triplett-Produkten zueinander einen helleren oder dunkleren Fleck erzeugt, der sich je nach Blickrichtung über das Gesichtsfeld bewegt (vergleiche Abb. 2.6). Da die Cry1a/UV/V-Zapfen über die ganze Retina verteilt sind, decken diese durch die halbrunde Form des Auges jede Raumrichtung ab. So kann der Vogel die Richtungen der Magnetfeldlinien ermitteln, unabhängig von seiner eigenen Ausrichtung.

Die vierte Bedingung, die Möglichkeit, ein Signal an das Gehirn weiterzugeben, ist im UV/V-Zapfen durch seine Natur als Fotorezeptor gegeben.

Die Lokalisation von Cry1a erfüllt die für das Rezeptormolekül durch das Radikalpaar-Modell gestellten Bedingungen. Daraus schließe ich, dass Cry1a ein geeigneter Kandidat für das Rezeptormolekül des Magnetkompasses ist.

2.5 Menge von lichtaktiviertem Cryptochrom 1a unter monochromatischen Lichtern

2.5.1 Ergebnisse und Diskussion¹³

In diesen Versuchen habe ich die Expression von UV-Opisin und Cry1a an derselben Stelle der jeweiligen Retina von Hühnern immunhistologisch untersucht (zu sehen in Abb. 2.15 oder Anhang Abb. A 2.11). Die Färbeintensität des UV/V-Opisin-Antikörpers variiert durch die

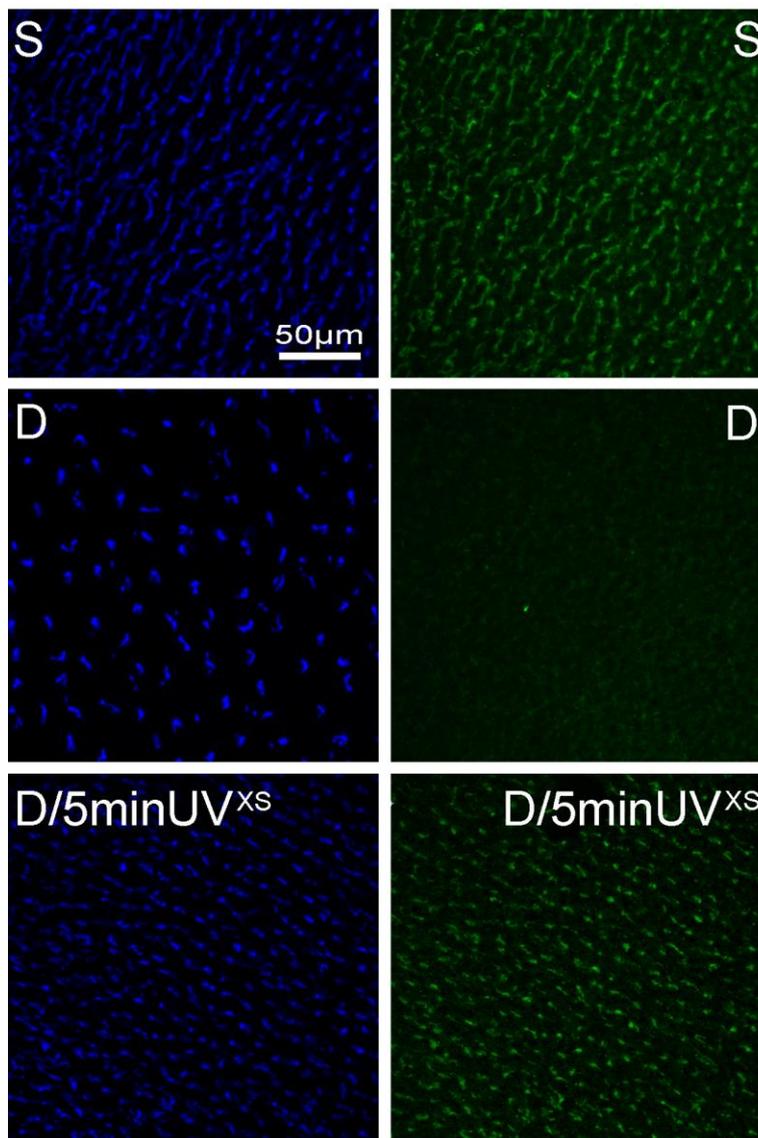


Abb. 2.15 Lichtaktivierung von Cry1a. In Blau ist das UV-Opisin markiert, in Grün dargestellt Cry1a. Die Lichtbedingungen sind in der Ecke aufgeführt. Die gleichen Bezeichnungen markieren dieselbe Retinastelle. S – Sonne, D – Dunkelheit, D/5minUV^{XS} – 30-minütige Vorbehandlung im Dunkeln und 5-minütige Behandlung in UV, ^{XS} – $0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$. Die UV-Opisin-Färbung variiert durch die Lichtbehandlung nicht und dient der Kontrolle, dass keine Fehler im immunhistologischen Protokoll oder der Präparation aufgetreten sind. Nach der Behandlung in Dunkelheit lässt sich Cry1a durch den Antikörper nicht mehr markieren.

¹³ Die hier beschriebenen Ergebnisse werden im Journal of the Royal Society Interface (Nießner et al. 2013) veröffentlicht.

Lichtbehandlung der Retina nicht und wird deshalb als Kontrolle für das immunhistologische Färbeprotokoll und die Präparation verwendet.

2.5.1.1 Cry1a-Markierung nach der Behandlung in Sonne und Dunkelheit

In der Retina von Hühnern, die vorab Sonnenlicht ausgesetzt wurden, ist Cry1a, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, nachweisbar (Abb. 2.15). In Retinae von Hühnern, die vorab dunkel adaptiert wurden, hingegen ist keine Färbung durch Anti-Cry1a zu erzielen (Abb. 2.15). Generell spiegelt die Färbeintensität eines Antikörpers die Menge des Antigens wieder, das vorhanden ist. Bei Cry1a variiert diese jedoch nach der Vorbehandlung in Licht oder Dunkelheit. Cry1a vollzieht bei Lichtaktivierung eine Konformationsänderung, bei der der C-Terminus an die Oberfläche des Proteins tritt (Partch et al. 2005, siehe auch Abschnitt 2.1.4.1 und Abb. 2.8). Auf diesem C-Terminus ist das Antigen des verwendeten Antikörpers lokalisiert. Die einfachste Erklärung ist, dass der Antikörper nur die lichtaktivierte Konformation von Cry1a markiert. Es könnte allerdings auch zu einer Degradation des Proteins im Dunkeln gekommen sein. Um dies auszuschließen, wurden Hühner nach einer 30-minütigen Vorbehandlung im Dunkeln wieder für 5 Minuten in Licht (hier UV-Licht) gebracht. Es wurde erneut Cry1a vom Antikörper gebunden (Abb. 2.15). Dies macht eine Degradation nicht sehr wahrscheinlich, da Cry1a im Außensegment lokalisiert ist und die erneute Synthese von Proteinen im Innensegment und der Transport ins Außensegment deutlich mehr Zeit als 5 Minuten in Anspruch nehmen würde. Zur Erinnerung: normalerweise werden an jedem Tag nur ca. 40 Disks erneuert (Young 1978). Auch in Verhaltensversuchen mit Rotkehlchen funktioniert der Magnetkompass in Kontrollbedingungen normal, auch wenn sie am Vortag im Dunkeln getestet wurden. Würde das Protein im Dunkeln abgebaut, würde der Magnetkompass dann nicht und auch generell morgens wohl nie funktionieren. In meiner Studie zur Lokalisation von Cry1a konnte ich keine Hinweise auf eine Reoxidation außerhalb des Rezeptors finden. Dies macht es nicht wahrscheinlich, dass eine schnelle Reoxidation im Pigmentepithel wie beim Retinal auch bei Cry1a vorkommt. Da Cry1a auch nicht an seinem Produktionsort im Innensegment des Fotorezeptors nachweisbar ist und auch die Opsine oftmals nicht in ihrer Produktions- und/oder auch Transportform nachgewiesen werden können, habe ich bereits in Abschnitt 2.4.2.1 diskutiert, dass Antikörper teilweise Proteine nur in bestimmten Konformationen binden. Ich gehe also davon aus, dass nur die lichtaktivierte Konformation von Cry1a von diesem Antikörper gebunden wird. Auch Cry4 konnte in einer Studie nach Lichtbehandlung nur in bestimmter Konformation von einem Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings wurden die Retinae der Hühner in dieser Studie vorab lysiert (Watari et al. 2012).

2.5.1.2 Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht

Die Ergebnisse der Versuche unter sechs monochromatischen Lichtern mit niedriger Intensität ($0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, gekennzeichnet mit XS , und 8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$, gekennzeichnet mit S), sind in Abb. 2.16 dargestellt. In UV^{XS} , Blau (B^S) und Türkis (T^S) ergibt sich ein deutliches Färbepild, und somit ist lichtaktiviertes Cry1a vorhanden (Abb. 2.16 UV^{XS} , B^S , T^S). In Grün (G^S) gibt es zwar lichtaktiviertes Cry1a, allerdings liegt die Menge unter der der kurzwelligeren Lichter. Dies ist am schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis und somit dem erhöhten Hintergrund festzumachen (Abb. 2.16 G^S). In Gelb (Y^S) konnte ich mehr lichtaktiviertes Cry1a als unter G^S feststellen (Abb. 2.16 Y^S), unter R^S ist allerdings, wie bereits im Dunkeln, kein lichtaktiviertes Cry1a vorhanden (Abb. 2.16 R^S).

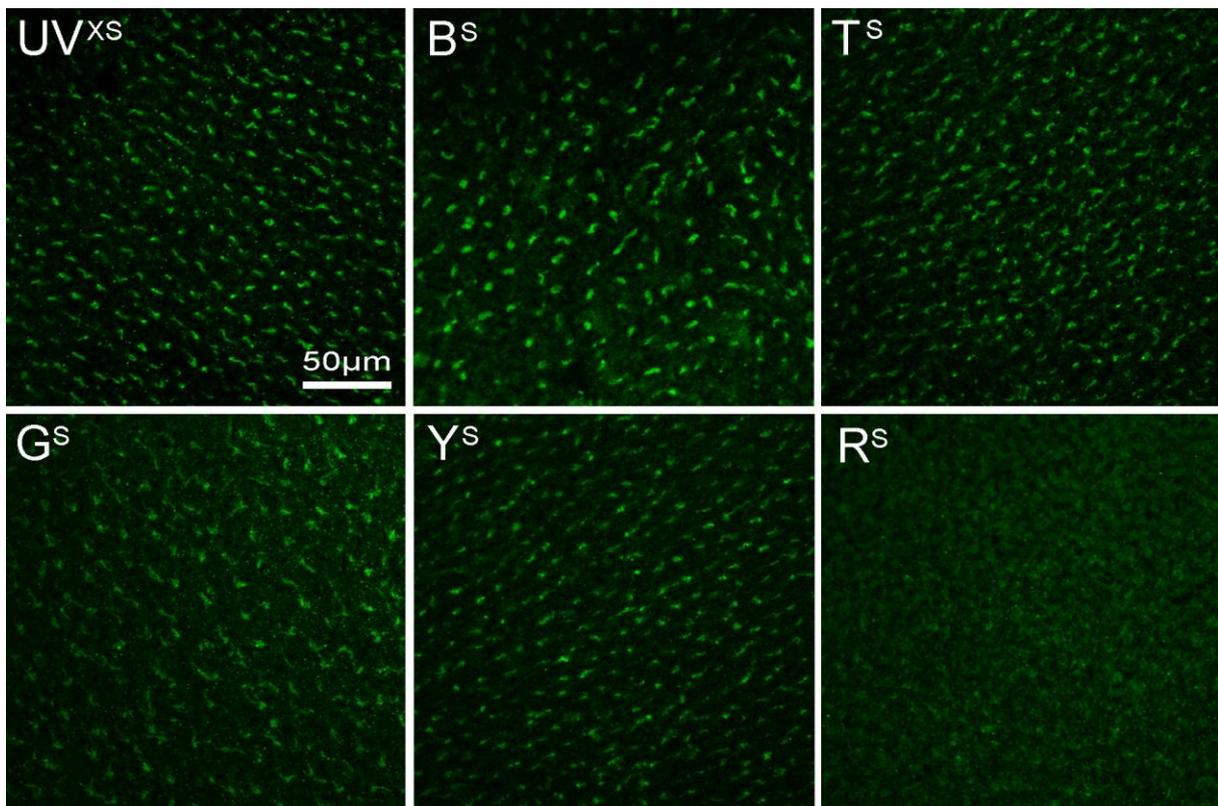


Abb. 2.16 Lichtaktivierung von Cry1a nach der Behandlung mit verschiedenen monochromatischen Lichtern. Die Lichtbedingungen sind jeweils in der oberen linken Ecke markiert. UV – Ultraviolett, B – Blau, T – Türkis, G – Grün, Y – Gelb, R – Rot, XS – $0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, S – 8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$. In UV^{XS} , B^S und T^S ist viel lichtaktiviertes Cry1a vorhanden. In G^S ist aktiviertes Cry1a vorhanden, allerdings weniger als in den kurzwelligeren Lichtbereichen. Dies ist am schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis und somit am erhöhten Hintergrund festzustellen. In Y^S ist mehr lichtaktiviertes Cry1a vorhanden als in G^S , in R^S hingegen konnte ich keinerlei lichtaktiviertes Cry1a nachweisen.

Die Konformationsänderung des Cryptochroms kommt durch den Redox-Zyklus des Flavins zustande. Es stellt sich nun die Frage, in welchem Oxidationszustand das Flavin sich

befindet, wenn der C-Terminus des Cryptochroms durch den von mir verwendeten Antikörper gebunden wird. Das Absorptionsspektrum von volloxidiertem Flavin (FAD_{ox}) liegt im Bereich von UV bis circa 500 nm (Zfg. Chaves et al. 2011), es wird dann zur Semichinonform ($FADH^\bullet/Trp^\bullet$) reduziert. $FADH^\bullet/Trp^\bullet$ kann entweder unabhängig von Licht wieder zu FAD_{ox} oxidiert werden oder durch Licht ein weiteres Elektron aufnehmen und so in die vollreduzierte Form übergehen (Müller & Ahmad 2011). Das Absorptionsspektrum von $FADH^\bullet/Trp^\bullet$ ist gegenüber FAD_{ox} im langwelligeren Bereich erweitert und reicht bis circa 600 nm für neutrales Semichinon und bis circa 560 nm für anionisches Semichinon z. B. beim Menschen (Vieira et al. 2012). In einer weiteren lichtunabhängigen Reaktion wird die

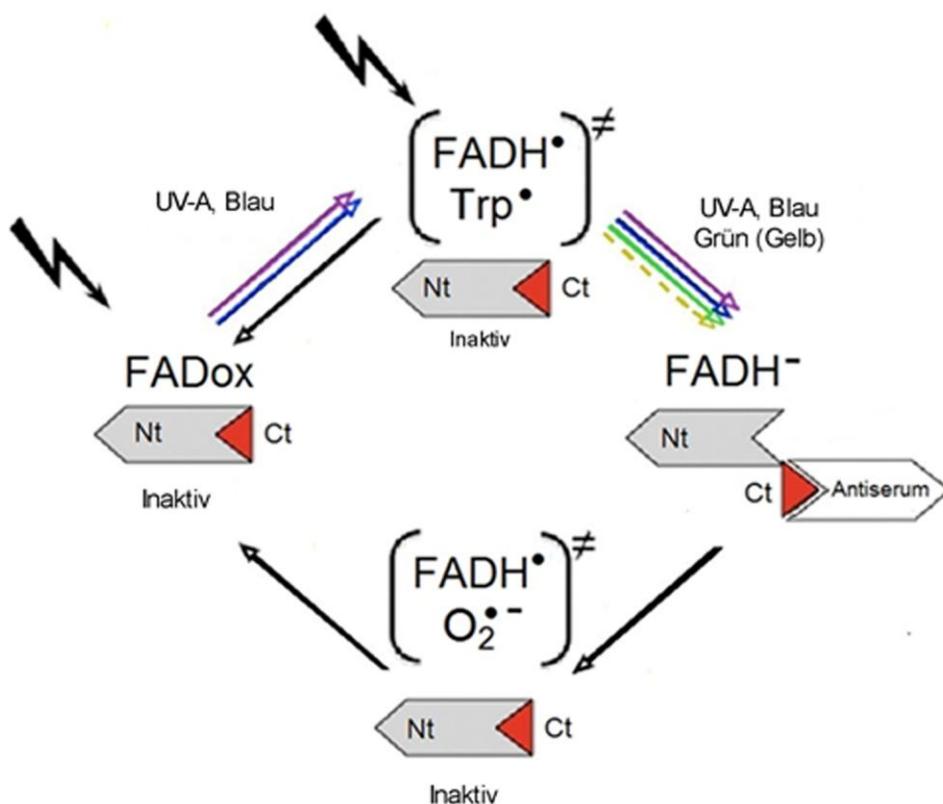


Abb. 2.17 Redox-Zyklus von Flavin. Die Belichtung von Cryptochrom führt zu einem kontinuierlichen Zyklus zwischen dem oxidierten und dem radikalischen Zustand von FAD im kleinen Zyklus (FAD_{ox} zu $FADH^\bullet/Trp^\bullet$ und zurück, gekennzeichnet mit einem schwarzen Pfeil zwischen den beteiligten Reaktionspartnern) und zwischen dem oxidierten und dem reduzierten Zustand von FAD im großen Zyklus (FAD_{ox} – $FADH^\bullet/Trp^\bullet$ – $FADH^-$ – $FADH^\bullet/O_2^\bullet$ – FAD_{ox}). Sowohl während der Reduktion als auch während der Oxidation wird eine Semichinonform (FAD^\bullet) gebildet, die sich allerdings durch ihre verschiedenen Reaktionspartner unterscheidet. Die Lichtreaktion von $FADH^\bullet/Trp^\bullet$ läuft schneller ab als die lichtunabhängige Reoxidation (Müller & Ahmad 2011). Der von mir verwendete Antikörper bindet vermutlich Cry1a nur, wenn das Flavin in der vollreduzierten Form ($FADH^-$) vorliegt, da nach der Behandlung in grünem Licht Cry1a gebunden wird, nach der in rotem Licht nicht (abgeändert aus Nießner et al. 2013).

vollreduzierte Form des Flavins (FADH-) erneut zu FADH° oxidiert. Allerdings sind die Interaktionspartner dieser halbreduzierten Form andere als während der Reduktion, nämlich FADH°/O₂°- (siehe auch Abschnitt 2.6.5). Mit der erneuten Bildung von FAD_{ox} ist der Zyklus abgeschlossen (siehe auch Abb. 2.17).

In UV-Licht, blauem und türkisem Licht kann der gesamte Redox-Zyklus des Flavins durchlaufen werden, und es ist aktiviertes Cryptochrom vorhanden. Unter Grün ist weniger aktiviertes Cry vorhanden, da hier nur FADH°/Trp° angeregt wird. Vor dem Versuch befinden sich die Hühner im vollen Spektrum des Lichts, und alle Formen des Redox-Zyklus liegen vor. Grünes Licht wird von dem noch vorhandenen FADH°/Trp° absorbiert, es kann aber kein neues Semichinon durch die Reduktion von FAD_{ox} gebildet werden. Da unter Rot kein aktiviertes Cry1a gebunden wird und auch hier noch FADH°/Trp° vorhanden sein sollte, ist davon auszugehen, dass nur FADH- den Zustand des Cryptochroms generiert, der vom Antikörper gebunden wird. Bei der Reaktion von FADH°/O₂°-, das während der Reduktion zu FAD_{ox} gebildet wird, wird der C-Terminus wieder nach innen gebracht, und somit kann Cry1a hier nicht vom Antikörper gebunden werden. Nach der Belichtung in Gelb ist mehr FADH- vorhanden als unter Grün, obwohl Gelb an der Grenze des Absorptionsspektrums von FADH°/Trp° liegt. Eventuell ist nach einer halben Stunde Belichtung weniger FADH°/Trp° unter Gelb als unter Grün verbraucht, und folglich kann unter Gelb noch mehr FADH°/Trp° reduziert werden als unter Grün.

2.5.1.3 Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht höherer Intensität

Die Menge von lichtaktiviertem Cry1a nach der Erhöhung der Intensität (siehe Tab. 2.3) oder der Verdoppelung der Zeit der Belichtung auf eine Stunde ist in Abb. 2.18 dargestellt. In UV und B gibt es weder bei der Intensitätserhöhung noch nach der Zeitverlängerung einen Unterschied in der Menge von lichtaktiviertem

Tab. 2.3 Intensitäten der Lichter

Intensität in quanta s ⁻¹ m ⁻²	Abkürzung
0,8 x 10 ¹⁵	XS
8 x 10 ¹⁵	S
20 x 10 ¹⁵	M
54 x 10 ¹⁵	L
≥ 200 x 10 ¹⁵	XL

Cry1a (Abb. 2.18 Spalte UV und B). In T führt speziell die Intensitätserhöhung, aber auch die doppelte Zeit zu weniger lichtaktiviertem Cry1a (Abb. 2.18 Spalte T). Allerdings kam es unter diesen Bedingungen zu Unterschieden der Intensität der immunhistologischen Färbung innerhalb der Retina. Unter G konnte ich nach beiden Veränderungen der Versuchsbedingung kein (bzw. kaum noch) lichtaktiviertes Cry1a mehr nachweisen (Abb. 2.18 Spalte G). In Abb. 2.18 (letzte Zeile) ist die Menge des lichtaktivierten Cry1a nach einer 30-minütigen Vorbehandlung im Dunkeln und einer anschließenden 30-minütigen Lichtbehandlung in den verschiedenen monochromatischen Lichtern dargestellt. In UV^{XS}, B^S

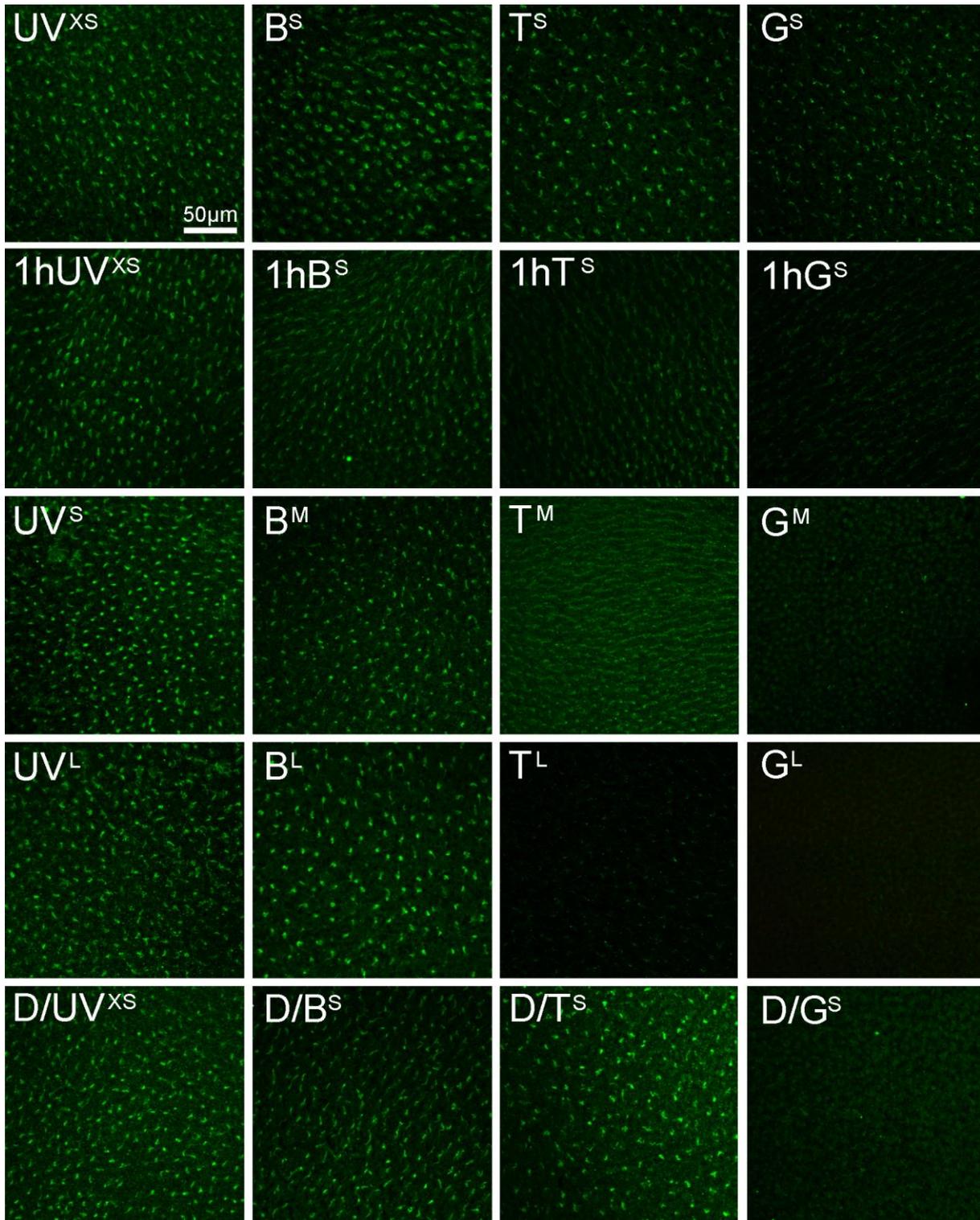


Abb. 2.18 Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht hoher Intensität. Nach einer Zeitverlängerung (Zeile 2) oder einer Intensitätserhöhung (Zeile 3 und 4) liegt in UV und B weiterhin lichtaktiviertes Cry1a vor. Im Vergleich zur Kontrollbedingung (Zeile 1) liegt in T in beiden Fällen weniger und in G kein lichtaktiviertes Cry1a mehr vor. Die Hühner wurden vor der Behandlung in Tageslicht gehalten. Nach der Vorbehandlung in Dunkelheit (Zeile 5) ist nach der erneuten Behandlung in grünem Licht Cry1a nicht nachweisbar. In T, B und UV ist die Intensität der Färbung vergleichbar mit der in Zeile 1. UV – Ultraviolett, B – Blau, T – Türkis, G – Grün, $^{XS} = 0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, $^S = 8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, $^M = 20 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, $^L = 54 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, $^{XL} \geq 200 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, 1 h – Zeitverlängerung von 30 min auf 1 h, D/ – im Dunkeln für 30 min vorbehandelt.

und T^S ist lichtaktiviertes Cry1a in derselben Menge wie nach der Vorbehandlung im Tageslicht (Abb. 2.17 und 2.18 Zeile 1) vorhanden. In G hingegen bewirkt eine Vorbehandlung im Dunkeln, dass kein lichtaktiviertes Cry1a mehr nachweisbar ist.

UV und blaues Licht können in gleichem Maße von FAD_{ox} wie von FADH°/Trp° absorbiert werden, und der Zyklus kann auch bei höheren Intensitäten oder längeren Belichtungszeiten durchlaufen werden. Auch kann er nach einer Vorbehandlung im Dunkeln wieder neu gestartet werden. In Türkis kommt es bei einer Erhöhung der Belichtungsstärke oder -zeit zu weniger nachweisbarem FAD_{red}, vermutlich ist die Rate der Reduktion von FADH°/Trp° in FAD_{red} höher als die von FAD_{ox} zu FADH°/Trp°, da das Absorptionsspektrum von FAD_{ox} nur bis circa 500 nm reicht. So wird weniger FADH°/Trp° produziert als verbraucht. Nach der Vorbehandlung in Dunkelheit kann in Türkis wieder FADH°/Trp° produziert werden. Dies zeigt, dass Türkis durchaus von FAD_{ox} absorbiert wird. In grünem Licht ist aktiviertes Cry1a nur nachweisbar, wenn die Belichtungszeit und die Intensität gering sind und vor allem die Hühner vorab in Tageslicht vorbehandelt waren. Nach einer Stunde in grünem Licht steht kein FADH°/Trp° mehr zur weiteren Reduktion zur Verfügung, es ist offensichtlich verbraucht. Nach der Vorbehandlung im Dunkeln könnte durchaus noch FADH°/Trp° vorhanden sein, allerdings nicht mehr, als nach 30-minütiger Belichtung im Grünen verbraucht wird. Das zeigt, dass grünes Licht nicht von FAD_{ox} absorbiert wird und der Zyklus so auch nicht neu gestartet werden kann. Insgesamt werden die bekannten Absorptionsbereiche für Cryptochrom (Zfg. Chaves et al. 2011) auch für Hühner Cry1a bestätigt. Bei Vögeln wurde bis jetzt nur ein Absorptionsspektrum für Cry1a bei Gartengrasmücken erstellt, was allerdings keine Absorption im grünen und gelben Bereich des Lichts zeigte (Liedvogel et al. 2007b). Insgesamt bildet dieser Versuch meiner Arbeit das erste Mal den Absorptionsbereich von Cryptochrom in vivo unter natürlichen Bedingungen ab.

2.6 Diskussion der Magnetrezeption durch Cryptochrom

2.6.1 Potenzielle Funktionen der Proteine Cry1a und Cry1b

Ich nehme an, dass Cry1a das Rezeptormolekül des Magnetkompasses ist, denn es erfüllt die Bedingungen, die in Bezug auf dessen Lokalisation im Modell (Ritz et al. 2000) entwickelt wurden, hinreichend (siehe auch Abschnitt 2.4.2.2). Cry1b erfüllt die Bedingungen eher nicht, und ich vermute, dass Cry1b eine andere Funktion hat.

Aus den Lokalisationen von Cry1b kann nicht ohne Weiteres auf die potenzielle Funktion geschlossen werden. Allerdings sind Cryptochrome neben dem Melanopsin eines der wichtigsten fotosensitiven Proteine, die circadiane Rhythmen steuern. Bei Vögeln werden circadiane Rhythmen prinzipiell über das Pineal, den SCN und die Retina gesteuert. Eine Studie von Haque et al. (2002) über die Expression von Cryptochrom 1 mRNA in Hühnerretinae zeigt die höchste mRNA-Expression in den Fotorezeptoren und den Ganglienzellen. Eine erhöhte Konzentration wurde auch in der inneren Körnerschicht gefunden, die die Amakrinzellen, aber auch die deplatzierten Ganglienzellen enthält. Untersuchungen in verschiedenen Licht- und Dunkelrhythmen lassen die Autoren darauf schließen, dass die Expression von Cry1 bei Hühnern durch Licht, aber auch durch die innere Uhr reguliert wird. Die Autoren spekulieren, dass die Expression von Cry1 im Fotorezeptor die tagesrhythmischen Vorgänge in der Retina steuert, wie beispielsweise die circadiane Expression von Proteinen im Fotorezeptor-Innensegment, das rhythmische Einschleusen von Proteinen ins Außensegment oder den Abbau der Diskmembranen am apikalen Ende des Rezeptors. Die Expression in den Ganglienzellen wird als Protein der inneren Uhr interpretiert, welches wie bei Säugetieren in den SCN projizieren könnte (Haque et al. 2002). Auch bei Mäusen¹⁴ und bei japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*)¹⁵ konnte Cry1 im Auge als circadianer Fotorezeptor identifiziert werden (Fu et al. 2002, Zfg. Sancar 2003).

Ich denke, es ist durchaus in Betracht zu ziehen, dass Cry1b in den Innensegmenten, wie von Haque et al. (2002) vorgeschlagen, die circadianen Vorgänge im Fotorezeptor steuert. Bei Cry1b in den Ganglienzellen kann man aus den genannten Gründen (siehe Abschnitt 2.3.2.1) spekulieren, ob die Expression etwas mit den besonderen physiologischen Bedingungen des Zuges zu tun hat. Das Auslösen der Zugstimmung erfolgt einerseits über

¹⁴ Bei Mäusen wurde Cryptochrom 1 und auch Cryptochrom 2 in den Ganglienzellen und in der inneren Körnerschicht lokalisiert. Bei Mäusen, die im Dunkeln gehalten werden, verkürzt sich der Tagesrhythmus bei Fehlen von Cry1, und bei Fehlen von Cry2 verlängert er sich. Fehlen beide Cryptochrom-Formen, wird der Tagesrhythmus arrhythmisch (Zfg. Sancar 2003).

¹⁵ Bei japanischen Wachteln wurde die Expression in konstanter Dunkelheit trotzdem noch rhythmisch beschrieben (Fu et al. 2002, Zfg. Sancar 2003).

endogene Faktoren und andererseits über die Tageslänge als exogener Faktor (Berthold 1990). Zugstimmung kann durch Verlängerung der Tageslänge auch künstlich ausgelöst werden (z. B. W. Wiltschko et al. 2002b). Ich habe Cry1b allerdings während des Zugs und nicht davor nachgewiesen. Eine Möglichkeit wäre, dass die Bestimmung der Tageslänge auf dem Zug oder die Steuerung der nächtlichen Zugunruhe selbst durch Cry1b unterstützt oder beeinflusst wird. Die Aktivität von Rotkehlchen und Gartengräsmücken verlängert und/oder verschiebt sich während des Zuges, da beide Arten Nachtzieher sind und die Hauptzugaktivität dann im Dunkeln stattfindet. Außerhalb der Zugzeit sind beide Vogelarten nachts nicht aktiv.

2.6.2 Was macht den UV/V-Zapfen zum geeigneten Magnetrezeptor?¹⁶

Cry1a kommt ausschließlich in den UV/V-Rezeptoren vor und nicht in einem der anderen Zapfen oder den Stäbchen. Daraus ergibt sich die Frage, was die UV/V-Zapfen geeigneter als die anderen Rezeptoren für den Magnetkompass macht.

Die UV/V-Zapfen sind wie alle anderen Zapfen voll in das tetrachromatische Farbsehen der Vögel integriert (Smith et al. 2002). Sie machen ca. 10% der Zapfen aus und sind so eine kleine Population der Zapfen (Meyer & May 1973, Zfg. Hart 2001, Kram et al. 2010). Dies macht sie zu einer recht ökonomischen Variante für den Magnetkompass. Allerdings scheint eine weitere Besonderheit dieser Zapfen einen besseren Grund zu liefern als reine Ökonomie. Die Zapfen der Vögel – aber auch die der Reptilien und Fische – haben Öltröpfchen verschiedener Farbe, die als Kantenfilter wirken, bevor das Licht auf das Außensegment und damit auf die Opsine und das Cryptochrom trifft (Zfg. Bowmaker 1998). Alle Öltröpfchen der blauen, grünen und roten Zapfen filtern das ultraviolette Licht aus, die der UV-Zapfen nicht. Die Öltröpfchen der UV-Zapfen sind transparent und lassen alle Wellenlängen des Lichts durch (Maier & Bowmaker 1983). Cryptochrom ist unter anderem UV-licht-sensitiv. Das Flavin des Cryptochroms absorbiert neben blauem Licht in seiner Semichinonform auch grünes Licht (Bouly et al. 2007, Liedvogel et al. 2007b, Müller & Ahmad 2011). Alle diese Wellenlängen des Lichts (besonders das UV-Licht) werden nur von den transparenten Öltröpfchen der UV/V-Zapfen durchgelassen. Natürlich erreichen auch alle diese Wellenlängen des Lichts die Stäbchen, da diese keine Öltröpfchen haben. Diese machen allerdings etwa 40% der gesamten Fotorezeptoren bei Hühnern und anderen tagaktiven Vogelarten aus (Kram et al. 2010, Oehme 1962, McNeil et al. 2005). Bei nachtaktiven Arten kann sich dies – bei Eulen als extremes Beispiel – auf bis zu 96%

¹⁶ Diese weiterführenden Gedanken wurden bereits in *Communicative & Integrative Biology* veröffentlicht (Bischof et al. 2011).

steigern (Oehme 1961). Außerdem ist die hohe Lichtsensitivität der Stäbchen eventuell zu dominant, um das Signal des Magnetkompasses noch ausfiltern zu können.

Es stellt sich die Frage, ob das Cryptochrom ein Signal unabhängig vom Opsin generiert oder ob es die Signalkaskade des Opsins moduliert. Trifft ein Lichtquant im visuellen Prozess auf ein Opsin, kommt es zu einer Konformationsänderung des Retinals. Dieses setzt über Transducin eine Signalkaskade in Gang, die am Ende die Ionenkanäle in der den Rezeptor umgebenden Membran schließt. Der Rezeptor hyperpolarisiert. Über die Signalkaskade des Cryptochroms ist zurzeit nichts bekannt. Verhaltensversuche mit Rotkehlchen unter monochromatischen Lichtern zeigen, dass der Magnetkompass im Bereich von 372 nm (UV) bis 565 nm (grün) funktioniert (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). In diesen Versuchen wurden LED-Lichter verwendet, die ein sehr schlankes Spektrum (ca. 30-40 nm bei halber Intensität) aufweisen (siehe Abb. 2.2). Im grünen Bereich der LEDs ist kein UV-Licht mehr messbar (Nießner et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass UV-Sehen und Magnet-Sehen unabhängig voneinander funktionieren und dass Cryptochrom eine eigene Signalkaskade besitzt oder die des Opsins beispielsweise am Transducin eigenständig aktivieren kann. In einer neuen Veröffentlichung schlagen Stoneham et al. (2012) sogar vor, dass Cryptochrom (bzw. der Partner des Radikalpaares unter Einfluss des Magnetfeldes) das Retinal aktivieren kann.

2.6.3 Die Trennung von visuellem und magnetischem Signal¹⁷

Es spricht alles dafür, dass der UV/V-Zapfen mit Cry1a als Rezeptormolekül der geeignete Rezeptor für den Magnetkompass ist. Der Output des Rezeptors ist allerdings vermutlich gleich, ob er nun vom Opsin oder vom Cryptochrom ausgelöst wurde. Es stellt sich die Frage, wie diese beiden Signale voneinander getrennt werden könnten. An dieser Stelle können allerdings nur Vermutungen diskutiert werden.

Zapka und Kollegen (2010) erwägen, dass bei hellem Tageslicht das magnetische Signal maskiert werden könnte. Sie vermuten deshalb, dass der Radikalpaar-Mechanismus bei nachziehenden Vogelarten eine spezielle Anpassung an dieses Verhalten ist und es für Magnetrezeption bei Tageslicht einen zweiten, separaten Mechanismus gibt. Ich halte das allerdings für unwahrscheinlich, da sowohl bei tagaktiven Vögeln wie Hühnern als auch bei nachtaktiven Vögeln wie Rotkehlchen derselbe Radikalpaar-Mechanismus gefunden wurde, der dem Magnetkompass zugrunde liegt. In Versuchen mit Hühnern (W. Wiltschko et al. 2007a) und Zebrafinken (Keary et al. 2009) konnte die Kompassorientierung wie bei

¹⁷ Diese weiterführenden Gedanken wurden bereits in *Communicative & Integrative Biology* veröffentlicht (Bischof et al. 2011).

nachtziehenden Rotkehlchen (Thalau et al. 2005) durch Radio-Frequenz-Felder gestört werden. Auch die Lokalisation von Cry1a ist bei Hühnern und Rotkehlchen gleich und weist nicht auf unterschiedliche Mechanismen hin.

Eine Variante, magnetische und visuelle Signale voneinander zu trennen, wäre ein Vergleich von UV/V-Zapfen mit und ohne Cryptochrom. So könnte bei benachbarten Rezeptoren der direkte Vergleich angestellt werden, wie der Output zwischen rein visuell einerseits und magnetisch und visuell andererseits variiert. Ein solches festes neuronales Vergleichsnetzwerk gibt es nicht, da alle UV/V-Zapfen Cry1a enthalten, und wäre flächendeckend zu aufwendig. Es gibt auch keine Hinweise auf eine solche Verschaltung (Kram et al. 2010). Ein Abgleich mit dem Beta-Band der Opsine, das UV-empfindlich ist, wäre eine ähnliche Option. Allerdings maskieren die gefärbten Öltröpfchen dieses Beta-Band (Maier & Bowmaker 1983, Zfg. Hart 2001). Ähnlich diesem Vergleich könnte ein Abgleich zwischen dem Input des UV/V-Zapfens und dem des Blau-Zapfens zum gewünschten Ergebnis führen, weil die Wellenlängen-Sensitivität des Blau-Zapfens der des UV/V-Zapfens am nächsten kommt und bei ca. 400 nm überlappt. Der Abgleich zwischen zwei Farbrezeptoren wäre auf Retina-Ebene vorstellbar, aber nicht in einer 1:1-Verschaltung. Durch die Vielzahl an Interneuronen in der Retina gibt es allerdings diverse Möglichkeiten der Verarbeitung. Dieser Abgleich könnte also schon auf Ganglienzellniveau passieren oder passiert sein und dann von speziellen hierfür zuständigen Ganglienzellen als Magnetinformation an höhere Zentren weitergegeben werden. Einzelne Farben werden auch von farbcodierten Ganglienzellen an das Gehirn weitergeleitet (Ventura et al. 2001, Zfg. Dacey 2000). In der Retina von Schildkröten wurden drei verschiedene Ganglienzelltypen beschrieben, die auf Stimulation der UV-Zapfen mit Erregung und auf Stimulation der Blauzapfen mit Inhibition reagieren oder umgekehrt (Ventura et al. 2001). Diese speziellen Ganglienzellen würden sich somit prinzipiell für eine solche Verarbeitung eignen.

Die Trennung von visuellem und magnetischem Signal ist auch in höheren Zentren vorstellbar. Bislang wurden zwei Zentren ermittelt, in der die Retina topografisch abgebildet ist, das Tectum opticum und der visuelle Wulst (Keary et al. 2010). Dies ist die Voraussetzung für eine Zuordnung zum Ort der Signalentstehung und eine spätere Interpretation der magnetischen Feldlinien. In beiden Zentren wurden bereits Aktivitäten nach Veränderung des Magnetfeldes oder dessen Komponenten festgestellt (Semm & Demaine 1978, Semm et al. 1984, Mouritsen et al. 2005, Heyers et al. 2007, Zapka et al. 2010). Diverse Möglichkeiten der Trennung der beiden Signale sind auf höheren Verarbeitungsebenen vorstellbar. Zurzeit kann man hier nur spekulieren, aber ein Beispiel

soll hier genannt werden¹⁸: Das visuelle Bild besteht aus vielen verschiedenen starken Kontrasten und Konturen wie Ecken und Kanten. Das magnetische Signal besteht vermutlich aus einem helleren oder auch dunkleren diffusen Fleck ohne scharfe Übergänge. Diese verschiedenen Bilder bestehen aus unterschiedlichen Raumfrequenzen. Bilder und Kanten bestehen aus mittleren und hohen räumlichen Frequenzen und ein diffuser Fleck aus niedrigen Raumfrequenzen. Mit einem sogenannten Tiefpassfilter, der nur bestimmte Raumfrequenzen durchlässt, könnte das magnetische Signal extrahiert werden. Vögel, deren Augen durch eine Mattscheibe verdeckt waren, die zwar lichtdurchlässig war, allerdings kein Kontursehen zulässt, konnten sich nicht mehr magnetisch orientieren (Stapput et al. 2010). Kontursehen scheint also essenziell für die Verarbeitung des Magnetsignals zu sein.

2.6.4 Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a und Magnetrezeption

Für Rotkehlchen und Hühner ist die gleiche Art von Magnetkompass nachgewiesen worden (W. Wiltschko et al. 2007a), und es gibt auch keine Unterschiede in der Lokalisation von Cry1a, dem potenziellen Rezeptormolekül des Magnetkompasses (siehe Abschnitt 2.4). Auch sind die für die Versuche zur Charakterisierung der Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a verwendeten LEDs identisch mit denen, die für die verhaltensbiologischen Versuche mit Rotkehlchen verwendet werden. Rotkehlchen sind bei monochromatischem UV-Licht einer Intensität von $0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$ Blau, Türkis und Grün einer Intensität von 8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$ mit dem Magnetkompass in Zugrichtung orientiert (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Auch unter Weißlicht können sich Vögel auf der Basis eines Radikalpaar-Mechanismus mit dem Magnetkompass orientieren (Ritz et al. 2004, W. Wiltschko et al. 2007a, Keary et al. 2009). In diesen Bedingungen liegt Cry1a nach meinen Befunden in lichtaktivierter Form vor. In den Versuchsbedingungen Rot und Dunkelheit einerseits und Grün und Türkis der höheren Intensitäten (54×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$) andererseits können sich Rotkehlchen nicht mit dem Magnetkompass orientieren. Unter diesen Bedingungen liegt Cry1a hauptsächlich inaktiv vor. Somit kann von Cry1a auch kein Radikalpaar gebildet werden, das zur Detektion der Feldlinien genutzt werden kann. Für diese Wellenlängen und Intensitäten stimmt die Charakteristik der Lichtaktivierung von Cry1a gut mit den Verhaltensdaten von Rotkehlchen überein.

In Ultraviolett (8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$) und Blau (54×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$) höherer Intensität liegt nach meinen Befunden zwar ausreichend lichtaktiviertes Cry1a vor, allerdings funktioniert der Magnetkompass bei Rotkehlchen in Verhaltensversuchen nicht. Hier könnte es entscheidend sein, dass Cry1a in den UV/V-Zapfen liegt. Wird das Opsin (automatisch auch Cry1a) von ultraviolettem oder blauem monochromatischem Licht angeregt, könnte der

¹⁸ Andere Beispiele können aus Bischof et al. 2011 entnommen werden.

Struktur der Magnetrezeptoren im Auge: **Diskussion**

Rezeptor an seine Sättigungsgrenze gebracht werden, da unklar ist, ob in monochromatischem UV-Licht die Schutzmechanismen des Auges funktionieren. Ist der Fotorezeptor an seiner Sättigungsgrenze, würde das Magnetsignal vermutlich maskiert werden. Bei einer Anregung mit schwachem monochromatischem UV-Licht werden auch das Opsin und das Cry1a angesprochen, der Output ist vermutlich geringer, so dass die Steigerung des Outputs an den magnetisch relevanten Stellen noch ausgewertet werden kann. Bei Sonneneinstrahlung ist die Intensität des ultravioletten Lichtes um ein Vielfaches höher als bei monochromatischem UV-Licht einer Intensität von 8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$. Doch wird das Auge dann, beispielsweise durch Regulation des Lichteinfalls über die Pupillengröße oder Abschirmung der Außensegmente durch Einschieben in das Pigmentepithel, vor dem Übersättigen der Rezeptoren geschützt. Hiermit kann für den Magnetkompass ebenso gewährleistet werden, dass mit viel lichtaktiviertem Cry1a der UV/V-Rezeptor auch bei hellem Licht nicht an seine Sättigungsgrenze gebracht wird.

Dies erklärt allerdings nicht, warum unter gelbem Licht zwar lichtaktiviertes Cry1a vorliegt, sich Rotkehlchen aber nicht mit dem Magnetkompass orientieren (W. Wiltschko & Wiltschko 1999). Gelbes Licht scheint sich allerdings auch in Versuchen mit bichromatischen Lichtern störend auszuwirken. Auch in Kombination mit beispielsweise blauem Licht nutzen Rotkehlchen ihren Magnetkompass nicht (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b).

Einen echten Widerspruch zu meinen Daten ergeben Verhaltensversuche, in denen sich Rotkehlchen nach einer Vorbehandlung im Dunkeln in schwachem monochromatischem grünen Licht orientieren konnten (W. Wiltschko et al. 2004). Unter dieser Bedingung ist kein lichtaktiviertes Cry1a nachweisbar. In derselben Veröffentlichung wurden Daten unter monochromatischem Rot mit einer Vorgewöhnung in demselben Rot gezeigt, die wie in Dunkel vorgewöhnt und in Grün getestet im Frühjahr nach Norden wiesen. Diese Daten stellten sich später allerdings als Fixrichtung heraus, werden also nicht von Cryptochrom vermittelt (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Es sollte folglich getestet werden, ob die nördliche Orientierungsrichtung im Frühjahr unter monochromatischem Grün mit einer Vorgewöhnung in Dunkelheit sich im Herbst wirklich in eine südliche Orientierungsrichtung umdreht und somit auf den Magnetkompass zurückgeht.

Prinzipiell wurden die Verhaltensantworten der Vögel unter monochromatischen Lichtern, bei denen der Magnetkompass nicht funktioniert, so interpretiert, dass dies an der Verarbeitung der ungleich angeregten Farbrezeptoren liegen könnte und es somit ein Problem in höher verschalteten neuronalen Zentren gäbe (R. Wiltschko et al. 2007). Nach meinen Befunden scheint es allerdings zumindest teilweise mit der Lichtaktivierung des Cryptochroms direkt zusammenzuhängen und somit auch ein peripheres Problem darzustellen.

2.6.5 Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a und der Radikalpaar-Mechanismus

Flavin bildet an zwei Stellen im Redox-Zyklus Radikalpaare, nämlich durch die Bildung der beiden halbreduzierten Formen $\text{FADH}^\bullet/\text{Trp}^\bullet$ und $\text{FADH}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$. Diese unterscheiden sich durch ihre Interaktionspartner. Normalerweise ist $\text{FADH}^\bullet/\text{Trp}^\bullet$ die signalgebende Form des Cryptochroms (Partch et al. 2005). Allerdings haben meine Versuche gezeigt, dass Cry1a nach der Belichtung in Grün aktiviert vorliegt. In Verhaltensversuchen sind Rotkehlchen in grünem Licht mit dem Magnetkompass orientiert (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Da FAD_{ox} grünes Licht nicht absorbieren kann, kann das Radikalpaar von $\text{FADH}^\bullet/\text{Trp}^\bullet$ unter grünem Licht auch nicht gebildet werden. Daraus ergibt sich, dass das Radikalpaar, das bei der Bildung von $\text{FADH}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ entsteht, vermutlich das für den Magnetkompass entscheidende ist. Auch in Verhaltensversuchen mit zugunruhigen Rotkehlchen mit verschiedenen oszillierenden Feldern wurde berechnet, dass das für den Magnetkompass entscheidende Radikalpaar Interaktionspartner ohne magnetische Kerne besitzt. Dies trifft nur für $\text{FADH}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ zu, da hier Sauerstoff einer der Interaktionspartner ist (Ritz et al. 2009).

Wenn allerdings $\text{FADH}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ das entscheidende Radikalpaar für den Magnetkompass bildet, stellt sich die Frage, wie diese Form von Cryptochrom signalisiert. Normalerweise ist die Konformationsänderung des Proteins der signalgebende Weg. Hier muss also noch ein zweiter, davon unabhängiger Mechanismus zum Tragen kommen, der es dem Cryptochrom auch nach der Konformationsänderung noch ermöglicht, ein Signal weiterzuleiten. Es wäre z. B. vorstellbar, dass das Singulett/Triplett-Verhältnis dieses Radikalpaares die Rate der Reoxidation so beeinflusst, dass dadurch die Menge der vollreduzierten Form verändert wird. So würde ein messbarer Unterschied in der Menge dieser Form entstehen, der in ein neuronales Signal umgewandelt werden könnte. Meine Versuche haben gezeigt, dass das Protein durchaus eine Konformationsänderung vollzieht, allerdings ist diese eventuell eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung, um das Magnetfeld wahrnehmen zu können.

2.7 Ausblick

Es spricht zwar einiges dafür, dass die UV/V-Zapfen mit Cry1a die Rezeptoren des Magnetkompasses sind. Bewiesen ist das allerdings noch nicht. Geeignet wären hier z. B. neurophysiologische Ableitungen von UV/V-Zapfen unter Magnetfeldänderungen und konstantem Licht. Aktionspotentialableitungen aus den optischen Nerven oder die Kartierung von histochemischen Aktivitäts-Markern im Gehirn sind eher ungeeignet, da die vorgeschaltete periphere Verarbeitung in den Rezeptorzellen und Ganglienzellen der Retina vermutlich bereits sehr komplex ist.

Ich vermute, dass Cry1b sowohl im Innensegment der Fotorezeptorzellen als auch in der Ganglienzellschicht ein circadianer beziehungsweise circannualer Fotorezeptor sein könnte. Um dies zu bestätigen oder zu widerlegen, wären detaillierte Zeitreihen der Cryptochrom-Expression im Tagesgang und von verschiedenen Zugvögeln über den Jahresverlauf zu erstellen. Um eine Verbindung mit dem Zug zu bestätigen oder auszuschließen, wäre es interessant zu sehen, ob Standvögel aus einer Population von Teilziehern (beispielsweise Mönchsgrasmücken (*Sylvia atricapilla*)) Cry1b trotzdem exprimieren und ob die Expression von Cry1b in den Ganglienzellen nur bei nachziehenden Arten vorkommt.

In Bezug auf die Menge des lichtaktivierten Cryptochroms nach Belichtung mit monochromatischen Lichtern gibt es noch weitere Versuchsbedingungen, die im selben Verfahren getestet werden könnten – beispielsweise Versuche unter bichromatischen Lichtern. Die bis jetzt in Verhaltensversuchen getesteten bichromatischen Lichter (Gelb und Blau, Gelb und Türkis, Gelb und Grün) führten unerwarteterweise zu Nicht-Kompassorientierung (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Es stellt sich die Frage, ob es dort eine Reduktion der lichtaktivierten Menge des Cryptochroms wie bei hohen Intensitäten von Grün oder Türkis gibt oder ob das Cryptochrom hier nicht die entscheidende Rolle spielt und die bichromatischen Lichter zu Verarbeitungsproblemen im Gehirn oder auch schon innerhalb der Retina führen.

3 Struktur des Magnetrezeptorkandidaten im Schnabel

3.1 Einleitung

3.1.1 Das ‘Magnetometer’ der Vögel

Als Magnetometer (Teslameter oder Gaußmeter) wird ein technisches Gerät bezeichnet, das die Intensität des Magnetfelds misst; bei Vögeln wird damit ein entsprechendes Rezeptorsystem bezeichnet, das die Messung der Intensität des Magnetfeldes ermöglicht. Von diesem Sinnesorgan erhält vermutlich die Gradientenkarte (siehe auch Abschnitt 1.2) einen Teil ihrer Information, nämlich über den räumlichen Verlauf der Intensität. Theoretisch wäre in gleicher Weise auch der Verlauf der Inklination als Parameter vorstellbar, allerdings ändert sich die Inklination in ihrem Verlauf auf der Erde nur sehr wenig, z. B. im Bereich von Frankfurt auf 100 km nur um $0,7^\circ$. Die Intensität hingegen ändert sich um $2,5\text{nT/km}$.¹⁹ Da die Intensität als einziger Parameter des Magnetfeldes kein Referenzsystem benötigt, wird angenommen, dass der Verlauf der Intensität der für die Karte entscheidende Parameter des Magnetfeldes ist (R. Wiltschko et al. 2010a). Über die Struktur und Lokalisation des Magnetometers der Vögel (z. B. Fleissner et al. 2003) liegen mehr histologische Befunde vor als über den Rezeptor für den Magnetkompass, der leider nur in einer Studie untersucht wurde (Nießner et al. 2011). In verhaltensbiologischen Experimenten ist dieser Magnetrezeptor bislang allerdings seltener untersucht worden. Dies liegt daran, dass mit dem Magnetkompass die Richtung des Magnetfeldes ermittelt wird, die zumindest bei Zugvögeln zu bestimmten Jahreszeiten durch das angeborene Streben in Zugrichtung leichter untersucht werden kann (siehe auch Abschnitt 2.1). Das ‘Magnetometer’ ist eine Komponente eines multifaktoriellen Systems, mit der der Vogel seine Position bestimmen kann. Diese Positionsbestimmung kann allerdings nur im Freiland untersucht werden (z. B. R. Wiltschko et al. 2010a). Die Rezeption der Intensität des Magnetfeldes allein kann auch in Dressurversuchen im Labor untersucht werden (z. B. Mora et al. 2004, Thalau et al. 2007, Denzau et al. 2011, Freire et al. 2012); solche Versuche (sowohl Dressur wie auch Freiland) sind aber schwierig und langwierig umzusetzen, deshalb sind sie deutlich seltener durchgeführt worden.

¹⁹ Für Tauben wurde in verhaltensbiologischen Verfrachtungs-Experimenten nachgewiesen, dass sie Intensitätsunterschiede von unter 70nT (Keeton et al. 1974) bzw. 40nT (R. Wiltschko et al. 2010a) bzw. sogar 20nT (Schiffner & Wiltschko 2011) wahrnehmen.

3.1.2 Lokalisation von eisenmineralhaltigen Strukturen im Oberschnabel

Yorke beschrieb 1979 als erste, dass Magnetrezeption mit Hilfe von Magnetit funktionieren könnte. Magnetit ist ein stark magnetisches Eisenoxid (Eisen (II, III)-Oxid, $(\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Fe}^{\text{III}})_2\text{O}_4)$) und kommt in Zusammenschlüssen verschiedener Größe und Form vor. Kristalle in einer Größe von weniger als 50 nm sind superparamagnetisch (SPM), von 50 nm - 70 nm sind es Einbereichsteilchen, Single-Domain- (SD), im Größenbereich darüber sind die Teilchen Multidomain-(MD)-Magnetit. Seine magnetischen Eigenschaften hängen sowohl von der Größe als auch von der Form ab. So hat Single-Domain-Magnetit ein permanentes magnetisches Moment und wirkt wie ein kleiner Magnet, hingegen hat SPM nur dann ein magnetisches Moment, wenn ein äußeres Magnetfeld anliegt (Yorke 1979). SPM-Kristalle nehmen jede Magnetisierung an und magnetisieren sich dann parallel zu diesem Feld. Sowohl mit SD-Magnetit als auch mit SPM-Magnetit könnten theoretisch sowohl Richtung wie auch Intensität des Magnetfeldes gemessen werden (Kirschvink & Gould 1981, Kirschvink & Walker 1985, Shcherbakov & Winklhofer 1999).

Bei mehreren Wirbeltieren wurde Magnetit in der Ethmoidregion nachgewiesen (Kirschvink et al. 1985). Bei Vögeln konnten eisenhaltige Strukturen durch Remanenz-Messungen ebenfalls in der Ethmoidregion (Beason & Nichols 1984, Beason & Brennon 1986) und durch einen histologischen Eisennachweis in der Nasenhöhle identifiziert werden (Williams & Wild 2001). Allerdings lässt sich durch das Vorhandensein von Magnetit allein nicht auf einen Magnetrezeptor schließen, da es beispielsweise auch zur Versteifung bestimmter Strukturen eingelagert wird (z. B. Mataka et al. 1991). Ein Magnetrezeptor muss wie jeder Rezeptor bestimmte strukturelle und neurobiologische Merkmale erfüllen, um als solcher fungieren zu können (siehe auch Fleissner et al. 2007b): Holtkamp-Rötzler et al. (1997) beschrieben Magnetit (bzw. histologisch Eisen II/III in der Berliner-Blau-Reaktion) in einer speziellen Anordnung im Bereich des Oberschnabels von Tauben. Lichtmikroskopische Analysen der Struktur und mehrere immunhistologische Färbungen ergaben, dass sich dieses Eisen in Dendriten (afferenten Nervenendigungen) des trigeminalen Systems befindet (Hanzlik et al. 2000, Fleissner et al. 2003). Dieses Eisen wurde histologisch (Fleissner et al. 2003) und durch kristallografische Messungen als SPM identifiziert (Hanzlik et al. 2000, Tian et al. 2007). Bei Tauben konnte auch die Ultrastruktur dieser Magnetrezeptoren genau beschrieben werden (Winklhofer et al. 2001, Fleissner et al. 2003, 2007a). Durch μ -XANES-Messungen konnte man nachweisen, dass es sich in der Zusammensetzung der Eisenoxide nicht allein um Magnetit handelt, sondern vermutlich um 10% Magnetit und 90% Maghemit (Fleissner et al. 2007a). Diese Zusammensetzung der Eisenoxide rechtfertigt den in der Literatur gebräuchlichen Ausdruck magnetit-basierte Magnetrezeption nicht wirklich. Es ist angemessener, hier von eisenmineral-basierter Magnetrezeption zu sprechen. Diese

spezifische Zusammensetzung der Eisenoxide wurde mittlerweile auch im Schnabel von Gartengrasmücken, Rotkehlchen und Hühnern gefunden (Falkenberg et al. 2010).

3.1.3 Hinweise auf die Funktion der Magnetrezeptoren im Schnabel

Erste konkretere verhaltensbiologische Hinweise auf einen auf Magnetit (Eisenmineral) basierten Magnetrezeptor ergaben Versuche, bei denen die Vögel einem starken magnetischen Puls ausgesetzt wurden (W. Wiltschko et al. 1994). Magnetit kann nämlich durch einen starken magnetischen Puls ummagnetisiert werden; genauer: die Ausrichtung des magnetischen Momentes eines magnetischen Teilchens verändert sich durch einen solchen Puls, und nur ein auf Magnetit oder Maghemit basierter Magnetrezeptor würde auf diese Weise gestört. Dies bezieht sich sowohl auf SD- als auch auf SPM-Magnetit (Davila et al. 2003, 2005). Australische Brillenvögel wurden sowohl im Herbst als auch im Frühjahr auf ihre Zugrichtung getestet, nachdem sie durch einen solchen Puls behandelt worden waren. In beiden Jahreszeiten zeigten die Vögel eine Abweichung ihrer jeweiligen Zugrichtung von 90° nach Osten (W. Wiltschko et al. 1994, 1998). Die Vögel brauchten circa 10 Tage, um wieder in ihrer vorher angestrebten Zugrichtung zu fliegen. Dies wurde als Hinweis auf einen auf SPM-Magnetit basierten Magnetrezeptor interpretiert, da SD durch den starken Puls dauerhaft ummagnetisiert sein würde.²⁰ Einen deutlichen Hinweis auf die Funktion dieses Rezeptors brachten dann Versuche, bei denen junge Vögel nach einem solchen Puls keinerlei Richtungsveränderung zeigten. Die getesteten juvenilen Brillenvögel hielten ihre angeborene Zugrichtung auch nach der Behandlung noch ein, wo hingegen die adulten die 90°-Abweichung zeigten (Munro et al. 1997). Es ist bekannt, dass junge Vögel gegenüber adulten Vögeln noch keine zentralnervöse Repräsentation einer Karte besitzen, sie fliegen (ziehen) nach ihrem angeborenen Zugprogramm in einer angeborenen Kompassrichtung (Berthold 1988). Da dies nicht gestört wurde, konnte man aus diesen Versuchen schließen, dass zum einen der Magnetkompass nicht beeinträchtigt ist und deshalb auch keinem magnetit-basierten Mechanismus unterliegt. Zum anderen konnte indirekt abgeleitet werden, dass die Karte vom Puls gestört wird und so die Karte auf Informationen eines magnetit-basierten Systems zurückgreift (Munro et al. 1997).²¹ Den gleichen Schluss lassen Versuche

²⁰ In weiterführenden Versuchen wurden die Vögel mit einem Puls behandelt, der zu einem stärkeren Feld parallel oder anti-parallel ausgerichtet war. Sie zeigten axiale Tendenzen in Ost-West-Richtung, unabhängig von der Richtung des Pulses zum Magnetfeld. Die Autoren schlossen daraus, dass es einen auf magnetit-basierten Magnetrezeptor gibt, bei dem es sich aber nicht um feste Ketten von Single-Domain-Magnetit handeln kann (W. Wiltschko et al. 2002a). Mit Pulsen behandelte Reisstärklinge (*Dolichonyx oryzivorus*) zeigten im Verhaltensexperiment allerdings unterschiedliche Richtungen, je nachdem welche Richtung der Puls zum Erdmagnetfeld einnahm; das zeigt, dass der Rezeptor nach der Behandlung andere Informationen lieferte (Beason et al. 1995). Mittlerweile konnten diese Versuche auch im Freiland bestätigt werden (Holland 2010).

²¹ Dies wurde auch in Versuchen bestätigt, bei denen die Vertikalkomponente der gepulsten Vögel gedreht wurde und der Kompass normal mitdreht (W. Wiltschko et al. 2007b).

zu, in denen adulte australische Brillenvögel eine Verfrachtung durch Veränderung ihrer Zugrichtung kompensieren, junge hingegen nicht (Deutschlander et al. 2012). Mittlerweile konnten diese Versuche auch im Freiland bestätigt werden. So zeigten gepulste adulte Rotkehlchen eine größere Abweichung von der Zugrichtung als mit Pulsen behandelte juvenile Vögel oder unbehandelte Kontrolltiere (Holland & Helm 2013).

In Dressurversuchen mit Tauben (Mora et al. 2004, Thalau et al. 2007), Hühnern (Denzau et al. 2011) und Enten (Freire et al. 2012) konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch diese Vogelarten wahrscheinlich über einen Rezeptor verfügen, der die Intensität des Magnetfeldes messen kann. Die Tiere wurden über einer Magnetspule gefüttert, die eine magnetische Anomalie erzeugt; sie konnten diese künstliche Anomalie im Versuch später wiederfinden. Die Anomalie verändert lokal sowohl die Intensität wie auch die Richtung des Magnetfeldes. Zurzeit wird vermutet, dass die Tiere sich hierbei an der veränderten Intensität orientieren. Bei Hühnern konnte Denzau et al. (2011) darüber hinaus zeigen, dass sie die Aufgabe, die Anomalie wiederzufinden, bereits als zehntägige Küken lösen können.

3.1.4 Betäubung der Schnabelhaut

Hinweise auf die Lokalisation dieses Magnetrezeptors ergaben Versuche an australischen Brillenvögeln, die wiederum durch einen Puls behandelt wurden. Hier wurde allerdings zusätzlich in einem zweiten Schritt der Oberschnabel von innen mit einem Lokalanästhetikum betäubt. Diese Vögel zeigten, dass die Drehung ihrer Flugrichtung, die durch den Puls entsteht, durch die Betäubung des Oberschnabels aufgehoben wird. Der eisenmineral-basierte Magnetrezeptor ist also im Oberschnabel lokalisiert (W. Wiltschko et al. 2009).²² Freilandversuche mit Tauben zeigten erstmals Hinweise auf die Bedeutung der Magnetrezeptoren im Schnabel unter natürlichen Bedingungen. In diesen Versuchen wurden verschiedene Gruppen von Tauben in einer magnetischen Anomalie nahe Frankfurt – im Vogelsberg – aufgelassen, andere an Kontrollorten außerhalb der Anomalie. Einem Teil der Tauben wurde vorab der Oberschnabel betäubt, den Kontrolltauben nicht. Anschließend wurden Verschwindezeit (die Zeit, in der der Vogel vom Auflassort noch zu sehen ist, etwa 2,5 km) und Abflugrichtung (die Richtung, in die die Taube zum Zeitpunkt des Verschwindens fliegt) der Tauben mit Betäubung und ohne an den jeweiligen Versuchsorten

²² Weitere Hinweise ergeben auch die in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Fixrichtungen. Zur Erinnerung: diese treten auf, wenn durch monochromatische Lichter bestimmter Intensitäten der Kompass gestört wird. Da sie aber mit der Drehung der magnetischen Nord-Richtung mitdrehen, kann geschlossen werden, dass sie trotzdem vom Magnetfeld abhängen. Die daraus resultierenden Richtungen der Vögel ergeben keinen biologisch erkennbaren Sinn, allerdings konnte durch Betäubung des Oberschnabels nachgewiesen werden, dass diese Richtungen vom Schnabel abhängen (R. Wiltschko et al. 2010b). Auch dies zeigt, dass im Schnabel ein Magnetrezeptor lokalisiert ist.

verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Tauben ohne Betäubung innerhalb der Anomalie lange Verschwindezeiten und gestreute Verschwinderichtung haben, hingegen die Tauben mit Betäubung nicht. Außerhalb der Anomalie gab es keine Unterschiede der beiden Gruppen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Tauben, bei denen die Magnetrezeptoren im Schnabel ihre Information über die Nerven weiterleiten konnten, durch die unregelmäßigen magnetischen Bedingungen in der Anomalie gestört wurden. Hingegen nehmen die Tauben, bei denen die Haut und somit die Nerven (evtl. auch die Rezeptoren selbst) des Oberschnabels betäubt waren, die Anomalie nicht wahr. Es ist davon auszugehen, dass Tauben Intensitätsunterschiede auch in der magnetischen Anomalie, die sie mit dem Schnabel registrieren, als Information in der Gradientenkarte verwenden (R. Wiltschko et al. 2010a).²³

3.1.5 Der mittlere Ast des ophthalmischen Nervs

Bereits vor Wiltschkos Versuchen unter natürlichen Bedingungen (R. Wiltschko et al. 2010a) haben mehrere Studien im Labor einen Zusammenhang des ophthalmischen Nervs (Ramus ophthalmicus medialis) mit der Wahrnehmung von magnetischen Reizen feststellen können. Die ophthalmischen Äste des trigeminalen Systems innervieren den Schnabel (Abb. 3.1). In Pulsversuchen mit Reisstärklingen (*Dolichonyx oryzivorus*) konnte gezeigt werden, dass diese nach einem starken magnetischen Puls ihre Richtungsbevorzugung änderten. Wurde ihnen allerdings der ophthalmische Nerv mit einem Lokalanästhetikum betäubt, zeigten sie diese Abweichung nicht mehr (Beason & Semm 1996). Mora et al. (2004) machten einen verhaltensbiologischen Versuch, bei dem Tauben, wie oben schon beschrieben, mit Futter auf eine künstliche magnetische Anomalie trainiert wurden. Einer Gruppe wurde der Oberschnabel betäubt, einer anderen Gruppe der ophthalmische Nerv durchtrennt. In beiden Fällen reagieren die Vögel nicht mehr auf die Anomalie, was zu dem Schluss führt, dass der ophthalmische Nerv die Information der Magnetrezeptoren im Schnabel weiterleitet.

Einen neurobiologischen Ansatz in Form von elektrophysiologischen Ableitungen wählten Beason & Semm (1987), die beim Reisstärkling zeigen konnten, dass neben dem optischen System (Tectum opticum) auch der ophthalmische Nerv auf Änderungen der Vertikal- und Horizontalkomponente des Magnetfeldes reagiert. Aus diesen Versuchen konnten sie

²³ Ähnliche Versuche wurden mit GPS-Geräten auf dem Rücken der Tauben durchgeführt, die den gesamten Weg aufzeichnen, den der Vogel fliegt. Diese Versuche zeigen, dass die Tauben am Anfang wie auch in der vorherigen Studie innerhalb der Anomalie eine hohe Streuung aufweisen, nach ca. 5 Kilometern aber alle signifikant in Heimrichtung orientiert sind, obwohl dieser Bereich noch weit innerhalb der Anomalie liegt. Dies lässt darauf schließen, dass die Tauben wahrnehmen, dass die magnetischen Bedingungen irreführend sind, sie dann ignorieren und andere Faktoren nutzen (Schiffner et al. 2011).

Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel: **Einleitung**

schließen, dass Vögel zwei unterschiedliche Magnetrezeptoren besitzen, von denen die einen im Schnabel liegen (Beason & Semm 1987). In weiterführenden Versuchen wurde dann nur die Intensität des Magnetfeldes verändert, woraufhin 14% der Neuronen des trigeminalen Ganglions und des ophthalmischen Nervs ihre Spontanaktivität veränderten (Semm & Beason 1990).

Mit einem anderen neurobiologischen Ansatz, nämlich mit dem Nachweis von ZENK, konnten bei Rotkehlchen Zentren im Gehirn ermittelt werden, die auf Magnetfeldänderungen reagieren. ZENK gilt als Marker für neuronale Aktivität. Neuronen aus Gehirnarealen des trigeminalen Gehirnsystems waren aktiviert, wenn das Magnetfeld alle 30 Sekunden über

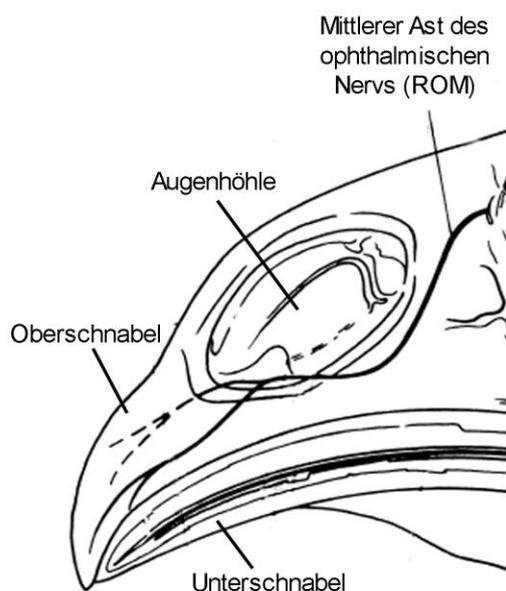


Abb. 3.1 Schema eines Hühnerkopfes mit dem Verlauf des mittleren Astes des ophthalmischen Nervs (ROM, Ramus ophthalmicus medialis), eines der drei Trigemini-nerven. Der ROM hat seine Endigung im Oberschnabel und versorgt diesen mit sensorischen Dendriten verschiedener Sinnesmodalitäten (aus Dubbeldam 1998).

einen Zeitraum von 3 Stunden verändert wurde. Wurde der ophthalmische Nerv des trigeminalen Systems vor den Versuchen durchtrennt, wurde kein erhöhter ZENK-Level in den angesprochenen Arealen gefunden (Heyers et al. 2010).

3.1.6 Problemstellung

In diversen verhaltensbiologischen und neurobiologischen Studien wurde die Existenz eines eisenmineral-basierten Magnetrezeptors im Oberschnabel von verschiedenen Vogelarten nachgewiesen (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Fleissner et al. (2003, 2007a) beschrieben bei Tauben eine als Magnetrezeptor geeignete eisenhaltige Struktur in Dendriten der Nerven. Falkenberg et al. (2010) konnten zeigen, dass auch Hühner

Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel: **Einleitung**

eisenhaltige Strukturen im Oberschnabel besitzen, die in ihrer Eisenzusammensetzung denen der Tauben entsprechen.

Ich habe in diesem Teil meiner Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

- Haben Hühner eisenhaltige Strukturen im Oberschnabel, die histologische Kriterien von Dendriten erfüllen und sich als Magnetrezeptoren (wie von Falkenberg et al. 2010 beschrieben) eignen würden?
 - Haben die eisenhaltigen Strukturen im Oberschnabel der Hühner einen Zellkern wie rote und weiße Blutkörperchen der Vögel?
 - Oder liegen diese eisenhaltigen Strukturen in den kernfreien Dendriten der Nerven, kolokalisieren also mit Neurofilamenten?
- Sind die ultrastrukturellen Details mit denen der eisenhaltigen Dendriten der Tauben identisch?
- Gibt es Felder von eisenhaltigen Strukturen? Und sind die einzelnen eisenhaltigen Strukturen innerhalb der Felder bei Hühnern wie bei Tauben zufällig oder regelmäßig zueinander angeordnet? Entsprechen sie in der Lokalisation und Ausrichtung denen der Tauben?

In Dressurversuchen können Hühner ab dem 10. Tag das Magnetfeld zur Orientierung nutzen. In diesen Versuchen wird den Hühnerküken eine sogenannte Ortsaufgabe gestellt. Man geht davon aus, dass sie diese (da es sich nicht um eine Richtungsdressur handelt) mit den Magnetrezeptoren im Schnabel lösen können (Denzau et al. 2011). Aus dieser Studie resultieren die folgenden histologischen Fragestellungen für meine Arbeit bezüglich der Entwicklung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Hühner:

- Ab welchem Alter werden eisenhaltige Dendriten im Schnabel als mögliche Magnetrezeptoren bei Hühnern ausgebildet?
- Gibt es Hinweise auf die Bildung der subzellulären eisenhaltigen Strukturen, und können daraus Details der Biomineralisation abgeleitet werden?
- Entspricht die Zusammensetzung der Eisenoxide der eisenhaltigen Dendriten bei Küken denen der adulten Hühner?

3.2 Material und Methode

Die verwendeten Materialien, wie Chemikalien, primäre und sekundäre Antikörper und auch die verwendeten Proben, sind im Anhang Tab. A 1.7 und A 1.8 aufgeführt. Systematik und Lebensweise von Hühnern werden im Anhang A 1.2.2 beschrieben.

3.2.1 Schnabel-Präparation und -Fixierung

Für diese Studie wurden insgesamt 24 Hühner (7 adulte und 17 juvenile) untersucht. Die adulten Hühner waren zwischen 9 Monaten und 2,5 Jahre alt und stammten aus einem landwirtschaftlichen Betrieb. Die juvenilen Hühnerküken wurden im Alter von 1 Tag bis 30 Tage abgetötet und fixiert. Diese Tiere sind im Zoologischen Institut der Goethe-Universität ausgebrütet und gehalten worden.²⁴ Ein Teil der adulten Hühner stammt frisch abgetötet aus einer landwirtschaftlichen Schlachtung, alle anderen Tiere wurden mit einer Überdosis Narcoren abgetötet. In welche Teilstudie die Tiere eingingen und wie die Proben fixiert und eingebettet wurden, kann aus Tab. 3.1 entnommen werden.

Für die Perfundierung wurde der Blutkreislauf des Tieres zuerst mit Heparin (10000 IE auf 500 ml) in Phosphatpuffer (Phosphat buffer saline, PBS) und daraufhin mit 4% Paraformaldehyd in PBS gespült. Sowohl die perfusionsfixierten Schnäbel als auch alle anderen wurden für die Lichtmikroskopie in 4% Paraformaldehyd in PBS für 4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert, anschließend mehrfach in PBS gewaschen und bei 4°C aufbewahrt. Die Fixierung für die Elektronenmikroskopie erfolgte in 4% Glutardialdehyd in PBS für 4 Stunden bei RT. Auch diese Proben wurden hinterher in PBS gespült.

Nach der Fixierung folgt die Präparation, bei der die Haut der Schnäbel mechanisch vom Horn gelöst wird. Hierfür wurde nur eisenfreies Präparationsbesteck verwendet. Die verbliebene Schnabelhaut wurde in Paraffin, in Kunstharz (Araldit) oder in Kunststoff (Technovit 7100) eingebettet (siehe Tab. 3.1). Sowohl von den in Paraffin als auch den in Kunststoff eingebetteten Proben wurden 10-12 µm dicke Schnitte angefertigt und einzeln auf Super-Frost-Plus-Objektträger aufgebracht. Für die Röntgenstrahl-Messungen wurden die Proben ebenfalls in 10-12 µm dicke Schnitte geschnitten, von denen aber nur jeder zweite für die Berliner-Blau-Färbung auf Objektträger aufgebracht wurde. Der jeweils dazwischenliegende Schnitt wurde zur Lagerung auf trockenes Filterpapier gelegt und später zur Topologie im Gewebe und Messung der Eisenmenge (μ -XRF) und -zusammensetzung (μ -XANES) verwendet (s. u.).

²⁴ Die Haltung der Hühner wurde unter V54-19c-20/15-S104/51 vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt

Tab. 3.1 Verwendete Proben, Fixierung und Einbettung

Proben Nr.	Alter des Tieres	Fixierung	Einbettung	Methoden ²⁵
GG AS 1	1 ½ Jahre	Perf. 4% PFA	Paraffin	LM, µ-XRF, µ-XANES
GG AS 2	9 Monate	Perf. 4% PFA	Technovit 7100	LM, µ-XRF
GG AS 3	1 ½ Jahre	Imm. 4% PFA	Technovit 7100	LM
GG AS 4	1 ½ Jahre	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM, Immun
GG AS 5	1 ½ Jahre	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG AS 6	1 ½ Jahre	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG AS 7	1 ½ Jahre	Imm. 4% Glutaraldehyd	Araldit	LM, TEM
GG OS 1	1 Tag	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 2	1 Tag	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 3	1 Tag	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 4	5 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 5	5 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 6	5 Tage	Imm. 4% Glutaraldehyd	Araldit	LM, TEM
GG OS 7	5 Tage	Perf. 4% PFA	Paraffin	LM, µ-XRF, µ-XANES
GG OS 8	5 Tage	Perf. 4% PFA	Paraffin	LM, µ-XRF, µ-XANES
GG OS 9	10 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 10	12 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 11	12 Tage	Perf. 4% PFA	Paraffin	LM, µ-XRF, µ-XANES
GG OS 12	15 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 13	21 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 14	21 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 15	21 Tage	Perf. 4% PFA	Paraffin	LM, µ-XRF, µ-XANES
GG OS 16	29 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM
GG OS 17	30 Tage	Imm. 4% PFA	Paraffin	LM

GG = *Gallus gallus*, A = Adult, O= Ontogenie/Entwicklung, S = Schnabel Perf. = Perfusionsfixierung, Imm. = Immersionsfixierung, PFA = Paraformaldehyd, LM = Lichtmikroskopie, TEM = Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, Immun = Immunhistologische Markierung von Neurofilament, µ-XRF (X-ray fluorescence analysis µ-XANES (microscopic X-ray absorption near-edge structure).

3.2.2 Berliner Blau und Lichtmikroskopie

Um Eisen nachzuweisen (Berliner-Blau-Färbung), müssen die in Paraffin eingebetteten Proben durch Xylol und Alkohole vom Einbettmittel befreit werden. Bei Kunststoff und Kunstharz entfallen diese Schritte. Für die Berliner-Blau-Reaktion werden die Proben in 5%-igem Kaliumhexacyanoferrat II (KCF II; Morphisto, Frankfurt) vorbehandelt. Anschließend werden sie für 2 x 30 Minuten bei 40°C, Kunststoffproben bei 60°C in KCF II und 5%-ige Salzsäure (HCl, Morphisto, Frankfurt) im Verhältnis 1:1 gegeben. Darauf folgend werden die Proben in Aqua Bidest gewaschen, getrocknet und eingedeckt. Als Gegenfärbung eignet sich Kernechtrot. Hierfür werden die Proben vor dem Eindecken für 30 sec in 0,1%-ige Kernechtrot-Lösung (Morphisto, Frankfurt) gegeben und anschließend in Aqua Bidest gewaschen.

²⁵ Alle Hühner wurden unabhängig von der Fixierung oder Einbettung für die Lokalisation der Felder, für den Verlauf der Dendriten und für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Strukturdetails verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit einem Reichert-Polyvar-Mikroskop (Reichert, Österreich). Für die Auswertung der Lage der eisenhaltigen Strukturen bei adulten Hühnern wurden nur Berliner-Blau markierte Strukturen gewertet,

- die länglich sind und einen intrazellulären Vesikel haben, ein Teil, der von der Färbung ausgespart bleibt;
- die in einem Feld lagen, das heißt, Strukturen, die in einem Abstand von 40-60 µm zueinander vorkommen;
- und die in mehreren Schnitten hintereinander auftauchen.

Für die Auswertung der eisenhaltigen Strukturen der juvenilen Hühner wurden zusätzlich bei jeweils 2 Schnäbeln der Stadien 5. Tag, 12. Tag und 21. Tag in allen Schnitten alle eisenhaltigen Strukturen dokumentiert.

3.2.3 Immunhistologie

Für die immunhistologische Markierung wurden hier nur Proben verwendet, die vorher in Paraffin eingebettet waren. Hierfür wurde zunächst nur jeder zweite Schnitt mit der oben beschriebenen Berliner-Blau-Reaktion behandelt und ausgewertet. In Bereichen, in denen eisenhaltige längliche Strukturen vorkommen, wurden die dazwischenliegenden Schnitte dann sowohl gemäß dem immunhistologischen Protokoll als auch anschließend mit der Berliner-Blau-Reaktion behandelt.

Für das immunhistologische Protokoll muss das Einbettmaterial bei den verwendeten Schnitten durch Xylol und unterschiedlich konzentrierte Alkohole herausgelöst werden. Die Proben wurden anschließend präinkubiert:

1. 15 min in 0,03% H₂O₂ und nach dem Waschen in PBS,
2. für 1 h in 8% Normal-Horse-Serum (NHS) in 0.25% Triton X-100 und 2% Bovine-Serum-Albumin (BSA) in PBS.

Der primäre Antikörper (s. u.) inkubierte über Nacht in einer Konzentration von 1:200 (in 3% NHS, 0.25% Triton X-100, 2% BSA, in PBS). Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Anti-Mouse-IgG (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA, in 3% NHS, 0.25% Triton X-100, 2% BSA, in PBS) für 1 h eingesetzt. Zur Visualisierung wurde ein auf Peroxidase basierendes enzymatisches System (Vectastain Elite ABC Kit; Vector) eingesetzt, das mit 0.025% Diaminobenzidin als Substrat für 5 Minuten umgesetzt wurde.

- Primärer Antikörper: Antiserum aus *Mouse* gegen Neurofilament MAB 1621 (gegen die letzten 84 Aminosäuren des Ratten-Neurofilaments-M (145K); Millipore GmbH, Deutschland). Charakterisiert in Fleissner et al. (2003).

3.2.4 Elektronenmikroskopie

Von der in Araldit eingebetteten Schnabelhaut wurden mit einer Polycut-Ultrafräse (Reichert-Jung, Depew, NY, USA) Schnitte einer Dicke von 5 μm angefertigt und auf Objektträger (im Wechsel beschichtete Super-Frost-Plus-Objektträger und unbeschichtete Star-Frost-Objektträger) gebracht. Die Schnitte auf den Super-Frost-Plus-Objektträgern wurden anschließend mit Berliner-Blau (Rezept wie Kunststoffschnitte, siehe oben) gefärbt und am Reichert-Polyvar-Mikroskop ausgewertet. In Bereichen mit eisenhaltigen länglichen Strukturen, wie oben beschrieben, konnten die ungefärbten Zwischenschnitte mit Araldit umgebettet und in Ultradünnschnitte einer Dicke von 50-60 nm geschnitten werden. Diese wurden dann in einem Transmissions-Elektronenmikroskop (CM12, Philips, Hamburg) ausgewertet und den in der Lichtmikroskopie identifizierten Stellen zugeordnet. Sehr dunkle Teile sind vermutlich Eisen. Nach der ersten Dokumentation wurden manche Schnitte noch mit Uranylacetat kontrastiert und erneut dokumentiert.

Auf die Verwendung von Cacodylatpuffer und Osmiumtetroxid wurde hier verzichtet, da bereits Fleissner et al. (2003) gezeigt haben, dass die Analyse der gesuchten Strukturen wegen des Schwermetallgehalts dieser Lösungen nicht mehr möglich ist, da diese sich dadurch vermutlich auflösen.

3.2.5 Röntgenstrahlungsmessungen (μ -XRF und μ -XANES)

Für die Röntgenstrahlanalysen wurden parallel Test- und Kontrollschnitte hergestellt. Die Kontrollschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, mit Berliner-Blau gefärbt und wie oben beschrieben im Lichtmikroskop ausgewertet. Anschließend wurden die dazwischenliegenden Schnitte, die auf Filterpapier zwischengelagert waren und in deren Nachbarschnitten eisenhaltige Strukturen identifiziert werden konnten, auf Ultralenfolie (SPEX Certiprep Inc.) aufgebracht. An diesen Testschnitten wiederum wurden bei DESY, dem Deutschen Elektronen-Synchrotron (Hamburg), an Beamline L in HASYLAB die entsprechenden Bereiche analysiert. Um die genaue Lokalisation und Menge des Eisens in den ausgewählten Schnitten zu bestimmen, wurde als Erstes eine μ -XRF-(X-ray fluorescence analysis)-Kartierung erstellt. μ -XRF ermöglicht eine hochauflösende Lagebestimmung der in der Probe enthaltenen Elemente und deren quantitative Analyse. In meiner Arbeit zeige ich nur μ -XRF-Daten von Eisen. Die Angabe der Eisenmenge erfolgt hier in AU (arbitrary units,

willkürliche Einheit). Die Eisenmenge in den verschiedenen Proben ist durch Umrechnung der verwendeten Referenzstandards miteinander vergleichbar. Die Messzeit pro Punkt betrug 0,5 sec. Die Messungen erfolgten unter der Leitung von Dr. Gerald Falkenberg (Hasylab am DESY, Hamburg). Genauere Angaben über die verwendeten Parameter wie Kapillare und Energie sind in Falkenberg et al. (2010) veröffentlicht.

An den Stellen mit der größten Eisenanreicherung kann man mit μ -XANES (microscopic X-ray absorption near-edge structure) die Eisenverbindungen bestimmen. Bei diesem Messverfahren wird die Energie des Röntgenstrahls, der auf die Probe trifft, immer weiter erhöht. Reicht die Energie für das jeweilige Element aus, werden dabei Elektronen aus der Probe gelöst, und die Röntgenabsorption der Probe steigt an. Diese Elektronen werden von einem separaten Detektor aufgefangen. Aus der so entstehenden Kurve (Energie zu Absorption) kann auf den Oxidationszustand und die Verbindung mit anderen Elementen geschlossen werden (Wilke et al. 2001). Die Details der für die Hühnerschnäbel angewendeten μ -XANES-Messungen entsprechen denen in Falkenberg et al. (2010) beschriebenen. Für die Auswertung wurden die Messungen von mehreren Schnitten der beiden 5 Tage alten Hühner, die von mehreren Schnitten des 12 Tage alten Huhns und auch die von mehreren Schnitten eines adulten Huhns zusammengefasst.

Die μ -XANES-Messung allein gibt nur Aufschluss über die Zusammensetzung der Eisenoxide, wenn sie mit verschiedenen Referenzmaterialien verglichen wird. In meiner Arbeit ist hier als Beispiel die Kurve der Röntgenabsorption von Magnetitpulver gezeigt (Abb. 3.21 rote Linie). Die Zusammensetzung der Eisenoxide der eisenhaltigen Magnetrezeptoren wurde bereits von Falkenberg et al. (2010) ausführlich diskutiert. In meiner Arbeit werden dazu die eisenhaltigen Strukturen der juvenilen Hühner und die eisenhaltigen Magnetosomen der Magnetbakterien (*M. gryphiswaldense*) in Bezug gesetzt. Für die μ -XANES-Messung der Magnetosomen wurde eine Suspension (10⁹ Zellen/ml) von *M. gryphiswaldense* mit ein paar Tropfen Formaldehyd fixiert und anschließend durch Zentrifugation konzentriert. Die Messung selbst erfolgte in einer Glaskapillare.

3.3 Feinstrukturelle und immunhistologische Studie zur Lokalisation und Charakterisierung eisenhaltiger Strukturen in Dendriten im Oberschnabel von adulten Hühnern

3.3.1 Ergebnisse

Im Oberschnabel kommen – wie in allen Organsystemen – Eiseneinlagerungen in Zellen unterschiedlicher Gewebe vor, wie z. B. rote oder weiße Blutkörperchen, die mit Berliner-Blau sichtbar gemacht werden können. Zum Auffinden möglicher Rezeptorstrukturen für die Magnetfeldwahrnehmung habe ich mich speziell auf die Identifizierung von Eisen in nervösen Strukturen konzentriert.

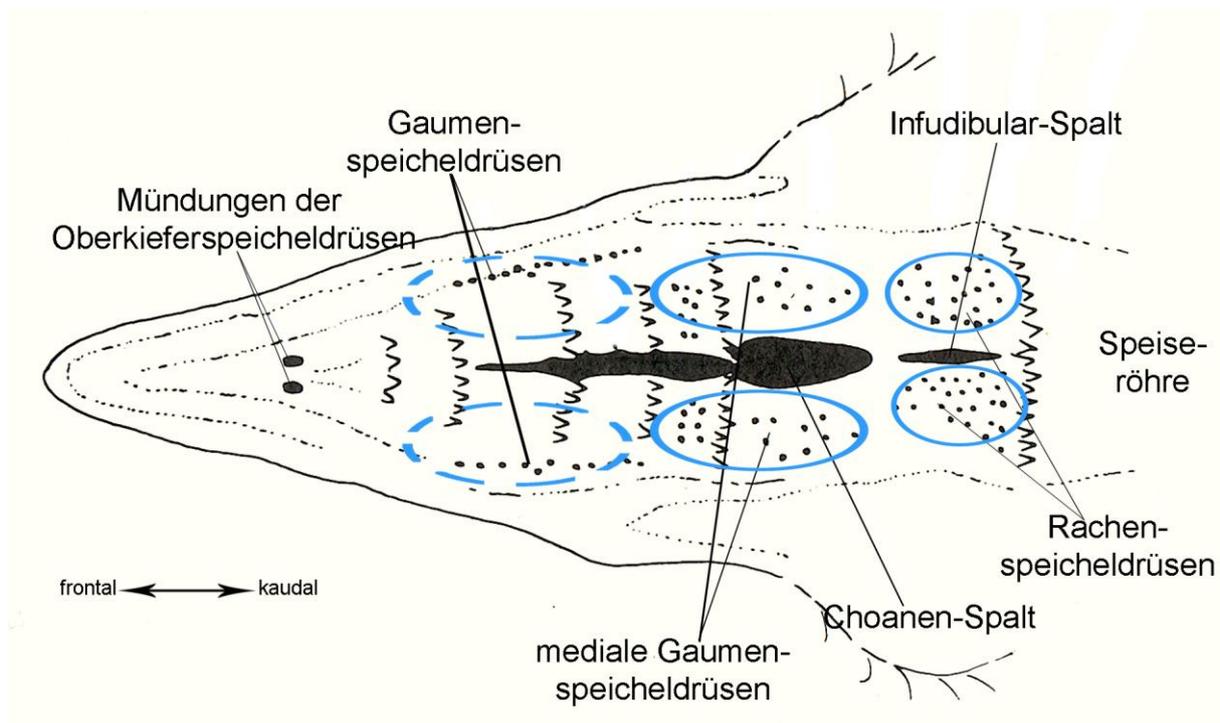


Abb. 3.2 Bereiche, in denen die eisenhaltigen Strukturen im Oberschnabel von adulten Hühnern zu finden sind. Schema der Horizontalansicht der Schnabelhaut des Oberschnabels eines adulten Huhns. Der gesamte Oberschnabel ist bei Hühnern circa 2,5 cm lang. In Blau sind die Regionen gekennzeichnet, in denen sich die eisenhaltigen Strukturen bei adulten Hühnern befinden. Es ist zu beachten, dass in einem Bereich mehr als nur ein Feld vorkommen kann und so Hühner mehr als nur sechs Felder haben. Die Ausrichtung der Felder ist nicht erkennbar festgelegt. Im frontalen Bereich habe ich mehr Felder in dorso-ventraler Ausrichtung identifiziert als in anderen Bereichen (Schnabelanatomie verändert nach King & McLelland 1978).

3.3.1.1 Lage und Verteilung der eisenhaltigen Strukturen

Adulte Hühner haben sechs Regionen in der Oberschnabelhaut, in denen eisenhaltige Strukturen vorkommen, die der Morphologie der eisenhaltigen Dendriten der Tauben entsprechen (Abb. 3.2). Von diesen eisenhaltigen Strukturen liegen immer mehrere in Gruppen hinter- und nebeneinander, in Längsrichtung aber immer in einem bestimmten Abstand (20-50 μm) zueinander (Abb. 3.3 A). Dies wird bei Tauben als Feld bezeichnet und soll auch hier so bezeichnet werden.

Die Regionen, in denen sich die Felder dieser eisenhaltigen Strukturen befinden, sind (Abb. 3.2):

1. im kaudalen Bereich des Schnabels, zwischen den Rachen-Speicheldrüsen,
2. im Bereich der medialen Gaumenspeicheldrüsen, die sich neben dem Choanen-Spalt befinden, und
3. im mittleren bis frontalen Bereich des Schnabels.

Die Schnabelspitze ist meist frei von eisenhaltigen Strukturen dieser bestimmten Morphologie (siehe unten). Innerhalb einer der sechs Regionen können mehrere Felder hintereinander oder auch in verschiedener Tiefe in der Schnabelhaut liegen, allerdings nur innerhalb der Subkutis. Demzufolge haben adulte Hühner mehr, meistens deutlich mehr, als nur sechs Felder. Die Anzahl der Felder und die genaue Lage sind aber individuell verschieden. Auch die Abgrenzung der Felder zueinander ist nicht immer klar erkennbar. Das Feld im Bereich der Rachenspeicheldrüsen scheint allerdings in seiner Lokalisierung eine höhere Konstanz zu haben, da es bei mehreren Schnäbeln an derselben Stelle vorkommt und dieses Feld auch bei 21 Tage alten Hühnern bereits angelegt ist (siehe auch Abschnitt 3.4.1.1 und Abb. 3.18). Oftmals liegen die Felder dieser eisenhaltigen Strukturen entlang von Drüsen oder Blutgefäßen oder auch entlang anderer Nervenstränge innerhalb des Gewebes, z. B. neben Bindegewebssträngen. Die einzelnen Felder sind nicht automatisch auf bestimmte Gewebeteile beschränkt, ein einziges Feld kann sich beispielsweise an Drüsen und an einem Blutgefäß befinden oder an einem Blutgefäß und anschließenden Versteifungselementen. Dies wurde besonders im Bereich neben der Gaumenspalte beobachtet.

Diese eisenhaltigen Strukturen sind länglich und haben dadurch immer eine individuelle Ausrichtung. In der Regel liegen sie innerhalb eines Feldes parallel zueinander (Abb. 3.3 A). Insgesamt findet man in allen Feldern zusammengenommen eine Repräsentation aller Raumrichtungen, aber anders als bei Tauben beschrieben, sind die Hauptrichtungen der eisenhaltigen Strukturen in den entsprechenden Feldern bei den unterschiedlichen Tieren

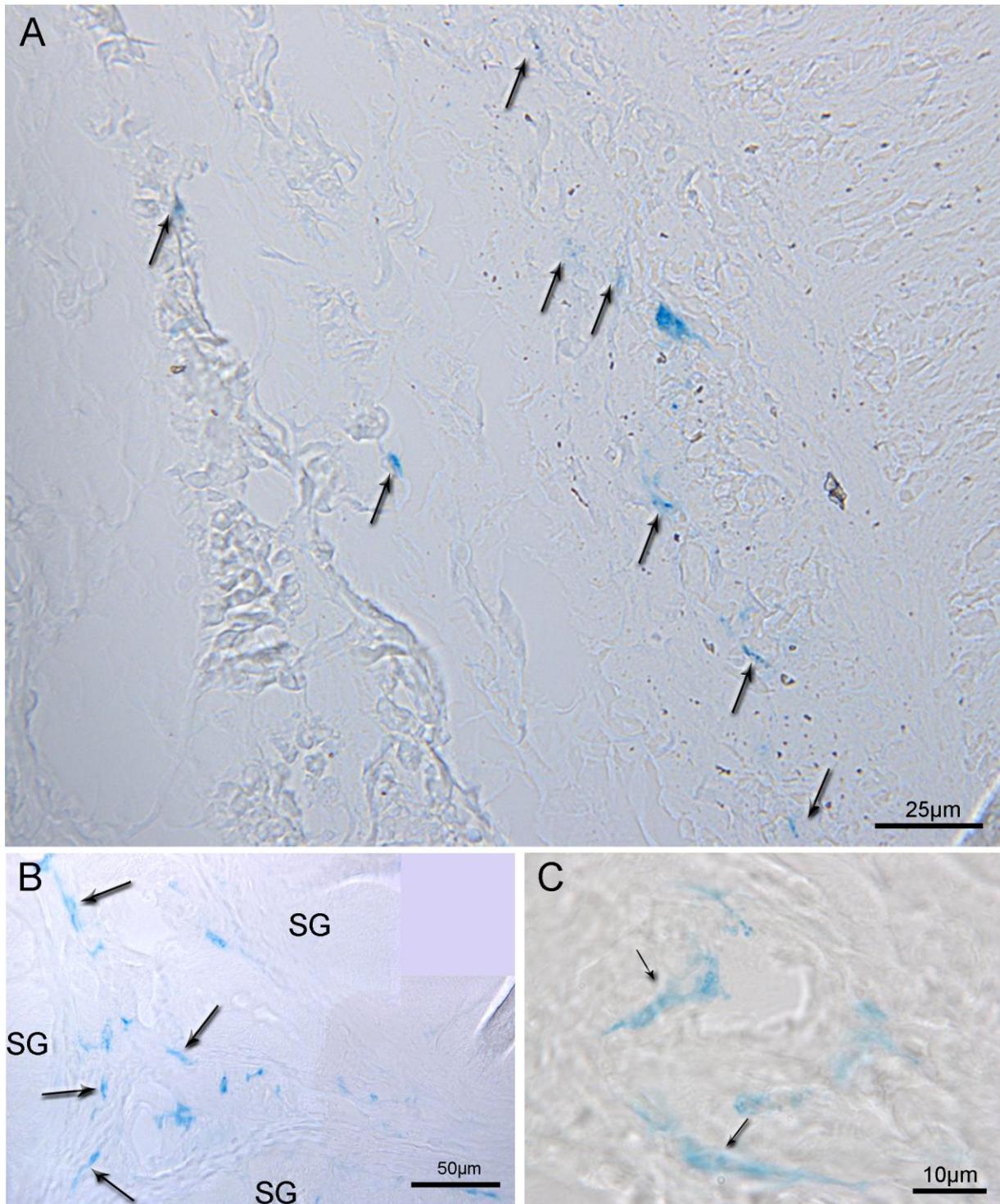


Abb. 3.3 Anordnung der eisenhaltigen Strukturen innerhalb eines Feldes im Oberschnabel von adulten Hühnern. (A-C) Mikroskopische Aufnahmen (mit unterschiedlichen Maßstäben) von Paraffin (A) und Kunststoffschnitten (B, C), in denen mit Berliner-Blau Eisenpartikel sichtbar gemacht wurden. (A) ein Feld eisenhaltiger länglicher Strukturen (mit Pfeilen gekennzeichnet), die in einem bestimmten Abstand (circa 40 µm) zueinander und in einer Raumrichtung liegen. Die Abweichung der Richtung kommt durch die Komprimierung des Gewebes während der Fixierung, Einbettung und vor allem des Schneidens zustande. (B) Mehrere eisenhaltige längliche Strukturen zwischen drei Speicheldrüsen, die in einem Dreieck ausgerichtet sind. (C) Ein kleinerer Bereich (hier ist der Maßstab zu beachten), in dem ein Blutgefäß quer durchschnitten wurde und die länglichen eisenhaltigen Strukturen ebenfalls in unterschiedlichen Richtungen ausgerichtet sind. SG – Speicheldrüse.

individuell angeordnet. In der Regel liegt die Feldrichtung im Bereich der frontalen Gaumensspeicheldrüsen des Schnabels häufiger in dorso-ventraler Ausrichtung als in den anderen beiden Bereichen, es kommen aber auch dort Felder in fronto-kaudaler Ausrichtung vor. Insgesamt sind alle drei Raumrichtungen (dorso-ventral, fronto-kaudal und medio-lateral) in den Achsen der Felder repräsentiert. Es gibt aber auch Felder, in denen diese bestimmten eisenhaltigen Strukturen nicht in einer Achse, sondern in verschiedenen Raumrichtungen ausgerichtet sind. Dies ist vermehrt im Bereich von Speicheldrüsen (Abb. 3.3 B) und auch im Bereich von kleineren quer angeschnittenen Blutgefäßen (Abb. 3.3 C) der Fall. Hier bilden die Raumrichtungen der einzelnen eisenhaltigen Strukturen sogar Dreiecke.

Ich konnte Hinweise darauf finden, dass ältere Hühner (1 ½ Jahre) noch mehr eisenhaltige Strukturen pro Feld und auch mehr Felder haben als Hühner, die unter einem Jahr alt sind. Insgesamt sind in Schnäbeln, die in Kunststoff (Technovit) eingebettet sind, mehr Felder dieser eisenhaltigen Strukturen und auch mehr dieser Strukturen innerhalb des Feldes zu erkennen als in Schnäbeln, die in Paraffin eingebettet sind.

3.3.1.2 Lichtmikroskopischer Aufbau der eisenhaltigen Strukturen

Der lichtmikroskopische Aufbau dieser eisenhaltigen Strukturen der adulten Hühner ist

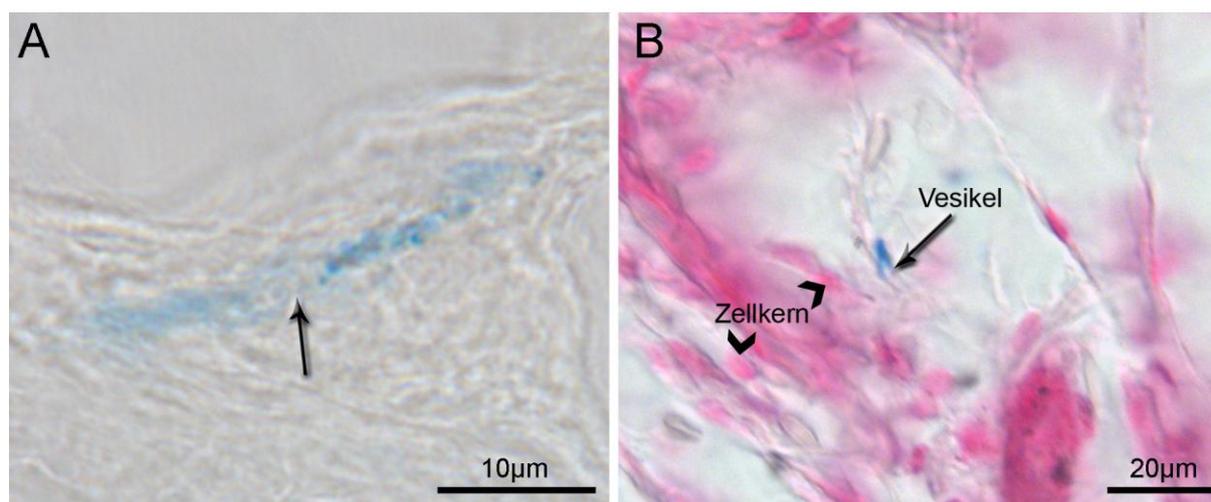


Abb. 3.4 Lichtmikroskopischer Aufbau der eisenhaltigen länglichen Strukturen im Hühnerschnabel. (A) Kunststoffschnitt mit Berliner-Blau-Färbung. Als Strukturmerkmal enthalten sie in der Mitte einen Teil, der kein Eisen enthält (mit Pfeil gekennzeichnet), zu erkennen an der fehlenden Berliner-Blau-Reaktion. Rechts neben diesem Bereich sind die Kügelchen (Cluster) des Reaktionsproduktes zu sehen. Die gesamte Struktur ist circa 30 µm lang. (B) Paraffinschnitt mit Berliner-Blau-Färbung und Kernechtrot. Eisenreaktion und Vesikel sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der Vesikel bleibt durch die Färbung ausgespart. Die eisenhaltige Struktur ist kleiner, da nur ein Teil davon in der Schnittebene liegt. In Magenta sind Zellkerne der Zellen zu sehen – ebenfalls im Bild beispielhaft markiert. Zu erkennen ist deutlich, dass der Vesikel kein Zellkern ist.

Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel: **Ergebnisse der adulten Hühner**

länglich, circa 20-30 μm lang, und enthält in der Mitte einen Bereich, der von der Berliner-Blau-Reaktion ausgespart bleibt, den Vesikel (in Abb. 3.4 mit Pfeilen gekennzeichnet). Insgesamt konnten bei den in Paraffin eingebetteten Schnäbeln Kügelchen des Reaktionsproduktes des Eisennachweises identifiziert werden. Bei den in Kunststoff eingebetteten Schnäbeln sind diese Cluster schlechter zu sehen, sind aber auch vorhanden (Abb. 3.4 A rechts vom Vesikel). In der Gegenfärbung mit Kernechtrot ist zu erkennen, dass der Vesikel kein Zellkern ist (Abb. 3.4 B).

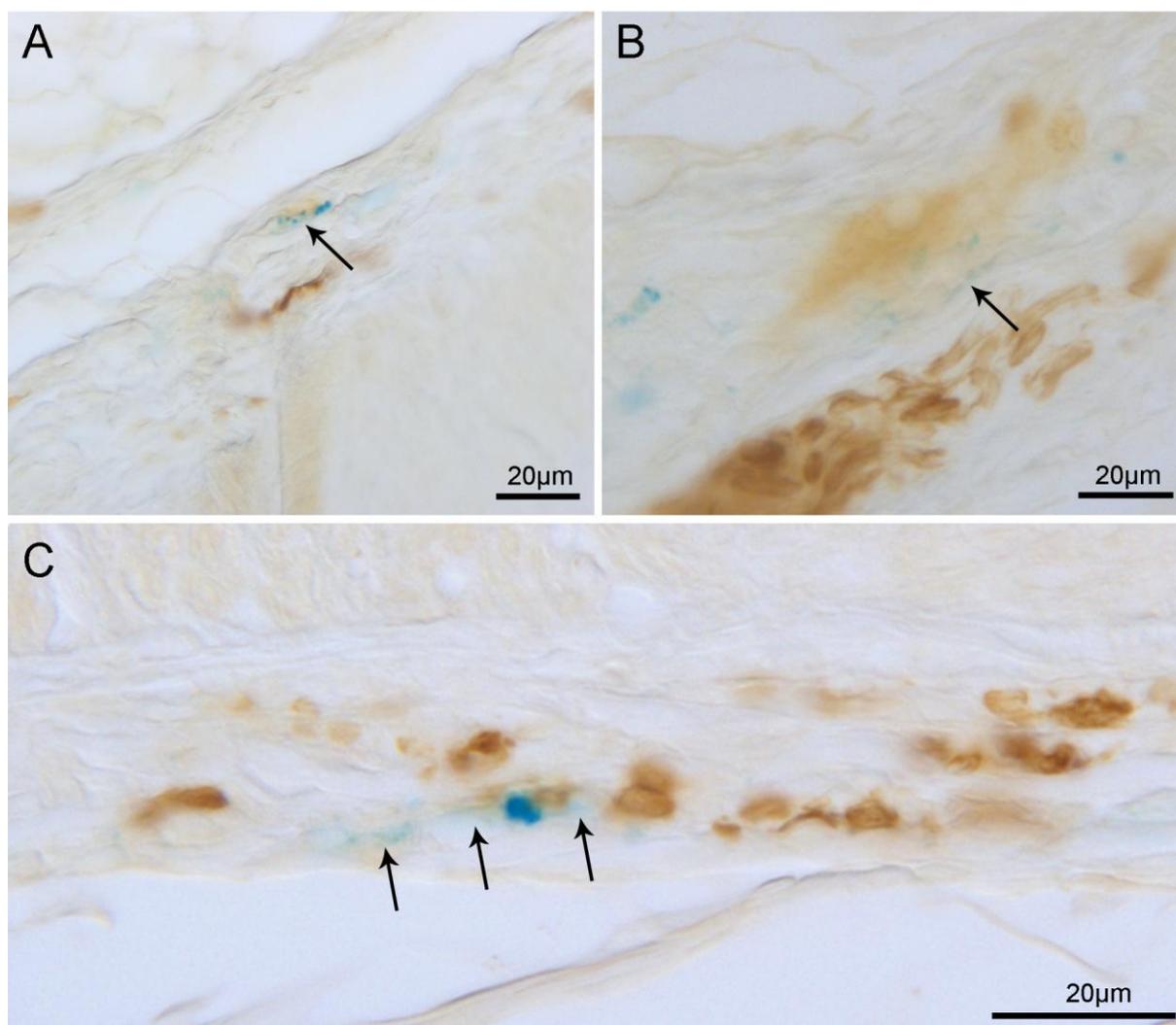


Abb. 3.5 Immunhistologische Markierung der Nervenfasern und Berliner-Blau-Reaktion des Eisennachweises in der Haut des Oberschnabels eines adulten Huhns. Das Reaktionsprodukt der immunhistologischen Markierung (Diaminobenzidin als Substrat) ist braun, blau ist der Eisennachweis in einem Paraffinschnitt zu erkennen. (A) und (B) sind zwei aufeinanderfolgende Stellen auf einer Seite eines großen Blutgefäßes. (C) liegt in gleicher Ausrichtung (wurde nur für die Abbildung gedreht) auf der anderen Seite dieses Gefäßes. Der dunkle blaue Fleck in der Mitte des Bildes ist vermutlich ein Artefakt. Die Immunreaktion ist zum Teil schwächer, wenn dort auch eine Berliner-Blau-Reaktion vorliegt. Beide Färbungen kolokalisieren (durch Pfeile beispielhaft gekennzeichnet), das bedeutet, die eisenhaltigen länglichen Strukturen liegen in oder an Nerven.

Die Kontrolle zur Spezifität der immunhistologischen Markierung des Neurofilaments war negativ und ist im Anhang (Abb. A 3.1) dargestellt. Die immunhistologische Markierung zeigt, dass diese länglichen eisenhaltigen Strukturen bestimmter Morphologie in Nervengewebe liegen (Abb. 3.5). Das hier gezeigte Bild stammt aus dem Bereich der Choanen-Spalte neben den medialen Gaumenspeicheldrüsen. Die eisenhaltigen Strukturen liegen hier entlang einem Blutgefäß (Abb. 3.5). Die Berliner-Blau-Reaktion und der immunhistologische Nachweis des Neurofilaments kolokalisieren allerdings auch in anderen Bereichen. Die eisenhaltigen Strukturen liegen in gleicher Richtung wie die markierten Nervenstränge. Die Markierung der Nervenstränge ist allerdings meist schwächer, wenn auch eine Berliner-Blau-Reaktion vorliegt (Abb. 3.5 A, B). Vermutlich behindern die beiden Reaktionsprodukte sich gegenseitig. Ob sich das Eisen innerhalb des Nervs oder direkt daran befindet, ist mit dieser Methode nicht zu erkennen und ebenso nicht, ob es sich um afferente oder efferente Fasern handelt.

3.3.1.3 Ultrastruktur der eisenhaltigen Strukturen in Dendriten

Die elektronenoptischen Aufnahmen in Abb. 3.6 - 3.9 stammen aus einem Feld von eisenhaltigen Strukturen in Nerven aus dem mittleren Bereich des Schnabels. Dieses wurde in einem Parallelschnitt vorab lichtmikroskopisch mit der Berliner-Blau-Reaktion identifiziert. Der Vergleich der Strukturen der beiden Parallelschnitte (lichtmikroskopisch und elektronenoptisch) ist in Abb. 3.6 dargestellt.

Stellen aus Material mit hoher Elektronendichte bestehen vermutlich aus Eisen (Abb. 3.7 - 3.9). Die hier identifizierte Struktur besteht aus drei verschiedenen Teilstrukturen:

- Eine circa 2 μm breite und 5 μm lange Struktur, die von einzelnen, länglichen 'Schuppen' bedeckt ist (Abb. 3.7 und 3.8). Sie wird im Folgenden wie bei Tauben (Fleissner et al. 2007a) als Vesikel bezeichnet.
- Mehrere längliche Strukturen aus einem optisch einheitlichen Material, die an der einen Seite glatt abgegrenzt sind und an der anderen Seite nicht (Abb. 3.7 und 3.9 A, C). Diese Teile sind circa 1 μm lang und 50 nm breit und werden als Plättchen bezeichnet.
- Die dritte Struktur sind wenige runde Teile, Kugeln, aus fast einheitlichem Material mit ungefähr 1 μm Durchmesser (Abb. 3.7 und 3.9 B, C).

Die Nachkontrastierung zeigt, dass vermutlich alle Teile, aber sicherlich die Kugeln und der Vesikel von einer Matrix umgeben sind (Abb. 3.8 C und 3.9 C). Es lässt sich auch eine Verbindung zwischen den Plättchen und den Kugeln erahnen, die aus Filamenten oder Fasern bestehen könnte (Abb. 3.9 C).

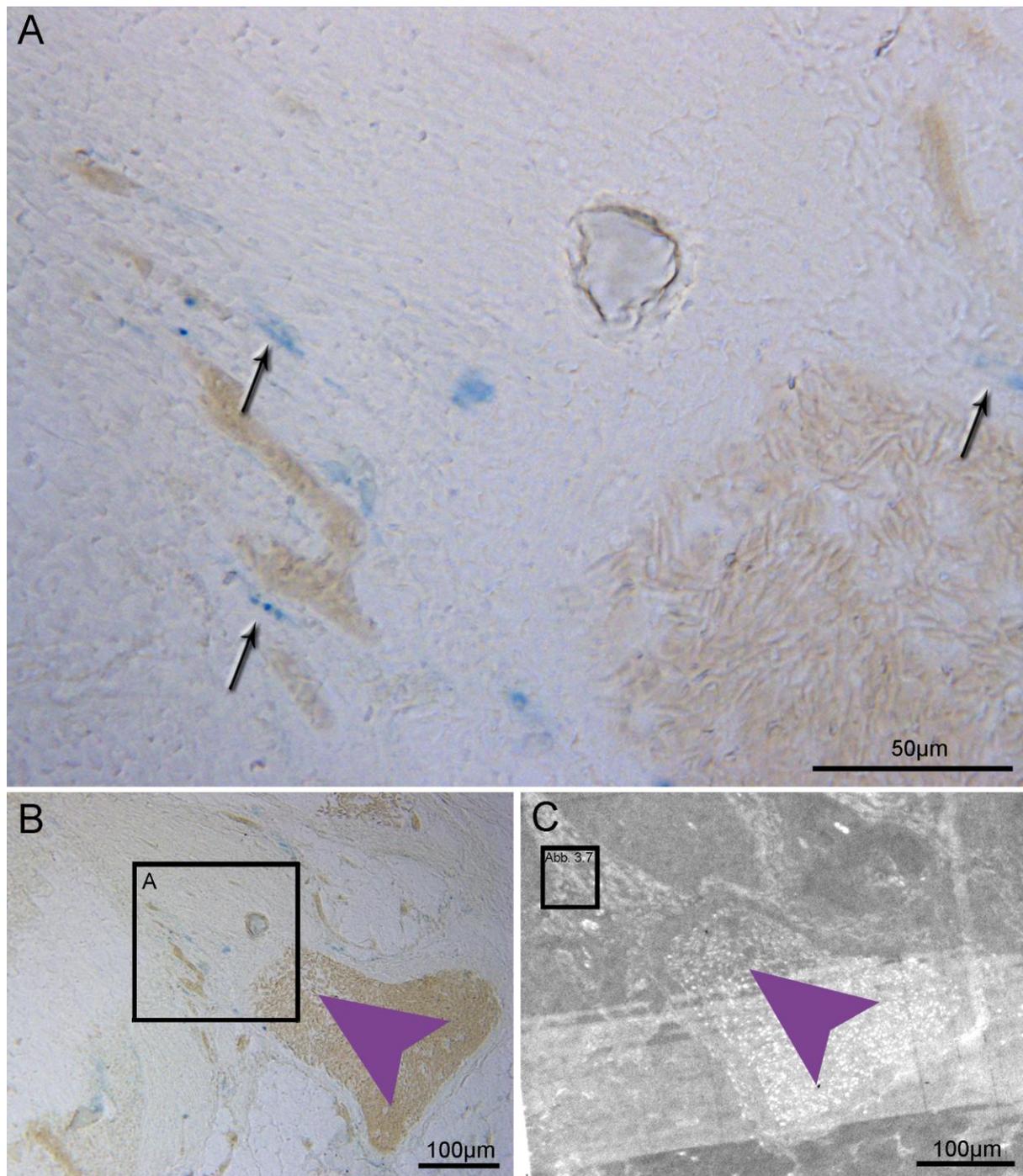


Abb. 3.6 Korrelation zwischen der lichtmikroskopischen Berliner-Blau-Reaktion in einem Semidünnschnitt im Vergleich zu einem parallelen ungefärbten Ultradünnschnitt aus derselben Region. (A) Ausschnitt eines Feldes von länglichen eisenhaltigen Strukturen, durch Berliner-Blau sichtbar gemacht. (B) zeigt dieselbe Stelle in niedrigerer Vergrößerung. Der Ausschnitt von (A) ist markiert. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme der gleichen Stelle des Ultradünnschnittes. In dem Rahmen markiert ist die Stelle, an der eisenhaltige Teilstrukturen gefunden wurden (siehe Abb. 3.7, 3.8 und 3.9). Der helle Streifen, der sich von links nach rechts über das Bild zieht, rührt von der unterschiedlichen Dicke des Aralditschnittes her, die vom Schneiden bedingt wird. In (B) und (C) ist ein Blutgefäß durch einen lila Pfeil zur besseren Orientierung im Bild gekennzeichnet.

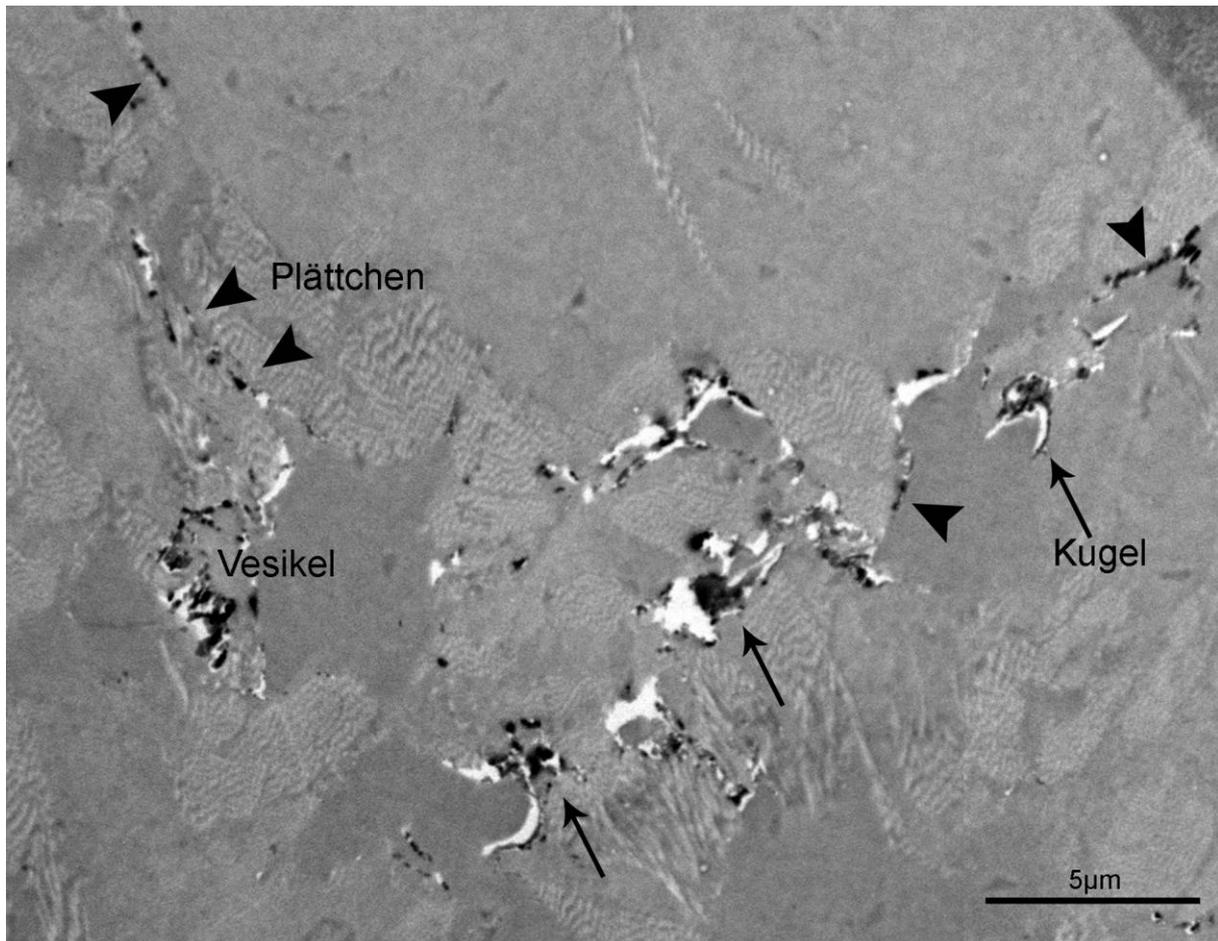


Abb. 3.7 Übersicht über die subzelluläre Struktur der eisenhaltigen Dendriten der Hühner. Gekennzeichnet sind der Vesikel, mit schmalen Pfeilen die Kugeln und mit breiten Dreieckspfeilen die Plättchen. Die Kugeln liegen in dieser Ebene der Struktur in einem Abstand von circa 5 µm zueinander. Die Plättchen liegen in deutlich dichtem Abstand und sind zahlreicher. Einige Strukturen sind durch den mechanischen Druck beim Schneiden zusammengeschoben worden.

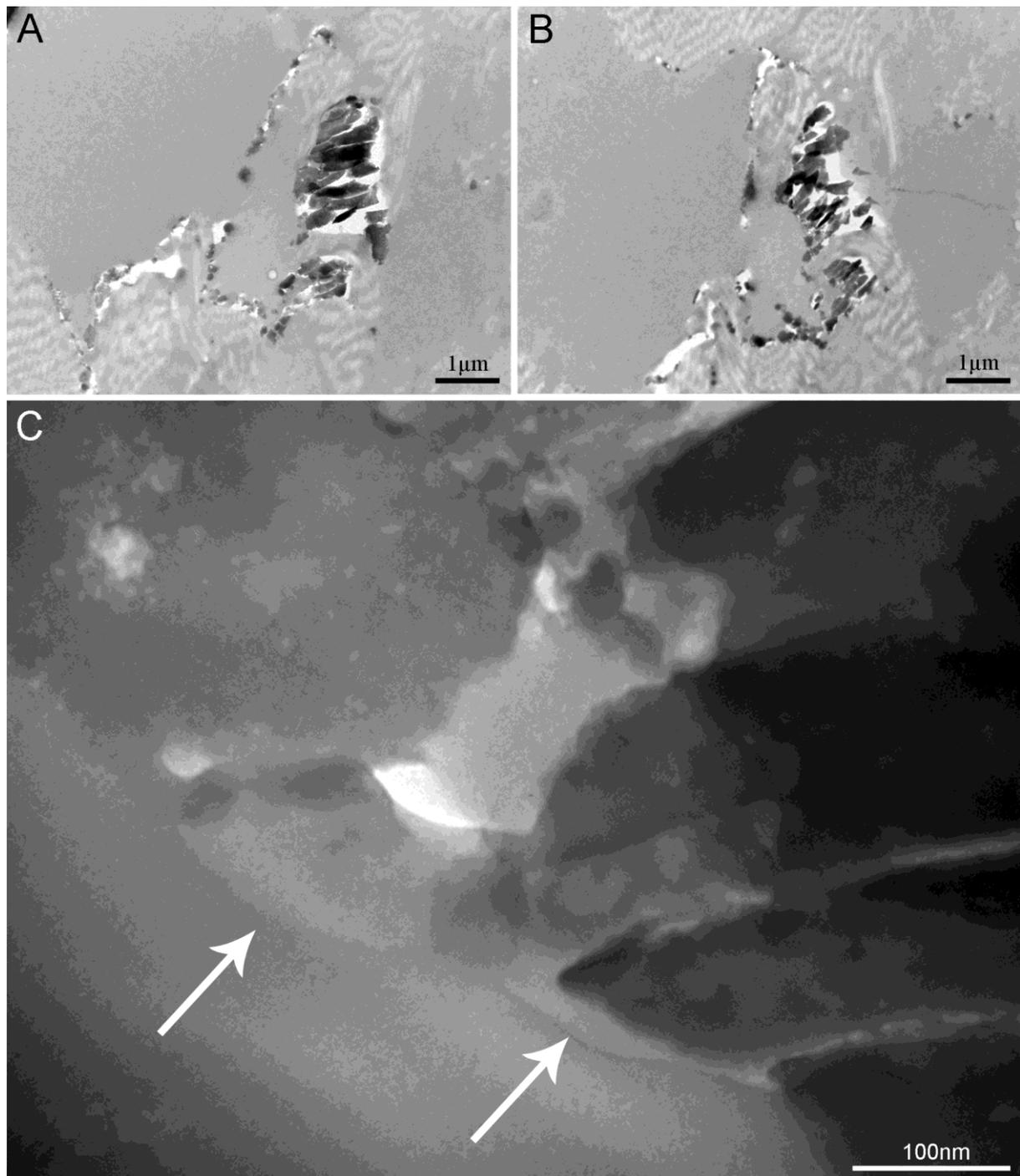


Abb. 3.8 Vesikel der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner im Elektronenmikroskop im Detail. (A) und (B) Vesikel, dessen Hülle aus 'Schuppen' von Eisen besteht, in zwei unkontrastierten Parallelschnitten. An den unterschiedlichen Ebenen ist zu erkennen, dass der Vesikel innen nicht aus Eisen besteht. Die gesamte Struktur ist circa 5 μm lang und 2-3 μm breit. (C) Kontrastierter Schnitt derselben Stelle. Durch die Kontrastierung wird eine umgebende Matrix sichtbar (mit Pfeilen gekennzeichnet).

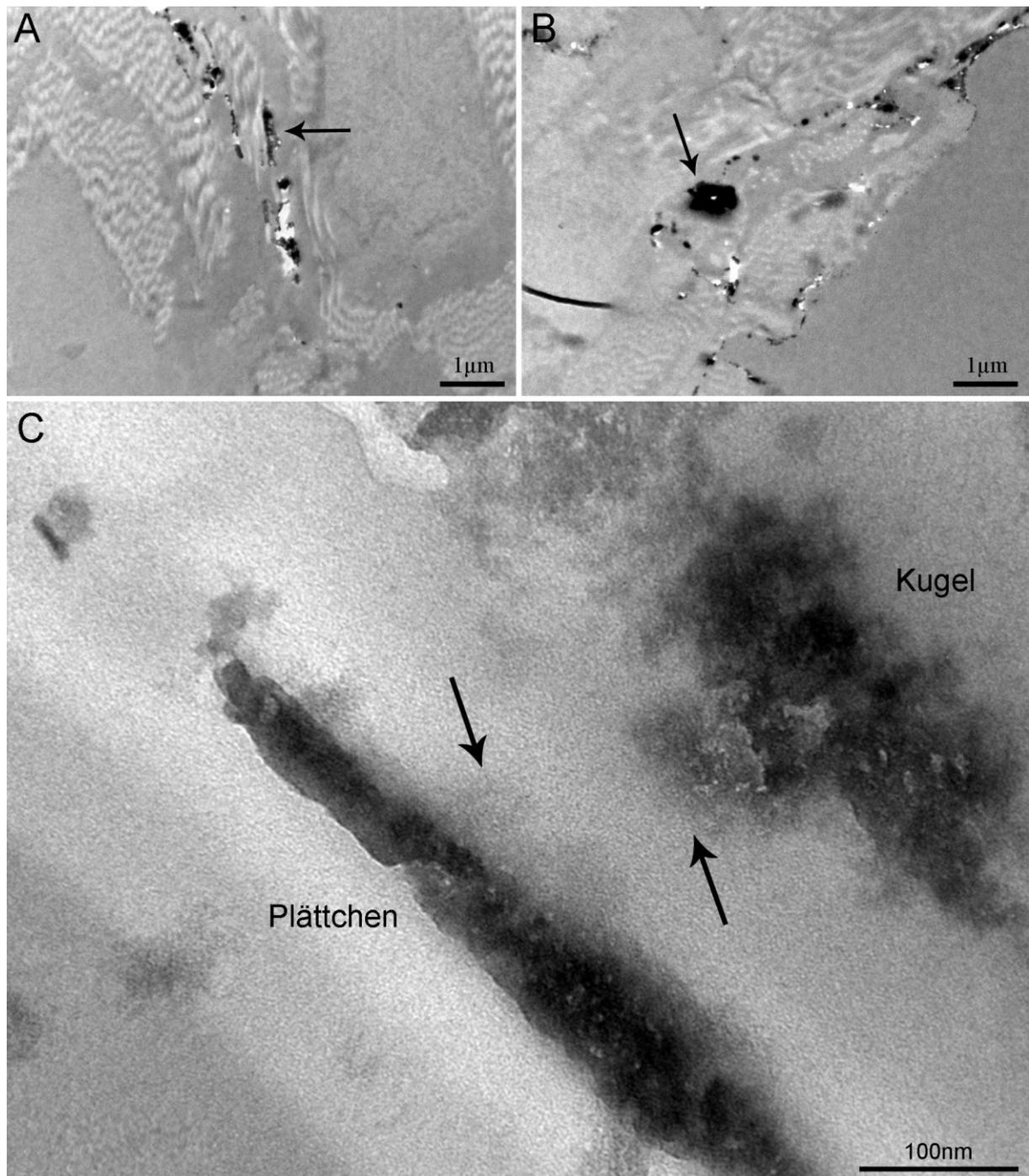


Abb. 3.9 Plättchen und Kugeln der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner im Elektronenmikroskop im Detail. (A) Mehrere hintereinander und nebeneinander aufgereihete Plättchen, die circa 1 µm lang sind. (B) Eine Kugel, die kompakt aus Eisen besteht. Sie ist etwas kleiner als 1 µm, der Durchmesser variiert aber mit der Schnittebene und ist hier nicht maximal. (C) Kontrastierter Schnitt. Links ist ein Plättchen, das dicht bei einer Kugel (rechts) liegt. Das Plättchen ist auf einer Seite glatt. Auf der der Kugel zugewandten Seite lässt sich durch die Kontrastierung schleierartig eine Verbindung zwischen den beiden Teilen erahnen (mit Pfeilen gekennzeichnet).

3.3.2 Diskussion

Adulte Hühner haben sechs Regionen in der Subkutis im Schnabel, in denen allerdings insgesamt mehr als sechs Felder von eisenhaltigen Strukturen liegen, die der Morphologie der eisenhaltigen Dendriten der Tauben entsprechen. Diese Strukturen haben keinen Zellkern und kolokalisieren mit Nervenfasern. Lichtmikroskopisch sind sie länglich und haben in der Mitte einen Vesikel, der in der Färbung ausgespart bleibt. Durch die Kernechtrot, Färbung wird klar, dass der Vesikel kein Zellkern ist. In der elektronenmikroskopischen Analyse konnten drei verschiedene Teilstrukturen identifiziert werden:

1. der durch 'Schuppen' besetzte Vesikel (2-5 μm),
2. Kugeln (1 μm)
3. und längliche Plättchen (1 μm lang und ca. 50-100 nm breit).

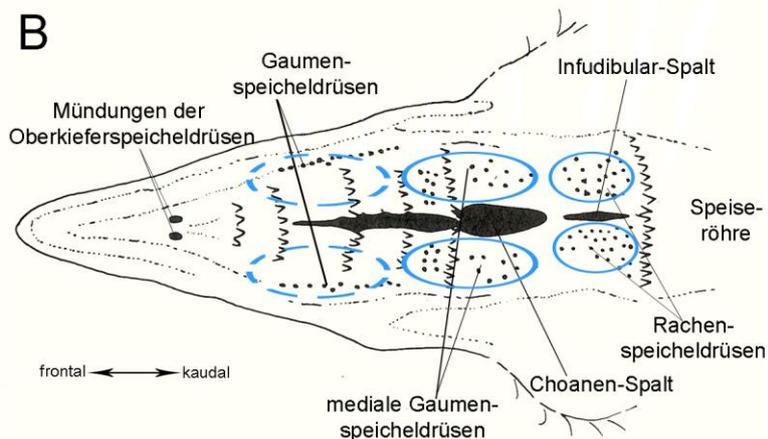
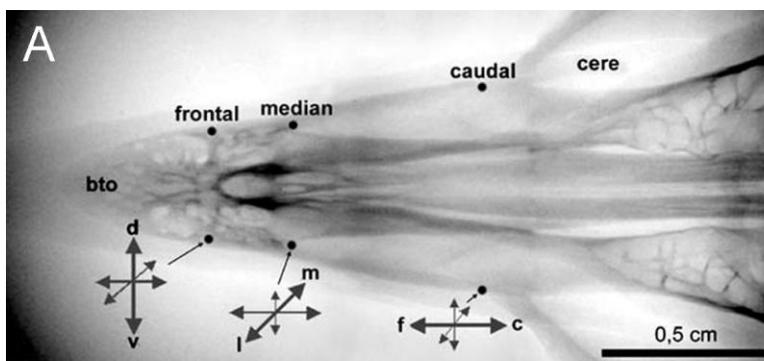


Abb. 3.10 Vergleich der Lokalisation und Ausrichtung der eisenhaltigen Dendriten bei Tauben und bei Hühnern. (A) Röntgenbild des Oberschnabels einer Taube. Die Punkte zeigen die Stellen an denen die 6 Felder lokalisiert sind, die Pfeile markieren die Ausrichtungen der einzelnen Felder. c – caudal, d – dorsal, f – frontal, l – lateral, m – median, r – rostral, v – ventral (aus Fleissner et al. 2007a). (B) Schema der Schnabelhaut des Oberschnabels eines Huhns aus Abb. 3.2. Die blauen Bereiche sind die Regionen, in der sich die eisenhaltigen Strukturen bei Hühnern befinden. Es kommt in einem Bereich mehr als nur ein Feld vor, so dass Hühner mehr als nur sechs Felder haben. Die Ausrichtung der Felder ist nicht erkennbar festgelegt. (Schnabelanatomie verändert nach King & McLelland 1978).

3.3.2.1 Vergleich der eisenhaltigen Dendriten von Hühnern mit denen von Tauben

Bei Tauben sind die eisenhaltigen Dendriten in 6 Feldern angeordnet. Alle Felder sind lateral im Oberschnabel lokalisiert und liegen innerhalb der Subkutis. Sie sind von Fettzellen umgeben (Holtkamp-Rötzler 1999). Zwei dieser eisenhaltigen Dendriten-Felder befinden sich nahe der Schnabelspitze, zwei vor den Drüsen des Schnabels, und zwei liegen dazwischen. In den jeweils bilateral angeordneten Feldern sind die einzelnen Dendriten gleich, in den 3 Felderpaaren aber in unterschiedlichen Richtungen ausgerichtet (Abb. 3.10). Innerhalb eines Feldes laufen die Einzeldendriten weitgehend parallel (Fleissner et al. 2003, 2007a). Der Aufbau der einzelnen eisenhaltigen Dendriten der Tauben konnte lichtmikroskopisch so wie in einer elektronenmikroskopischen Studie wie folgt beschrieben werden: Die eisenhaltigen Teile dieser Dendriten bestehen aus einem Vesikel von 3-5 μm , 10-15 Kugeln („bullets“), die an die Zellmembran gebunden sind, und mehreren Plättchen („platelets“), die 1 μm breit und lang sind und nur 0,1 μm dick (Abb. 3.11). In ihrer Elementzusammensetzung bestehen die Dendriten insgesamt aus 10% Magnetit und 90% Maghemit; auf Grund von biophysikalischen Messungen wird vermutet, dass der Vesikel und die Plättchen aus Maghemit und nur die Kugeln aus Magnetit bestehen. Die Kugeln sind mit der Zellmembran und durch bestimmte Fasern mit den Plättchen verbunden (Fleissner et al. 2003, 2007a).

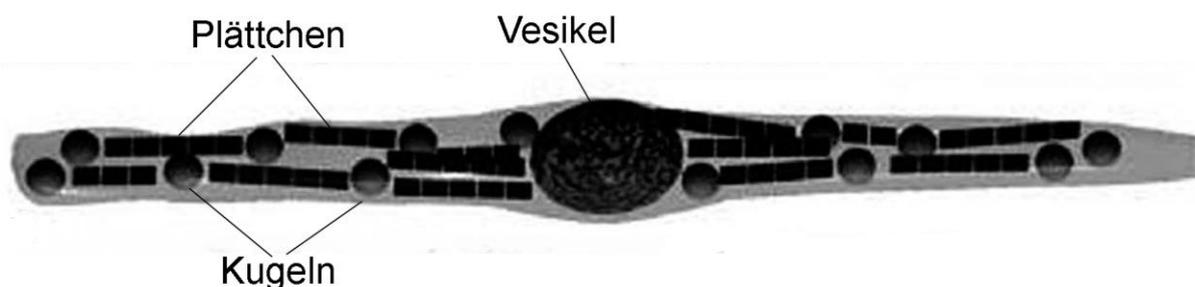


Abb. 3.11 Schematisches Modell des Aufbaus eines eisenhaltigen Dendriten. In der Mitte ist der circa 3-5 μm große Vesikel zu sehen. Daneben liegen die Plättchen (1 μm x 0,1 μm) und die mit ihnen verbundenen Kugeln (1 μm Durchmesser). Die Plättchen bestehen vermutlich aus Maghemit, die Kugeln aus Magnetit. Fleissner et al. (2007a) gehen davon aus, dass die Plättchen insgesamt magnetisiert werden, wenn sie parallel zum Magnetfeldvektor ausgerichtet sind. Sie übertragen dann die Kraft auf die Kugeln, die ihrerseits deformieren. Durch diese Deformation werden durch Fasern Ionenkanäle in der Zellmembran geöffnet, und ein Rezeptorpotential entsteht (Falkenberg et al. 2010).

Der Vergleich des Aufbaus der einzelnen eisenhaltigen Dendriten von Hühnern und Tauben zeigt sowohl lichtmikroskopisch wie auch elektronenmikroskopisch eindeutig, dass sich diese entsprechen. Beide haben den Vesikel, die Plättchen und die Kugeln, die sich in Größe und

Aufbau gleichen (Abb. 3.12). Dies lässt darauf schließen, dass der subzelluläre Aufbau dieser Strukturen relevant für deren Funktion ist, da er innerhalb der Evolution nicht abgewandelt wurde (siehe auch 3.3.2.2). Auch die Zusammensetzung der Eisenoxide dieser Strukturen ist bei Tauben und Hühnern identisch (Falkenberg et al. 2010). Bei beiden Vogelarten liegen die eisenhaltigen Dendriten in der Subkutis der Schnabelhaut. Vermutlich ist diese Lokalisierung für die Funktion der Rezeptoren ebenfalls relevant, da auch sie nicht

Eisenhaltige Dendriten der Tauben

Eisenhaltige Dendriten der Hühner

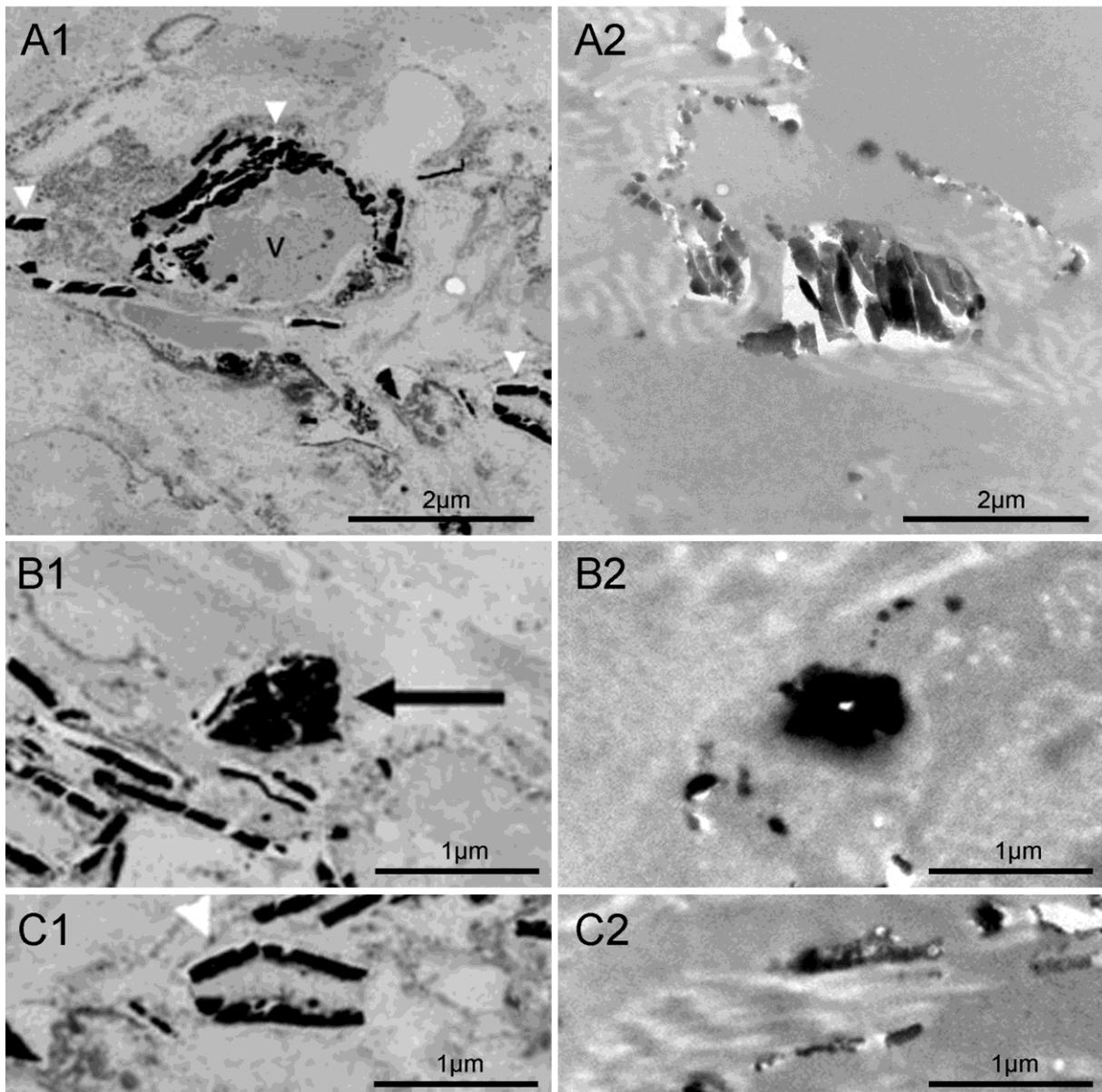


Abb. 3.12 Vergleich der Ultrastruktur der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Tauben mit denen der Hühner. Die linke Spalte (mit 1 gekennzeichnet) zeigt die ultrastrukturellen Details der eisenhaltigen Dendriten der Tauben (Teilabbildungen ausgeschnitten aus Fleissner et al. 2003), die rechte Spalte (mit 2 gekennzeichnet) die der Hühner. Ultrastruktur (A) des Vesikels, (B) der Kugeln und (C) der Plättchen. Die Details der Strukturen entsprechen einander, und auch die Größenverhältnisse stimmen überein.

durch die verschiedene evolutionäre Entwicklung verändert wurde. Die Subkutis liegt in einer Tiefe von circa zwei Dritteln der gesamten Oberschnabelhaut. Bei Tauben wurde das Vorkommen der eisenhaltigen Magnetrezeptoren in der Subkutis, der Schnabelhaut, als Schutz vor mechanischer Reizung der Rezeptoren diskutiert (Fleissner et al. 2003). Das halte ich für durchaus plausibel. Bei Tauben wurden die eisenhaltigen Strukturen in Dendriten des Nervus ophthalmicus beschrieben. Bei Hühnern kann ich bestätigen, dass es sich um eisenhaltige Strukturen in oder an Nervensträngen handelt.²⁶ Da es sich bei Hühnern meiner Ansicht nach um die gleichen Strukturen handelt wie bei Tauben, gehe ich davon aus, dass es sich auch bei Hühnern um Dendriten des ophthalmischen Asts der trigeminalen Nerven handelt, in denen sich die eisenhaltigen Strukturen befinden. Die Kolokalisation dieser eisenhaltigen Strukturen mit den Nerven bzw. Dendriten legt nahe, dass es sich hierbei bei Hühnern wie bei Tauben um sensible Nervenenden handelt, die als Rezeptoren geeignet wären. Dass es sich bei diesen Strukturen um Magnetrezeptoren handelt, ist indirekt bewiesen: Elektrophysiologische Ableitungen von Semm und Beason zeigen, dass der ophthalmische Nerv Informationen des Magnetfeldes überträgt (Beason & Semm 1987, Semm & Beason 1990). Elektromagnetische Pulse, die nur auf einen magnetit-basierten Rezeptor wirken, zeigen eine Beeinflussung der magnetischen Orientierung (siehe auch Abschnitt 3.1.3; W. Wiltschko et al. 1994, 1998). Die Betäubung der Schnabelhaut hindert Vögel in verschiedenen Versuchen, magnetische Parameter zu benutzen (siehe auch Abschnitt 3.1.4; R. Wiltschko et al. 2010a, Zfg. 2010b).

Die größten morphologischen Unterschiede der eisenhaltigen Magnetrezeptoren von Hühnern und Tauben liegen in

- der Lokalisation der Felder der eisenhaltigen Strukturen; bei Hühnern sind es mehr als 6 Felder, und diese liegen eher im kaudalen und medianen Bereich der Schnabelhaut und nicht, wie bei Tauben, im frontalen Bereich (Abb. 3.10);
- der Struktur der einzelnen Felder bzw. der Lage der eisenhaltigen Dendriten innerhalb eines Feldes zueinander. Hierbei können bei Hühnern noch mal zwei Besonderheiten unterschieden werden:
 - In den meisten Feldern sind die eisenhaltigen Dendriten parallel ausgerichtet, die Ausrichtung in der Achse in Bezug zum Schnabel kann aber nicht so konstant bestimmten Bereichen zugeordnet werden wie bei Tauben. Die drei Raumrichtungen sind allerdings auch bei Hühnern abgedeckt.

²⁶ Die Unterscheidung, ob die eisenhaltigen Strukturen in oder an Dendriten liegen ist lichtmikroskopisch in der Doppelfärbung zwischen Neurofilament und Berliner-Blau nicht möglich. Ich denke, in beiden Fällen würde es sich als Rezeptorstruktur eignen, allerdings wäre es für die Funktionsweise eventuell ein Unterschied.

- In manchen Feldern sind die eisenhaltigen Dendriten nicht parallel ausgerichtet, sondern nehmen verschiedene Richtungen ein, bis zu einer Dreiecksformation.

Es stellt sich nun die Frage, wie relevant diese Unterschiede für die Funktion des Magnetrezeptor-Systems sind.

3.3.2.2 Modell der Funktionsweise der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel

Fleissner et al. (2007a, 2007b) spekulieren, dass der einzelne Magnetrezeptor wie folgt funktioniert: die Kraft des Magnetfeldvektors wirkt auf die Plättchen, die diese ihrerseits an die Kugeln weitergeben. Die Kugeln sind laut Modell mit der Zellmembran verbunden, in der sie durch Verformung ihrer eigenen Gestalt und dadurch ausgelöst mit Hilfe von Fasern, mechanisch sensible Ionenkanäle öffnen. Geschieht dies durch mehrere Kugeln, werden diese primären Membranpotentialänderungen aufaddiert und so zum Rezeptorpotential. Auch physikalischen Berechnungen zufolge würde so ein ausreichend sensitives Magnetometer entstehen (Solovyov & Greiner 2007). Es ist unklar, welche Funktion der Vesikel hat. Es wird diskutiert, ob er den magnetischen Fluss konzentrieren könnte. Zu diesem Modell kann ich durch meine hier gewonnenen Erkenntnisse der subzellulären Struktur der Magnetrezeptoren der Hühner nichts beitragen, allerdings scheinen die subzellulären Einzelkomponenten der eisenhaltigen Dendriten mit allen Details ihres Aufbaus für die Funktionsweise relevant zu sein, da sich die Komponenten der Rezeptoren von Huhn und Taube selbst auf elektronenmikroskopischer Ebene nicht erkennbar unterscheiden. Es ließen sich auch bei Hühnern Fasern zwischen den Plättchen und Kugeln erahnen, die für das Modell sprechen könnten, da Fasern eine Möglichkeit wären, die Kraft des Magnetfeldvektors, der auf die Plättchen wirkt, auf die Kugeln zu übertragen.

Wie aber wird nun das Magnetfeld oder Komponenten davon durch diese Rezeptoren in ihrer Gesamtheit wahrgenommen, bzw. welche Information wird übertragen? Fleissner et al. (2007a, 2007b) vermuten, dass die Anordnung der Dendriten in drei Raumrichtungen es dem Vogel ermöglicht, den gesamten lokalen Magnetfeldvektor zu messen. Dreht der Vogel seinen Kopf, ändern sich die Komponenten in den einzelnen Richtungen, der Gesamtvektor bleibt allerdings gleich. Jedes Feld (oder auch jeder eisenhaltige Einzeldendrit) kann allein nur eine Feldausrichtung bevorzugt wahrnehmen, so dass die Anordnung in mehreren Achsen für dieses System entscheidend ist. Von dem auf diese Weise ermittelten Magnetfeldvektor kann die Richtung (Inklination und Deklination), aber auch die Intensität abgeleitet werden. Sowohl Tauben (Fleissner et al. 2003, 2007a) als auch Hühner besitzen

die für das Modell erforderlichen Ausrichtungen der Felder in mehrere Raumrichtungen, allerdings haben Fleissner et al. (2003, 2007a) der Anzahl der Felder und deren Ausrichtung in den zugeordneten Regionen in den Taubenschnäbeln eine große Bedeutung zugemessen. Bei Hühnern dagegen scheint die Festlegung der Raumrichtung der Felder auf bestimmte Regionen nicht so deutlich und auch individuell verschieden zu sein. Ich vermute, dass die Anordnung der Felder der Magnetrezeptoren eine untergeordnete Rolle spielt, da die nervösen Anbindungen der Dendriten in der Peripherie an die verarbeitenden Strukturen im Gehirn entscheidend sind. An welcher zentralnervösen Stelle dann individuell eine Raumrichtung repräsentiert ist, sollte für das Gesamtsystem nicht relevant sein. In jedem Fall sind verarbeitende Strukturen im Gehirn notwendig, die zu einer solchen vom Modell geforderten Verrechnung der Einzelkomponenten des Magnetfeldes in der Lage sind.

3.4 Entwicklung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren im Oberschnabel von juvenilen Hühnern

3.4.1 Ergebnisse²⁷

3.4.1.1 Lichtmikroskopische Struktur und μ -XRF-Analysen

Abgesehen von Blutkörperchen in Blutgefäßen sind am **Tag des Schlupfes** noch keinerlei eisenhaltige Strukturen in der Schnabelhaut der Küken mit der Berliner-Blau-Reaktion nachweisbar (Abb. 3.13). Daraus kann man ableiten, dass die eisenhaltigen Dendriten der Hühner noch nicht im Ei, sondern erst nach dem Schlupf angelegt werden.

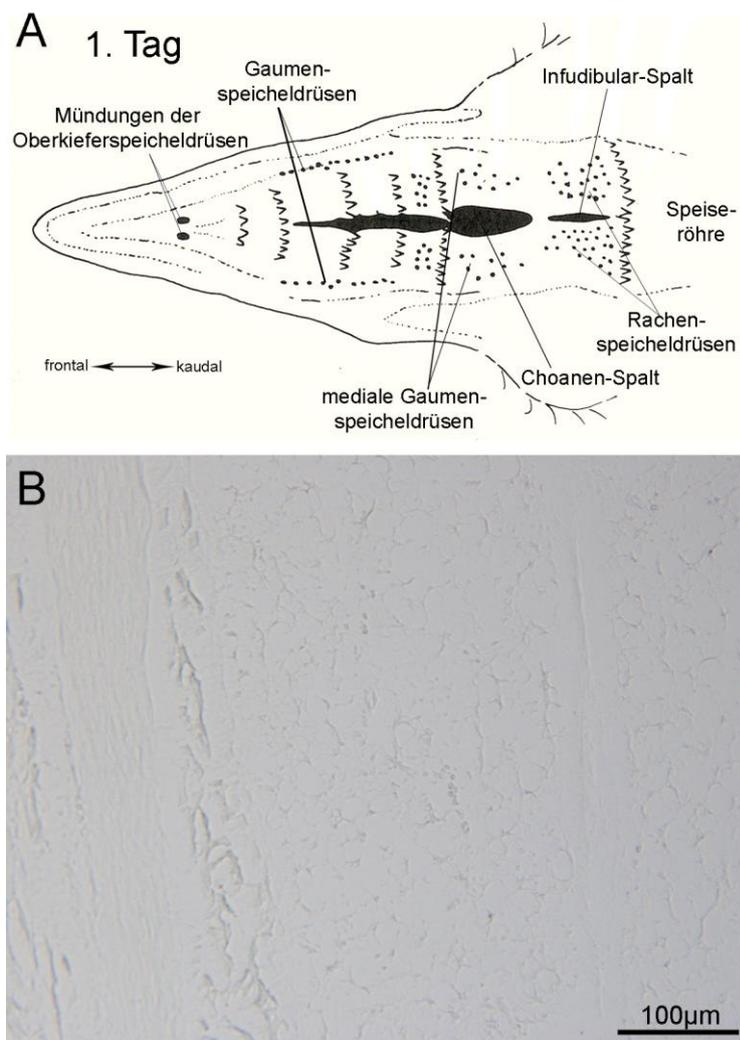


Abb. 3.13 Eisennachweis in der Schnabelhaut am Schlupftag. (A) Schema der Schnabelhaut des Oberschnabels eines Huhns in Aufsicht (verändert nach King & McLelland 1978). Bei frisch geschlüpften Küken sind alle Strukturen des adulten Hühnerschnabels bereits angelegt. Der Schnabel ist lediglich kleiner, circa 0,9 cm lang. Es gibt in diesem Altersstadium noch keine eisenhaltigen Strukturen außer natürlich rote Blutkörperchen. (B) Mikroskopische Aufnahme eines berliner-blaugefärbten Paraffinschnittes. Es ist kein Reaktionsprodukt sichtbar. Als Beispiel wurde hier der frontale Bereich des Schnabels gewählt, da dort bei 5 Tage alten Hühnern die meisten eisenhaltigen Strukturen zu finden sind (siehe Abb. 3.14).

²⁷ Die Daten dieser Studie wurden von Susanne Denzau und mir gemeinsam erhoben und werden ebenfalls in ihrer Dissertation, dort im Kontext mit Verhaltensversuchen, Eingang finden.

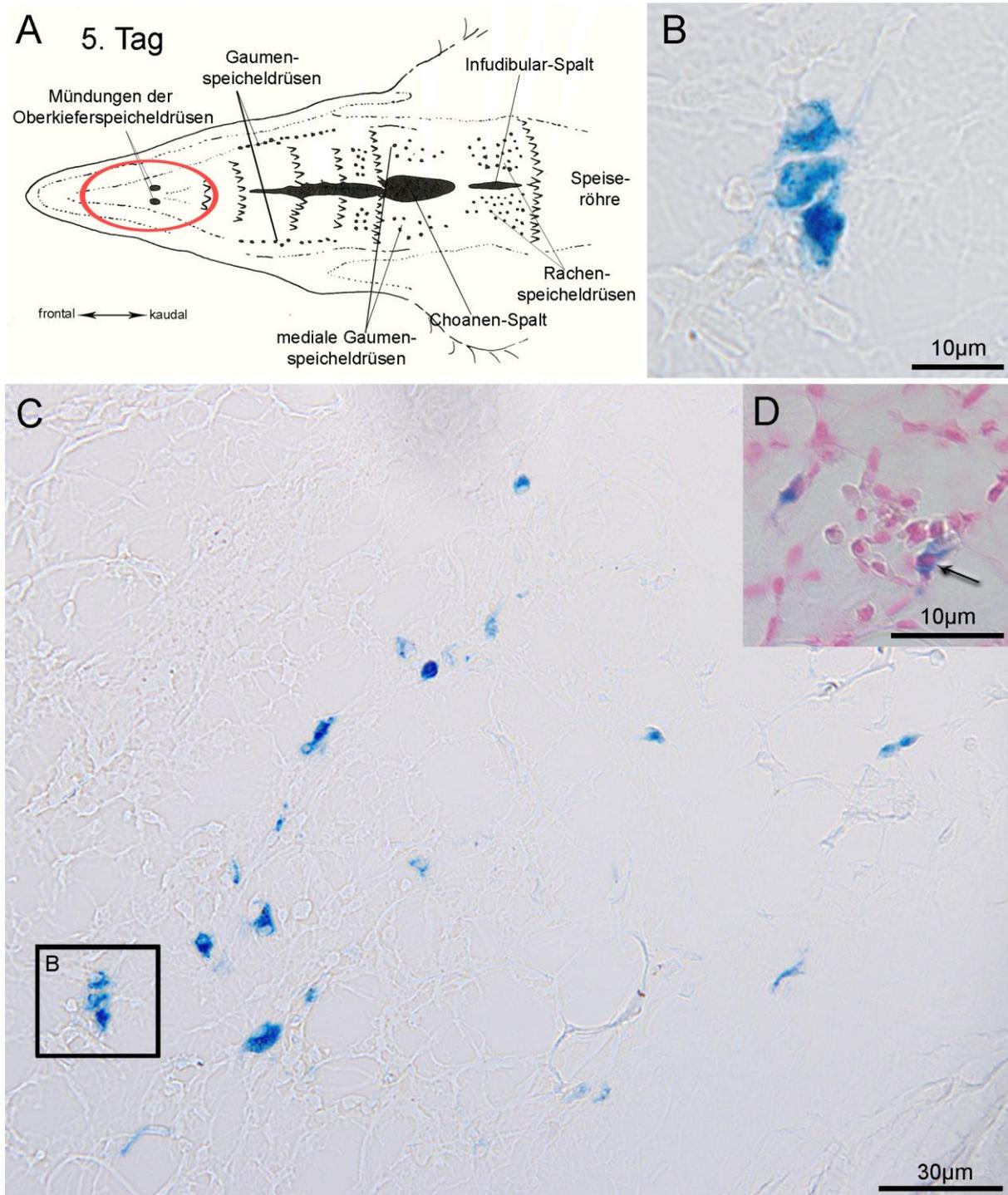


Abb. 3.14 Eisennachweis am 5. Tag nach Schlupf. (A) Schematische Skizze des Oberschnabels (Schnabelanatomie verändert nach King & McLelland 1978). Der gesamte Schnabel eines 5 Tage alten Huhns ist circa 1,1 cm lang. Im frontalen Bereich des Schnabels (in rot markiert) haben Hühner verhältnismäßig viele runde eisenhaltige Strukturen. (B) und (C) Mikroskopische Aufnahmen eines berliner-blau-gefärbten Paraffinschnittes (in verschiedenen Vergrößerungen, siehe Maßstab). In (B) ist zu erkennen, dass diese Strukturen rundlich sind und nur zum Teil einen eisenfreien Bereich enthalten. In (D) ist im Parallelschnitt durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot zu erkennen, dass dieser eisenfreie Bereich ein Zellkern ist.

Am **5. Tag** nach dem Schlupf zeigten sich bei drei Hühnern verhältnismäßig viele eisenhaltige runde Strukturen im frontalen Bereich des Schnabels (Abb. 3.14 und 3.15), bei den anderen zwei Hühnern waren es weniger von diesen Strukturen. In der μ -XRF-Kartierung sind diese Strukturen ebenfalls zu erkennen, und es ist abzulesen, dass die Einzelpunkte bis zu 300 oder mehr AU (AU = arbitrary units, willkürliche Einheit) an Eisen

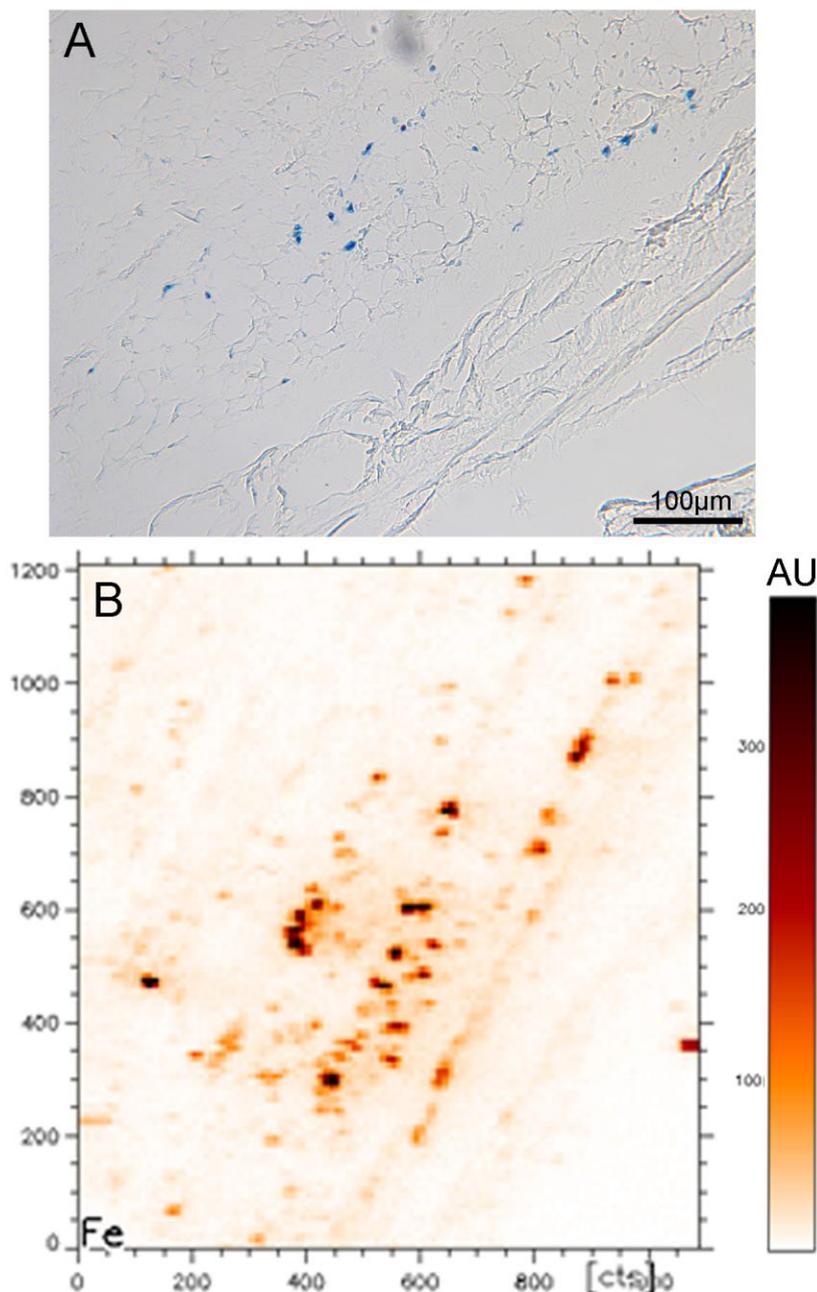


Abb. 3.15 Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 5 Tage alten Hühner. (A) Berlinerblau-gefärbter Paraffinschnitt (bekannt aus Abb. 3.14) im selben Maßstab wie die μ -XRF-Messung in (B). Der Schnitt in (B) ist nach der Positionierung auf der Messfolie nicht gestreckt worden, so dass der Bereich real größer ist als in (A). Dies könnte auch der Grund sein, warum im XRF mehr eisenhaltige Strukturen sichtbar sind als im berlinerblau-gefärbten Parallelschnitt. (B) Die Strukturen enthalten bis zu 300 AU an Eisen. AU – arbitrary units, willkürliche Einheit.

enthalten (Abb. 3.15 B). Diese Strukturen liegen im Bindegewebe, haben zum Teil auch einen Bereich, der von der Färbung ausgespart bleibt, und bestehen, wie die eisenhaltigen Magnetrezeptoren der adulten Hühner, aus einzelnen Clustern. Darüber hinaus weisen sie morphologisch keine Gemeinsamkeiten mit den länglichen eisenhaltigen Magnetrezeptoren

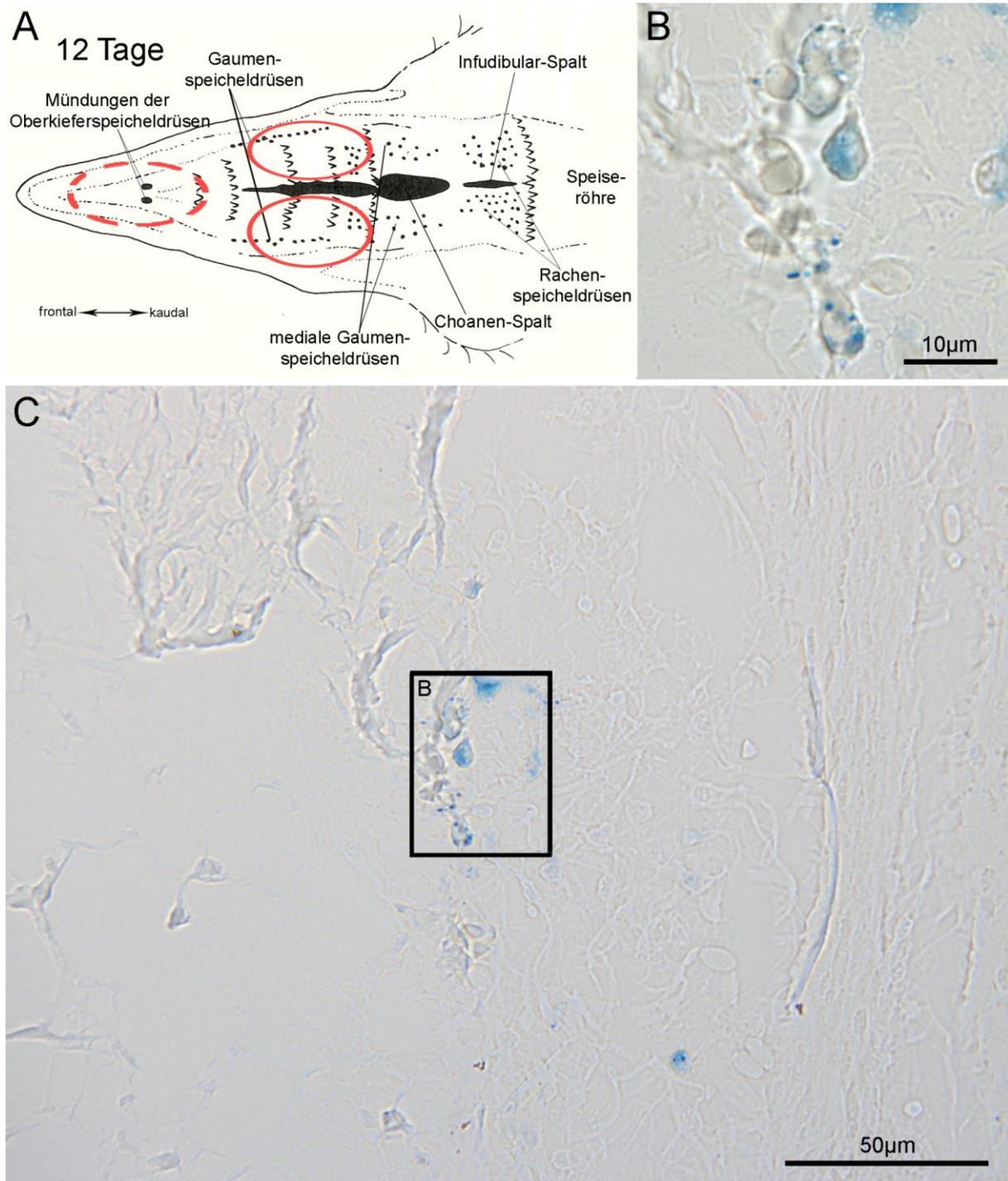


Abb. 3.16 Eisennachweis in der Schnabelhaut am 12. Tag nach Schlupf. (A) Schema der Schnabelhaut (Schnabelanatomie verändert nach King & McLelland 1978). Der gesamte Schnabel eines 12 Tage alten Huhns ist circa 1,3 cm lang. Die Bereiche, in denen bei 12 Tage alten Hühnern eisenhaltige Makrophagen gefunden wurden, sind rot markiert. Da im frontalen Bereich nur noch wenige dieser Makrophagen vorhanden sind, wurde der Bereich gestrichelt dargestellt. (B) und (C) Mikroskopische Aufnahmen der lateralen, medianen Region des Schnabels in einem berliner-blaugefärbten Paraffinschnitt (in verschiedenen Vergrößerungen). In (B) ist zu erkennen, dass diese Strukturen in der Morphologie den eisenhaltigen Makrophagen der 5 Tage alten Hühner entsprechen. Insgesamt sind es aber nicht so viele eisenhaltige Makrophagen wie bei 5 Tage alten Hühnern.

Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel: **Ergebnisse Entwicklung**

der adulten Hühner auf (Abb. 3.14 B und 3.4). Die Färbung mit Kernechtrot zeigt, dass der von der Berliner-Blau-Reaktion ausgesparte Bereich ein Zellkern ist (Abb. 3.14 D). Dies legt nahe, dass es sich hier um eisenhaltige Makrophagen handelt.

Diese eisenhaltigen Makrophagen waren dann bei allen untersuchten Tieren in den nächsten 7 Tagen, also bis zum **12. Tag** nach Schlupf, sowohl in der Anzahl als auch in der Intensität der Färbung deutlich vermindert (Abb. 3.16 C). Sie befinden sich weiterhin in der Schnabelspitze, aber auch im lateralen Bereich des Schnabels im Bindegewebe (Abb. 3.16 A). Sie entsprechen in ihrer Morphologie denen der 5 Tage alten Hühner (Abb. 3.16 B und 3.14 B). Allerdings haben auch 12 Tage alte Hühner allenfalls einzelne längliche eisenhaltige Strukturen, wie sie bei adulten Hühnern zu beobachten sind. Wenn es diese Strukturen gibt, sind sie im basalen Bereich des Schnabels zu finden. Das μ -XRF bestätigt den Eindruck der Berliner-Blau-Reaktion: die eisenhaltigen Makrophagen sind deutlich seltener und enthalten deutlich weniger Eisen (Abb. 3.17 B).

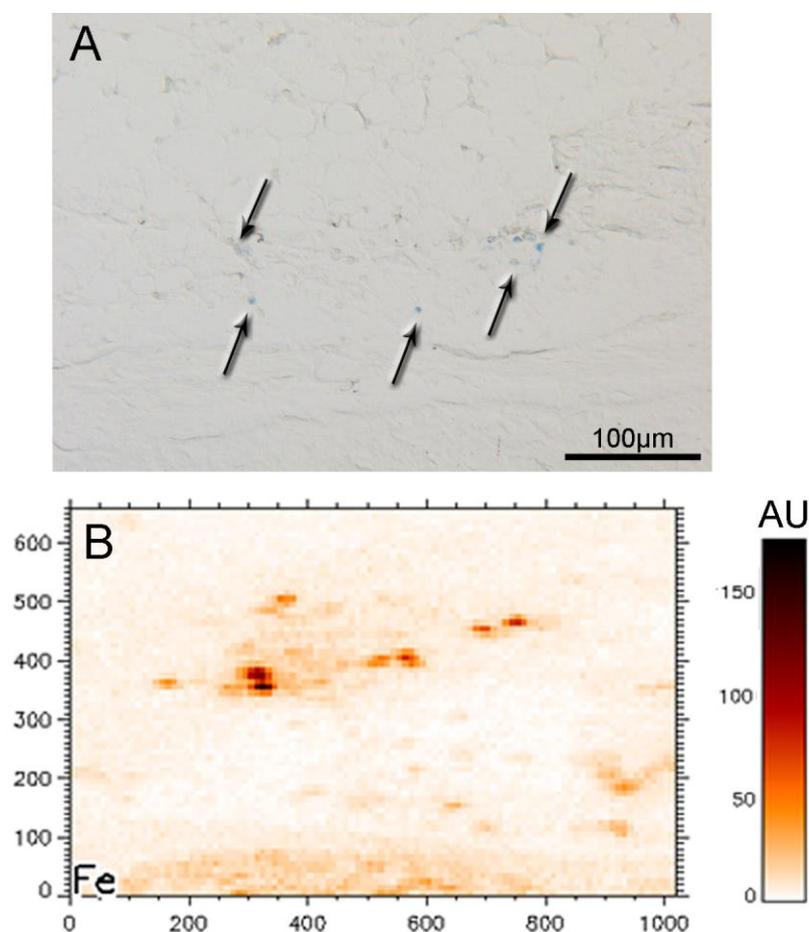


Abb. 3.17 Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 12 Tage alten Hühner. (A) Berlinerblau-gefärbter Paraffinschnitt (bekannt aus Abb. 3.16 in anderer Ausrichtung). Blaue Stellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstab ist hier etwa doppelt so groß wie die μ -XRF-Messung des Parallelschnittes in (B). In (B) sind weniger eisenhaltige Makrophagen sichtbar als bei 5 Tage alten Hühnern, und diese enthalten bis zu 150 AU an Eisen. AU – arbitrary units, willkürliche Einheit.

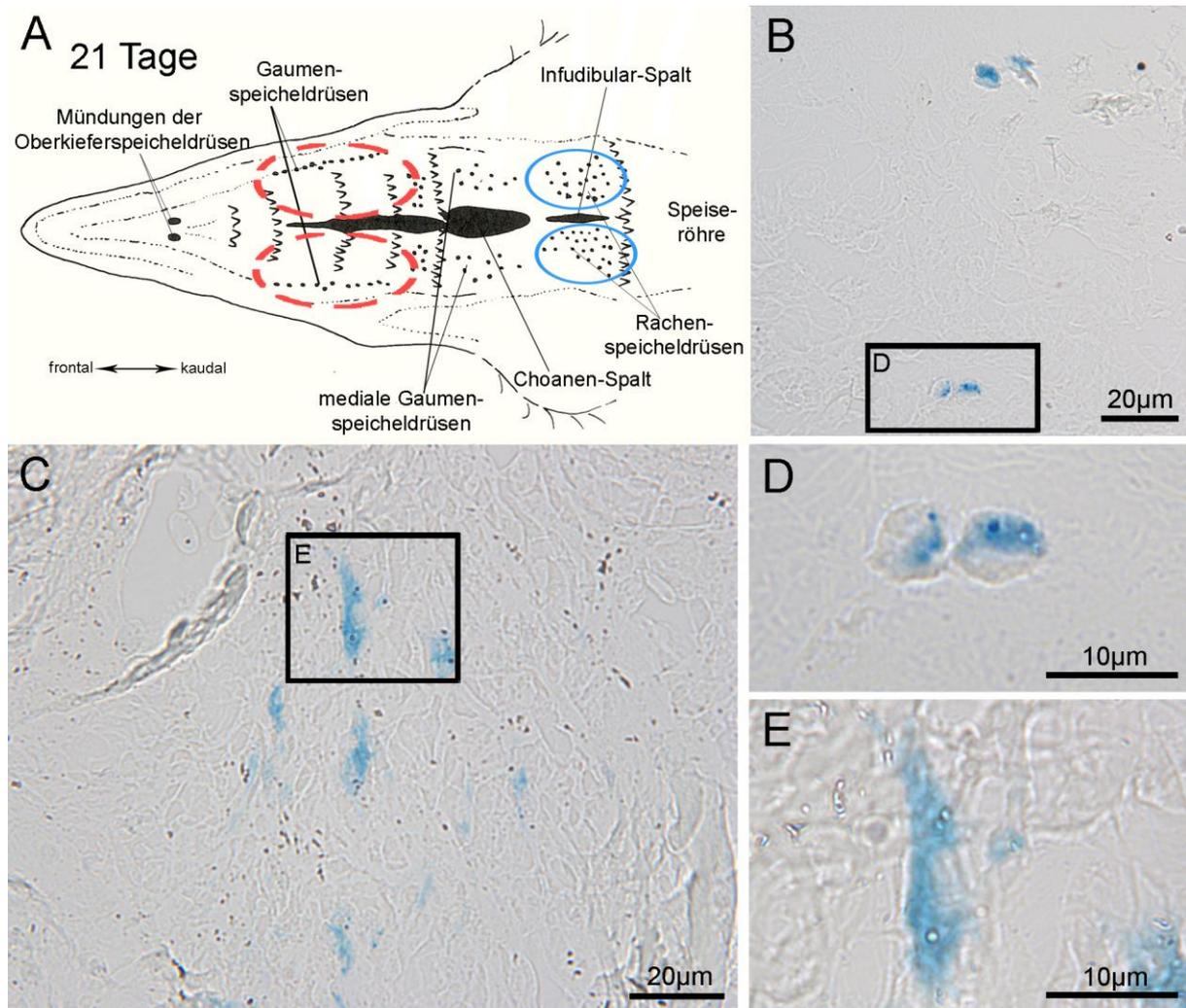


Abb. 3.18 Eisennachweis am 21. Tag nach Schlupf. (A) Skizze des Oberschnabels des Huhns (Schnabelanatomie verändert nach King & McLelland 1978); Der gesamte Schnabel ist bei 21 Tage alten Hühnern circa 1,5 cm lang. In Rot sind die Stellen markiert, an denen eisenhaltige Makrophagen gefunden wurden. Da es nur noch sehr wenige sind, wurde der Bereich gestrichelt dargestellt. Im basalen Bereich sind in Blau die Stellen eingezeichnet, an denen eisenhaltige Dendriten gefunden wurden. (B) - (E) Mikroskopische Aufnahmen in verschiedener Vergrößerung von berliner-blau-gefärbten Paraffinschnitten. In (B) und vergrößert in (D) finden sich die von juvenilen Hühnern bekannten runden Strukturen. Es sind nur noch sehr wenige, hier aus dem lateralen Bereich gezeigt. In (C), und in (E) vergrößert, ist aus dem kaudalen Bereich des Schnabels ein Feld von eisenhaltigen Dendriten dargestellt, wie sie bei adulten Hühnern zu finden sind. In (E) ist zu sehen, dass diese eisenhaltigen Dendriten in eine Richtung (von kaudal nach frontal) ausgerichtet sind, und in (D), dass sie die charakteristische eisenfreie Zone (Vesikel) haben.

Bei **21 Tage** alten Hühnern kommen so gut wie keine eisenhaltigen Makrophagen in der Schnabelspitze mehr vor. Auch im lateralen Bereich sind sie weiter reduziert, aber noch vorhanden (Abb. 3.18 A, B, D). Das μ -XRF zeigt nur in einer Messung einen deutlichen Eisennachweis von ca. 250 AU, an den meisten Stellen ist das Eisen kaum über dem Hintergrund messbar (Abb. 3.19).

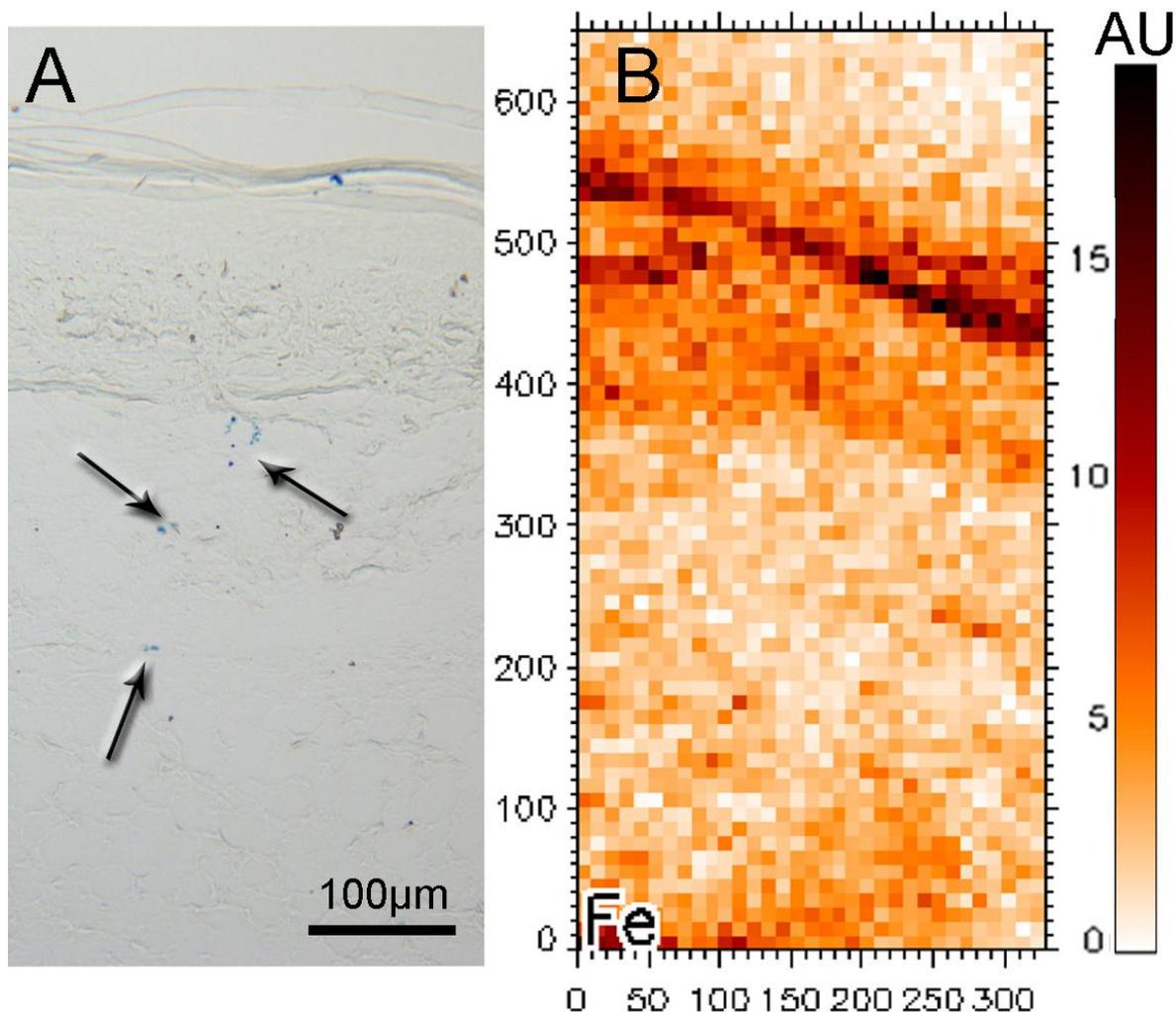


Abb. 3.19 Mikroröntgenanalyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 21 Tage alten Hühner. (A) Berliner-blau-gefärbter Paraffinschnitt (bekannt aus Abb. 3.18). Blaue Stellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht dem der μ -XRF-Messung in (B). In (B) sind keine eisenhaltigen Strukturen sichtbar, die den eisenhaltigen Strukturen in (A) entsprechen. Vermutlich enthalten sie zu wenig Eisen, um sie mit μ -XRF darstellen zu können. AU – arbitrary units, willkürliche Einheit.

Bei 3 Wochen alten Hühnern und ebenso bei 4 Wochen alten Hühnern konnte ich allerdings ein erstes Feld von länglichen eisenhaltigen Strukturen im basalen Bereich identifizieren, die der Morphologie der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner entsprechen (Abb. 3.18 A, C, E). Bei adulten Hühnern sind auch noch vereinzelte eisenhaltige Makrophagen in denselben lateralen Bereichen wie bei juvenilen Hühnern nachweisbar. Diese sind oftmals in direkter Nachbarschaft zu eisenhaltigen Dendriten zu finden (Anhang Abb. A 3.2).

3.4.1.2 Immunhistologische Charakterisierung

Der immunhistologische Nachweis von Neurofilament (Abb. 3.20) zeigt, dass in dem Bereich, in dem die eisenhaltigen Makrophagen im frontalen Teil des Schnabels bei 5 Tage alten Hühnern liegen, keine Nerven vorhanden sind. Auch im lateralen Bereich, in dem später dieselben eisenhaltigen Strukturen gebildet werden, wurden keine Nerven sichtbar. Die Doppelfärbung zeigt deutlich, dass diese eisenhaltigen Strukturen nicht mit Nervengewebe kolokalisieren (Abb. 3.20). Auch bei adulten Hühnern konnten im Bindegewebe keine Nervenstränge identifiziert werden (siehe Anhang Abb. A 3.3).

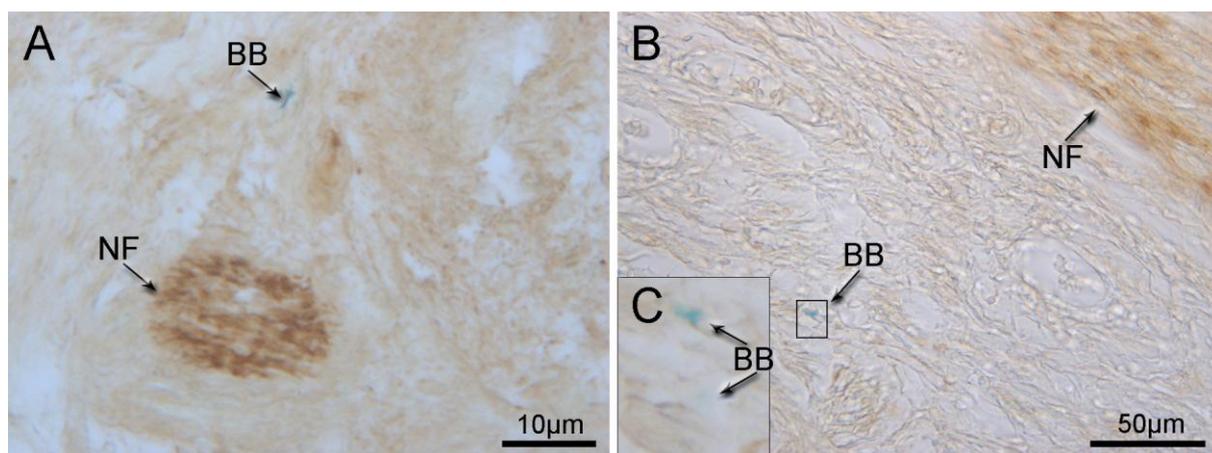


Abb. 3.20 Immunhistologische Markierung der Nervenfasern und Berliner-Blau-Reaktion des Eisens im Oberschnabel eines 5 Tage alten Huhns. Das Reaktionsprodukt der immunhistologischen Markierung (Diaminobenzidin als Substrat) ist braun, in Blau ist der Eisennachweis in einem Paraffinschnitt zu erkennen. Beide Färbungen kolokalisieren nicht. In (A) und (B) sind zwei unterschiedliche Stellen gezeigt, beide aus dem frontalen Bereich des Schnabels. In (A) ist der Nerv quer angeschnitten (mit NF markiert), und die Berliner-Blau-Reaktion liegt nicht im Nervengewebe (mit BB gekennzeichnet). In (B) ist der Nerv längs getroffen, die Berliner-Blau-Reaktion liegt darunter und ist in (C) vergrößert dargestellt. NF – Neurofilament, BB – Berliner-Blau-Reaktion.

3.4.1.3 Charakterisierung der Eisenoxid-Zusammensetzung mit μ -XANES

Um die Eisenoxid-Zusammensetzung der oben gezeigten eisenhaltigen Makrophagen charakterisieren zu können, wurde als Referenz der μ -XANES-Messungen hier das Summenspektrum der Messdaten aus Falkenberg et al. (2010) (Abb. 3.21: schwarze Linie) aufgetragen. Dazu wurde noch eine Probe von Magnetbakterien (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) ebenfalls als Referenz gemessen.

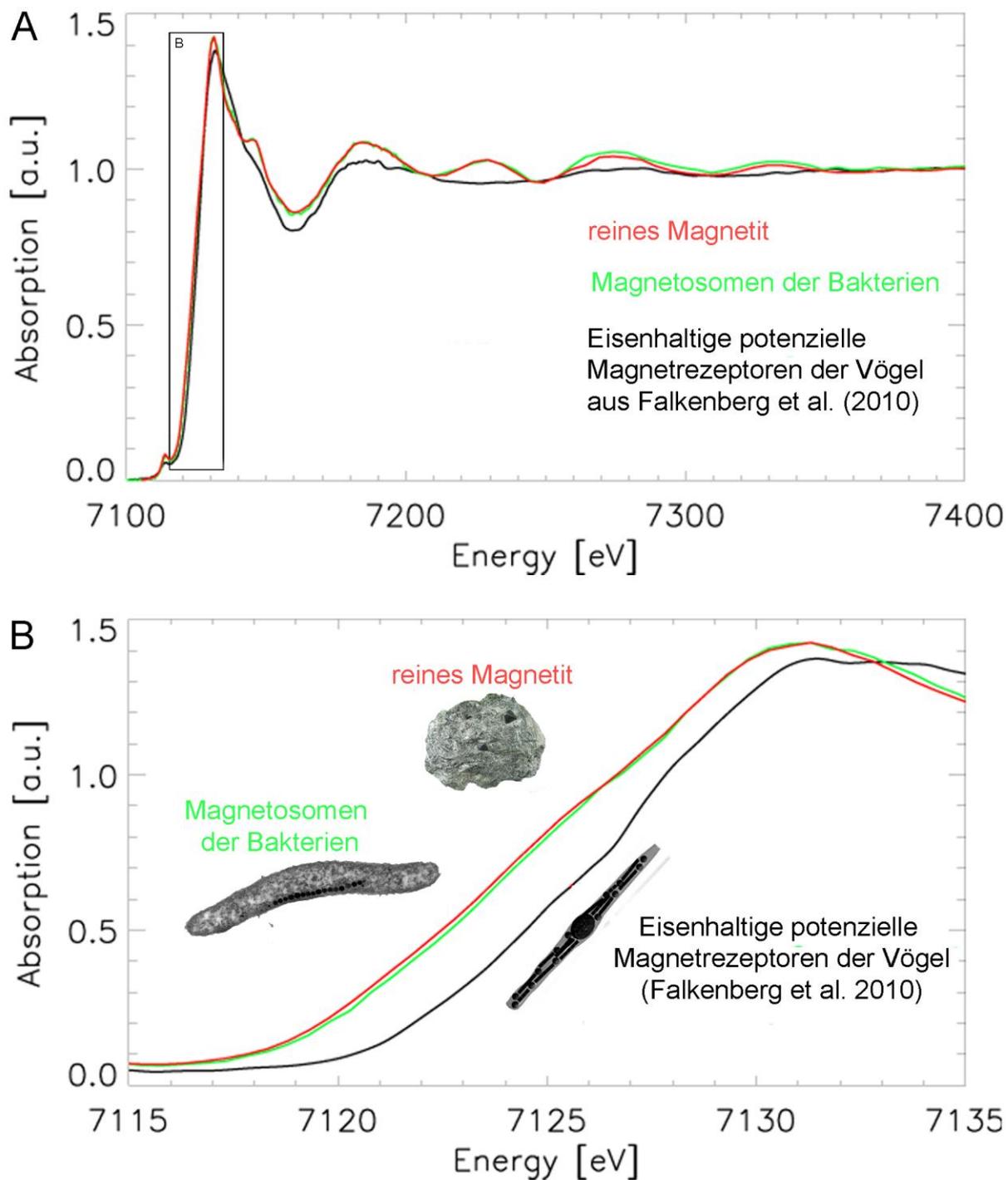


Abb. 3.21 Charakterisierung der Eisenoxid-Zusammensetzung (μ -XANES-Spektren) der Magnetosomen vom Magnetbakterium *M. gryphiswaldense* im Vergleich zu der der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel. In (A) und (B) ist der Vergleich der μ -XANES-Spektren von *M. gryphiswaldense* (grüne Linie) und dem Summenspektrum aus verschiedenen Vogelarten, nämlich Tauben, Gartengrasmücken, Rotkehlchen und Hühner (schwarze Linie, aus Falkenberg et al. 2010), dargestellt. In (B) wurde der Bereich von 115 eV und 135 eV vergrößert. Die rote Linie ist Magnetitpulver als Referenz. In beiden Kurven wurde die Absorption gegen die Anregungsenergie aufgetragen. Die Eisenoxid-Zusammensetzung der Magnetosomen *M. gryphiswaldense* (Bild aus Schüler 2008) entspricht reinem Magnetit. Die Abweichung der Spektren der Magnetbakterien zu den eisenhaltigen potenziellen Magnetrezeptoren der Vögel beträgt etwa 2eV. Somit unterscheidet sich die Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Dendriten der untersuchten Vögel von der von *M. gryphiswaldense*.

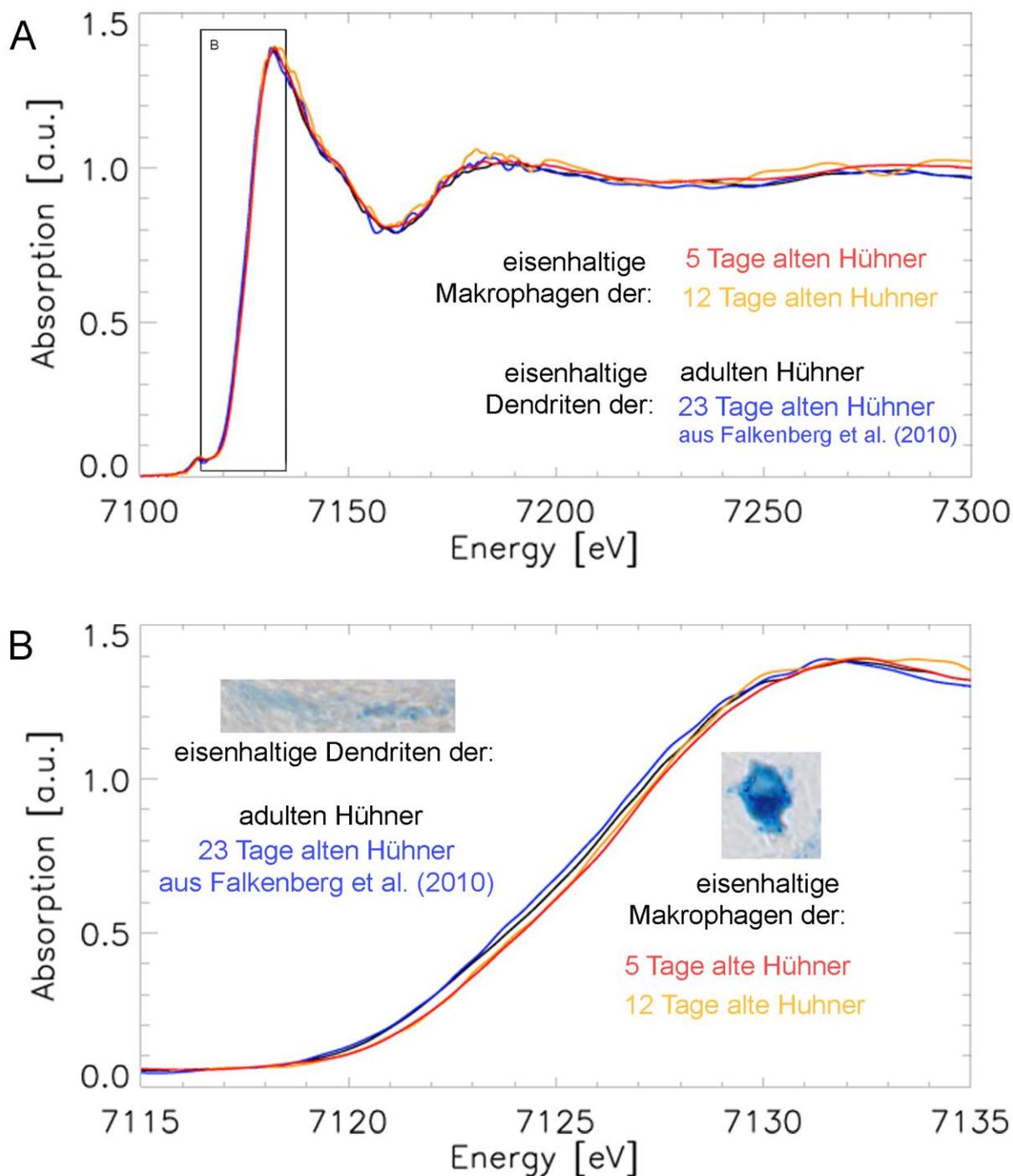


Abb. 3.22 Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (μ -XANES) der eisenhaltigen Makrophagen und der eisenhaltigen Dendriten der Hühner verschiedenen Alters. In (A) und (B) ist ein Vergleich der μ -XANES-Spektren der eisenhaltigen Makrophagen von 5 Tage (rote Linie) und 12 Tage (gelbe Linie) alten Hühnern mit den eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner (schwarze Linie) und der von 23 Tage alten Hühner (blaue Linie aus Falkenberg et al. 2010) dargestellt. In (B) ist der Bereich von 115 eV und 135 eV vergrößert gezeigt. In beiden Kurven wurde die Absorption gegen die Anregungsenergie aufgetragen. Die Abweichung der Spektren der eisenhaltigen Makrophagen der jungen Hühner zeigt eine Abweichung von 0,4 eV zu denen der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der älteren und adulten Hühner. Somit unterscheidet sich die Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Makrophagen der unterschiedlich alten Hühner untereinander nicht, allerdings ist sie anders als die eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner.

Die Eisenoxid-Zusammensetzung von *M. gryphiswaldense* entspricht dem kristallinen Magnetitpulver, das hier als Referenz verwendet wurde. Das bedeutet, das Eisen der Magnetbakterien besteht aus reinem Magnetit und ist somit signifikant verschieden von den eisenhaltigen Dendriten der Hühner. Die Verschiebung der Spektren beträgt etwa 2eV (Abb. 3.21).

Die Messungen der Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Makrophagen der juvenilen Hühner verschiedenen Alters entsprechen sich. Dies schließt auch die eisenhaltigen Makrophagen aus den verschiedenen Bereichen der Schnabelhaut ein, nämlich aus dem frontalen Bereich des Schnabels bei 5 Tage alten Hühnern oder aus dem lateralen Bereich des Schnabels bei 12 Tage alten Hühnern. Die länglichen eisenhaltigen Dendriten eines 23 Tage alten Huhns von Falkenberg et al. (2010) und die Messung der eisenhaltigen Dendriten des adulten Huhns von mir zeigen zwar eine Abweichung, die allerdings auf die geringe Zahl der Messungen beim adulten Huhn zurückzuführen ist und somit als irrelevant eingestuft werden kann. Das zugehörige μ -XRF des adulten Huhns ist im Anhang (Abb. A 3.4) dargestellt. Die eisenhaltigen Dendriten haben die gleiche Eisenoxid-Zusammensetzung, unabhängig davon, ob das Tier adult oder erst 3 Wochen alt ist. Die eisenhaltigen Makrophagen unterscheiden sich allerdings in ihrer Eisenoxid-Zusammensetzung von den eisenhaltigen Dendriten – so beträgt die Energieverschiebung etwa 0.4 eV (Abb. 3.22). Dies unterstützt die histologischen Befunde. Es handelt sich hierbei offensichtlich um unterschiedliche Zelltypen, da auch die Eisenoxid-Zusammensetzung unterschiedlich ist.

3.4.2 Diskussion

Die eisenhaltigen Strukturen in Dendriten werden erst deutlich nach dem Schlupf angelegt. Bei Küken am ersten Tag nach dem Schlupf gibt es in der Schnabelhaut keine eisenhaltigen Strukturen in Nervengewebe, die durch den Berliner-Blau-Eisennachweis sichtbar werden. 5 Tage alte Hühner haben viele eisenhaltige Makrophagen in der Nähe der Schnabelspitze, die in den nächsten 7 Tagen reduziert werden. Es wird sowohl die Eisenmenge in diesen Makrophagen als auch die Anzahl dieser Strukturen selbst verringert. Bei 12 Tage alten Hühnern kommen noch vereinzelt dieser speziellen Makrophagen in der Schnabelspitze vor und außerdem einige im lateralen Bereich in der Mitte des Schnabels. Bei 21 Tage alten Hühnern gibt es ein erstes Feld von eisenhaltigen Dendriten. Die Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Makrophagen ist immer gleich, unabhängig von deren Lokalisation oder dem Alter des Kükens, unterscheidet sich aber von der der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner.

3.4.2.1 Möglicher Zusammenhang zwischen eisenhaltigen Makrophagen und eisenhaltigen Magnetrezeptoren

Es stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Aufbau der eisenhaltigen Dendriten und dem Abbau der eisenhaltigen Makrophagen besteht. Ein Zusammenhang könnte durch den zeitlichen Ablauf der beiden Vorgänge vermutet werden. Die Eisenoxid-Zusammensetzung unterscheidet sich bei diesen beiden eisenhaltigen Strukturen zwar, sie könnte jedoch durch eine erneute Biomineralisation verändert werden. Makrophagen bauen Eisen nicht nur ab, sondern sind insgesamt Teil des Eisenstoffwechsels (Ganz 2012). Es ist bemerkenswert, dass die Eisenzusammensetzung der Makrophagen in der Röntgenanalyse nicht stärker variiert, da in Makrophagen verschiedene Bestandteile abgebaut werden. Allerdings wird das Eisen vermutlich in einer bestimmten Form an Proteine (Hämosiderin, Ferritin etc.) gebunden, um es in der Zelle nicht toxisch wirken zu lassen.

Warum allerdings sollte das Eisen erst in Makrophagen eingelagert und nicht direkt in die eisenhaltigen Dendriten eingebaut werden? Die Ausbildung der Nerven des trigeminalen Nervensystems sollte bei Schlupf abgeschlossen sein. Bei Wirbeltieren wird die Entwicklung des trigeminalen Nervensystems in bestimmte Stadien²⁸ eingeteilt, die aber alle im embryonalen Zustand abgeschlossen werden (Zfg. Davies 1988). Bei Hühnerembryonen wurde in einer Studie der Aufbau des trigeminalen Systems in großen Teilen im Stadium 25

²⁸ Erst werden die Axone ausgebildet. Wenn diese ihre Zielregion erreicht haben, werden bestimmte Neurone wieder zurückgebildet. Dieser Vorgang dauert an, bis das letzte Axon das Zielgebiet erreicht hat. Anschließend werden noch weitere Verbindungen zwischen den einzelnen Nervenzellen aufgebaut (Zfg. Davies 1988).

der Embryonalentwicklung als abgeschlossen gefunden. Nur ganz periphere Hautpartien waren noch nicht von Nerven innerviert. Da die gesamte Embryonalentwicklung in 46 Stadien eingeteilt ist (Hamburger & Hamilton 1951)²⁹, sollten auch diese Regionen deutlich vor Schlupf vollständig innerviert sein (Moody et al. 1989). Auch treten die eisenhaltigen Makrophagen zuerst in der Schnabelspitze geballt auf, in der später bei Hühnern keine Felder der eisenhaltigen Magnetrezeptoren vorkommen. Später gibt es jedoch im lateralen Bereich auch einen lokalen Zusammenhang.

Ein Hinweis auf den Bildungsprozess ergibt sich eventuell aus einer Verhaltensstudie, in der Hühner, deren Schnäbel direkt nach dem Schlupf kupiert wurden, auf eine magnetische Anomalie trainiert wurden (Freire et al. 2011). Obwohl die Kürzung des Schnabels nur die Schnabelspitze betraf, suchten diese Tiere die magnetische Anomalie deutlich seltener auf als die Kontrollgruppe. Ich vermute, dass die Schnabelspitze als früher Syntheseort für eisenhaltige Makrophagen nicht mehr zur Verfügung stand und so die Bildung von eisenhaltigen Dendriten beeinträchtigt war.

Ich habe oben bereits vermutet, dass auch adulte Hühner noch eisenhaltige Strukturen in Dendriten bilden können. Auch adulte Hühner haben eisenhaltige Makrophagen, und dies häufig in der Nähe der eisenhaltigen Dendriten. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass eisenhaltige Makrophagen auch später noch, wenn für den Organismus ausreichend Eisen zur Verfügung steht, den Aufbau der eisenhaltigen Magnetrezeptoren unterstützen. Eisen wird in Zellen nie frei belassen, da es für den Organismus extrem toxisch ist. So ergibt eine Speicherung des Eisens in Zellen und in dafür vorgesehenen Proteinen durchaus Sinn, wenn später größere Mengen von Eisen benötigt werden. Außerdem sind Makrophagen in der Lage, sich im Gewebe zu bewegen und so das Eisen an die entsprechende Stelle zu transportieren.

3.4.2.2 Biomineralisation

Im Zusammenhang mit der Entwicklung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren steht die Biomineralisation der einzelnen Komponenten dieser eisenhaltigen Strukturen. Zurzeit sind noch keine potenziell beteiligten Proteine bekannt, die mit dem Eisenstoffwechsel bzw. mit der Bildung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren in Zusammenhang stehen. Bei den Magnetosomen der magnetotaktischen Bakterien sind die Biomineralisation und somit die beteiligten Gene und Proteine von allen biologischen Systemen am besten untersucht (Zfg. Schüler 2008). Die Magnetosomen sind der Zellbestandteil der magnetotaktischen Bakterien, der es ihnen ermöglicht, sich am Magnetfeld der Erde auszurichten. In einem Abgleich

²⁹ Zumindest in der Einteilung, an der sich Moody et al. (1989) orientiert haben.

(BLAST) zwischen dem mittlerweile vollständig entschlüsselten Genom und somit den Proteinen des Huhns mit denen bei dem Magnetbakterium *M. gryphiswaldense* für die Biomineralisation identifizierten Proteinen/Genen ergeben sich zwar signifikante Treffer, die sich allerdings bei genauerer Betrachtung durch allgemeine funktionelle Domänen dieser Proteinfamilien erklären lassen (siehe Anhang A 3.2). Bei diesen Treffern handelt es sich erstens um verschiedenen Serin-Proteasen, die zu den Hitze-Schock-Proteinen gehören und in ihrer enzymatischen Eigenschaft bestimmte geschädigte Proteine im Zytoplasma abbauen (Zfg. Pallen & Wren 1997). Zweitens um ein P-Protein, welches Teil der Glycin-Aufspaltung ist (Fujiwara et al. 1987), und drittens um Slc30a9-prov-Protein, welches vermutlich ein Zinktransporter ist (siehe Anhang A 3.2). Es handelt sich offensichtlich nicht um Proteine, die an der Biomineralisation der eisenhaltigen Dendriten der Vögel beteiligt sind.

Unabhängig von den Diskussionen der Phylogenie der Organismen (z. B. Ciccarelli et al. 2006) gibt es Proteine, die funktionell verwandt sind, wie beispielsweise ATP und die Enzyme ATP-Synthase, Replicase etc. Diese kommen sowohl bei Bakterien als auch bei Pflanzen und Tieren vor, dort in den Mitochondrien und Chloroplasten (Agarwal 2011). Dabei handelt es sich jedoch um Proteine, die für die grundlegenden Lebensvorgänge notwendig sind, so dass ein starker Selektionsdruck besteht, sie funktionsfähig zu halten. Diese Argumentation gilt in dem Sinne nicht für Magnetit. Magnetit besteht aus Eisen II und Eisen III, dies sind bei höheren Tieren übliche Produkte des Eisenstoffwechsels (Zfg. Kosman 2013). So kann es zur Ausrichtung am Magnetfeld wie in Magnetosomen oder in einem Magnetrezeptor wie bei Vögeln eingebaut werden, ohne dass es sich hierbei um eine homologe Entwicklung handelt. Allerdings benötigt auch die Synthese von Magnetit, unabhängig vom Organismus, in dem sie stattfindet, bestimmte Bedingungen, die von Proteinen und Enzymen hergestellt und konstant gehalten werden müssen. Magnetit kommt außer bei Magnetbakterien und Vögeln unter anderem bei Honigbienen (*Apis mellifera*), Lachsen (*Oncorhynchus nerka*) und als metabolisches Nebenprodukt in den Radula-Zähnen der Käferschnecke (*Acanthopleura hirtosa*) vor (Frankel 1991). Insgesamt ist über Proteine, die an der Biomineralisation beteiligten sind, in diesen Systemen aber wenig bekannt. Das neben Hämoglobin vielleicht bekannteste Protein des Eisenstoffwechsels ist Ferritin.³⁰ Es kommt bei Pflanzen und Tieren vor und ist ein Protein zur Speicherung, aber auch zum Transport von Eisen. Ferritin ist beispielsweise an der Bildung der Radula-Zähne der Käferschnecke beteiligt (Webb et al. 1991). Auch ist bekannt, dass es einen Zusammenhang

³⁰ Ferritin ist zwischen 8-12 nm groß und kann bis zu 4500 Eisenatome aufnehmen und auch wieder abgeben. Das geschieht über eigene Kanäle innerhalb des Proteins (Pierre et al. 1991).

mit der Zahnschmelzbildung bei Ratten gibt (Mataki et al. 1991).³¹ Bei der Bildung von den magnetithaltigen Trophocyten in Honigbienen konnten Aktin, Myosin, Ferritin und ATP-Synthase als beteiligte Proteine identifiziert werden (Hsu & Chan 2011). Es wäre durchaus vorstellbar, dass die Magnetrezeptoren im Schnabel der Vögel auch durch Ferritin mit Eisen gespeist werden. Dies erklärt jedoch nicht, wie die Biomineralisation innerhalb der eisenhaltigen Magnetrezeptoren vonstattengeht. Die Synthese von Magnetit (und Maghemit) benötigt neben Eisen II und Eisen III gemäßigte Temperatur und neutrale bis basische Bedingungen (Zfg. Schüler 2008). Diese Bedingungen könnten ähnlich wie in den Magnetbakterien durch bestimmte Ionenkanäle oder auch aktive Pumpen hergestellt und konstant gehalten werden. Wie in Magnetbakterien könnten separate membranumschlossene Syntheseorte die Einzelteile der Magnetrezeptoren synthetisieren. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis überein, dass die einzelnen Komponenten der Magnetrezeptoren membranumschlossen sind. Auch ist wahrscheinlich, dass die Form dieser fertigen Rezeptoren wie bei Honigbienen durch verschiedene Zytoskelett-Bestandteile wie beispielsweise Aktin stabilisiert wird. Für weitere Spekulationen über Proteine, die an der Biomineralisation der eisenhaltigen Magnetrezeptoren beteiligt sein können, fehlt momentan meiner Einschätzung nach die Basis.

3.4.2.3 Zeitpunkt des Aufbaus der eisenhaltigen Magnetrezeptoren bei Hühnern

Dass der Schnabel am Tag des Schlupfes noch keinerlei eisenhaltige Strukturen enthält außer natürlich in roten Blutkörperchen, könnte dadurch erklärt werden, dass das gesamte Eisen, welches innerhalb des Eies vorhanden ist, z. B. für die Erythrozyten im Blut gebraucht wird. Voraussetzung für die Notwendigkeit zur Orientierung ist außerdem auch bei Nestflüchtern ein gewisser Bewegungsradius. In den ersten Tagen können Hühner keine weiten Strecken bewältigen. Sie sind ab dem 10. Tag in der Lage, ihre Körpertemperatur selbst konstant zu halten. Erst dann verlassen sie ihre Mutter zeitweise, da sie nicht mehr darauf angewiesen sind, sich in der Nähe der wärmenden Mutter aufzuhalten (Rogers 1995). In Versuchen mit künstlichen kleinen, lokalen magnetischen Anomalien, in denen sowohl die Richtung als auch die Intensität des Magnetfeldes manipuliert wurde, ist eine Orientierung nach dem Magnetfeld ab diesem 10. Tag möglich (Denzau et al. 2011). In diesem Zeitraum beginnt allerdings erst die Synthese der eisenhaltigen Dendriten, die ich als Magnetrezeptoren betrachte. Dies führt zu der Frage, ob sich die Hühnerküken in diesem Versuch mit dem Schnabel magnetisch orientieren. Ich halte das für unwahrscheinlich, da in

³¹ Hier wird Eisen über das Blutplasma in Transferritin transportiert und anschließend in Ferritin oder Hemosiderin, einem weiteren Protein mit Eisendepot, in den Zellen gespeichert. Daraufhin wird Ferritin mit speziellen Ferritin-Rezeptoren in den Zahnschmelz gebracht (Mataki et al. 1991).

diesem Alter nur eine geringe Zahl von eisenhaltigen Magnetrezeptoren angelegt ist. In dem Versuch von Denzau et al. (2011) könnte die gestellte Aufgabe auch mit dem Magnetkompass im Auge gelöst werden, da in dem Versuch auch zwangsläufig die Richtung des Magnetfelds verändert wird. Cry1a, das potenzielle Rezeptormolekül des Magnetkompasses, ist bereits am 5. Tag in den Violett-Zapfen der Hühner vorhanden, und sie können den Kompass ab Tag 8 verwenden (Denzau et al. 2013). Juvenile Enten (*Anas platyrhynchos domestica*) im Alter von 5-20 Tagen konnten in Versuchen das Magnetfeld weiterhin zur Orientierung nutzen, obwohl ihnen der Schnabel betäubt wurde (Freire & Birch 2010). In denselben Versuchen konnten sie das Magnetfeld allerdings auch noch wahrnehmen, wenn das rechte Auge abgedeckt wurde. Es ist nicht untersucht, ab welchem Alter die Verarbeitung des Magnetkompasses bei Enten lateralisiert ist. Bei Hühnern ist der Magnetkompass am 12. Tag bereits lateralisiert (Rogers et al. 2008), bei Rotkehlchen dauert dies bedeutend länger (Gehring et al. 2012). Ich könnte mir vorstellen, dass die Tiere im Versuch von Freire & Birch (2010) die ihnen gestellte Aufgabe vielleicht doch mit dem Magnetkompass im Auge lösten.

Weshalb werden die eisenhaltigen Magnetrezeptoren so spät angelegt, obwohl die Ausbildung des trigeminalen Nervensystems bei Schlupf abgeschlossen ist (Zfg. Davies 1988, Moody et al. 1989)? Und warum sollte das Eisen erst gespeichert und nicht gleich in die Magnetrezeptoren eingebaut werden? Das Gehirn ist noch bis zum 12. Tag nach Schlupf großen Veränderungen unterworfen (Rogers 1995). Ab diesem Zeitpunkt wird erstes Eisen in die Magnetrezeptoren eingelagert. Cry1a ist hingegen bereits ab dem 5. Tag in den UV/V-Rezeptoren enthalten (Denzau et al. 2013). Die Lage bzw. Anordnung ist für die Verarbeitung jedes Rezeptorsystems von ausschlaggebender Bedeutung. Beim cryptochrom-basierten Magnetkompass sind die cry-positiven UV/V-Rezeptoren gleichmäßig über das Auge verteilt, und die genaue Lage und somit Ausrichtung der einzelnen Rezeptorzelle ergibt sich durch die visuelle Verarbeitung. Visuelle Vorgänge, beispielsweise bei der Futtererkennung, sind erst ab dem 8. Tag lateralisiert (Rashid & Andrew 1989, Vallortigara & Andrew 1991), folglich werden bis dahin auch noch verarbeitende Vorgänge im Gehirn modifiziert. Beim eisenmineral-basierten System hingegen gibt es kein bekanntes Referenzsystem, welches die Lage der einzelnen Strukturen miteinander in Beziehung setzt. Für mich ist vorstellbar, dass ein früheres Anlegen der eisenhaltigen Magnetrezeptoren deshalb nicht von Nutzen ist, da das Gehirn zu diesem Zeitpunkt noch zu sehr im Umbau begriffen ist und die Information der einzelnen Rezeptoren nicht sinnvoll miteinander verrechnet, da sie noch nicht in Beziehung zueinander gesetzt werden können. Küken, die am 5. Tag auf eine magnetische Richtung trainiert werden, können nach einem erneuten Training an Tag 12 die Aufgabe immer noch nicht lösen. Hingegen Hühner, die an Tag 12

Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel: **Diskussion Entwicklung**

das erste Mal damit konfrontiert werden, können sowohl an Tag 12 als auch an Tag 19 sich das Magnetfeld zu Nutze machen (Denzau et al. 2013). Diese Aufgabe ist eine Richtungsdressur und wird so vermutlich mit dem Magnetkompass gelöst, der Versuch zeigt aber, dass der Lernvorgang selbst langfristige Folgen hat.

Hühner erkunden ab dem 10. Tag ihre Umgebung, und die Karte wird vermutlich ab dieser Zeit angelegt. Erst ab jetzt braucht das Küken seine eisenhaltigen Magnetrezeptoren. Für mich wäre vorstellbar, dass bereits im Vorfeld ein Depot aus Eisen in Form der eisenhaltigen Makrophagen im Schnabel angelegt wird, um ab dem 10. Tag die Bildung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren zu beschleunigen. Möglicherweise wäre eine frühere Bildung bei dem oben beschriebenen Lernvorgang für die Entwicklung der verarbeitenden Strukturen im Gehirn von Nachteil.

3.5 Diskussion der eisenmineral-basierten Magnetrezeption

3.5.1 Gibt es wirklich eisenhaltige Dendriten?

2012 wurde von Treiber und Kollegen angezweifelt, dass es eisenhaltige Dendriten im Schnabel von Tauben gibt. Sie konnten ausschließlich eisenhaltige Makrophagen finden und schlossen daraus, dass es sich bei der Beschreibung der eisenhaltigen Dendriten von Fleissner et al. (z. B. 2003) um einen Irrtum handelt. Für ihre Studie haben Treiber et al. (2012) eine sehr große Anzahl von Tauben auf alle eisenhaltigen Zellen hin untersucht, die im Gewebe des Oberschnabels vorliegen. Sie haben (1) große individuelle Unterschiede in der Anzahl von eisenhaltigen Zellen oder Zellbestandteilen ausmachen können, konnten aber keine Anreicherung von eisenhaltigen Zellbestandteilen im Bereich der sechs Felder finden, die bilateral im Schnabel bei Tauben beschrieben wurden. (2) Sie konnten keine Kolokalisation von berliner-blau-gefärbten Zellbestandteilen und Neurofilament nachweisen und hielten zudem fest, dass eine Vielzahl von den eisenhaltigen Strukturen einen Zellkern besaßen. Hiermit scheidet diese als Dendriten aus, da der Dendrit als Plasmafortsatz der Zelle anatomisch keinen Zellkern enthält. (3) Sie konnten auch im Elektronenmikroskop nicht die von Fleissner et al. (2003) beschriebenen ultrastrukturellen Details der eisenhaltigen Magnetrezeptoren beobachten. Sie zogen daraus den Schluss, dass es keine eisenhaltigen Dendriten im Schnabel gibt und es sich bei den in der Literatur als solche beschriebenen Zellbestandteilen um eisenhaltige Makrophagen handelt.

Ich habe in meiner Arbeit zwar keine Tauben untersucht, konnte jedoch bei Hühnern die gleichen eisenhaltigen Dendriten finden, wie sie bereits von Fleissner et al. (2003, 2007a) für Tauben beschrieben wurden. Auch habe ich dieselben Techniken verwendet wie Fleissner et al. (2003, 2007a) und mit geringen Modifikationen auch wie Treiber et al. (2012).

Zu Punkt (1): Ich konnte bei Hühnern keine sechs bilateral angeordneten Felder ausmachen, wie sie bei Tauben gefunden wurden, sondern nur Bereiche eingrenzen, in denen Felder von eisenhaltigen Dendriten vorkommen. Ich kann nicht sagen, ob es sich hierbei um einen Artunterschied zwischen Tauben und Hühnern handelt, ob die von Fleissner et al. (2003, 2007a) untersuchten Tauben genetisch eine Festlegung auf diese Felder haben oder ob Treiber et al. (2012) die Felder übersehen haben. Auch die Anzahl der eisenhaltigen Dendriten ist bei Hühnern individuell verschieden, allerdings nicht in dem von Treiber et al. (2012) beschriebenem Maße. Auch habe ich keine so hohe Streuung innerhalb des gesamten Schnabels ausmachen können, sondern die eisenhaltigen Dendriten auf die Subkutis beschränkt gefunden. Ich denke, dass die extrem hohe Streuung in der Anzahl der eisenhaltigen Zellen bei Treiber et al. (2012) von der Anzahl der Makrophagen abhängt, die

natürlich auf Grund ihrer Eigenschaft als Teil des Immunsystems stark variiert. Ich habe keine Strukturen mit in die Auswertung einbezogen, die nicht in Nervengewebe liegen, so auch keine Makrophagen. Ich habe Makrophagen immer im Bindegewebe gefunden, welches durch seine 'schwammartige' Struktur auch ohne eine entsprechende Gegenfärbung deutlich zu erkennen ist. Treiber et al. (2012) unterscheiden keinerlei Gewebetypen, was eine Auswertung im Schnabel sehr erschwert.

Ein zweites Problem könnte sich daraus ergeben, dass Treiber et al. (2012) versucht haben, die Felder der eisenhaltigen Dendriten mittels einer automatischen Dokumentation zu finden. Dies hat offensichtlich aber nicht funktioniert. Ich denke, das ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass Treiber et al. vorab nicht zwischen eisenhaltigen Dendriten und eisenhaltigen Makrophagen unterschieden haben und so auch keine Kriterien dafür aufgestellt haben, welche eisenhaltigen Strukturen sie in ihrer Endauswertung betrachten. Eine automatische Dokumentation ist prinzipiell sehr anfällig für Fehler, da Artefakte und andere Zelltypen wie Makrophagen erst einmal nicht als solche erkannt werden. Treiber et al. verwendeten für die automatische Dokumentation Schnäbel, die vorher in Paraffin eingebettet waren. Auch ich habe versucht, die Felder mittels einer automatischen Dokumentation aufzufinden, bin aber ebenso auf technische Schwierigkeiten gestoßen, da eisenhaltige Artefakte oder Makrophagen leichter erkannt werden können als die feinen eisenhaltigen Dendriten. Ich habe hierfür neben in Paraffin auch welche verarbeitet, die in Kunststoff (Technovit 7100) eingebettet waren. Dieser Kunststoff ermöglicht es, die eisenhaltigen Strukturen nach der Berliner-Blau-Färbung leichter zu erkennen, da weniger Kontrast im eigentlichen Gewebe besteht und sich so die Blaufärbung besser hervorhebt. Auch enthalten die Proben weniger Artefakte der Berliner-Blau-Reaktion, eventuell deshalb, weil bei dieser Einbettungs-Methode die Chemikalien, die beispielsweise die für die Einbettung notwendige Dehydrierung bewirken, nicht mehrfach verwendet werden. Ich denke, so könnte dieses Verfahren eher zum Ziel führen, bin aber nicht sicher, ob es möglich ist, zwischen Magnetrezeptoren und Artefakten oder eisenhaltigen Makrophagen zu unterscheiden. Kriterium für eine solche Unterscheidung kann meines Erachtens nur die Kolokalisation mit einer Neurofilamentfärbung sein.

Zu Punkt 2: Ich konnte die Existenz von eisenhaltigen Bestandteilen in Nerven, also kolokalisiert mit Neurofilament, und ohne Zellkern, also nicht kolokalisiert mit Kernechtrot, bei Hühnern bestätigen. Ich komme aber auch zu dem Schluss, dass die Untersuchungen an diesen Dendriten technisch sehr schwierig sind. Die Neurofilament-Immunfärbung wird schwächer, wenn auch eine Berliner-Blau-Reaktion vorliegt. Außerdem sind Dendriten von Natur aus die feinsten Nervenfasern und lassen sich so am schwersten anfärben. Ebenso ist die Darstellung einer Struktur ohne Zellkern im Gewebe eine Herausforderung, da sich

überall Zellkerne befinden und Kernechtrot eine nicht sehr hoch differenzierte klassische histologische Färbung ist. Ebenso habe ich beschrieben, dass auch bei adulten Hühnern öfter eisenhaltige Makrophagen neben eisenhaltigem Nervengewebe vorkommen. Hierbei ist die histologische Kenntnis des Gewebes ein unabdingbarer Faktor für die Auswertung. Fleissner et al. (2003) beschreiben als ein Unterscheidungsmerkmal eine gekörnte Struktur der eisenhaltigen Dendriten, die die Kugeln der eisenhaltigen Magnetrezeptoren abbilden. Allerdings muss beachtet werden, dass das Reaktionsprodukt der Berliner-Blau-Färbung prinzipiell Eisen in Cluster einbaut (Buser et al. 1977) und dass dies allein kein sicheres Unterscheidungsmerkmal darstellt. Auch hier ist wieder festzustellen, dass sich eisenhaltige Makrophagen von eisenhaltigen Dendriten nur durch die elektronenmikroskopische und/oder immunhistologische Identifizierung von Nervengewebe und Zellkernen unterscheiden lassen.

Zu Punkt (3): Treiber et al. (2010) haben eine etwas andere Technik angewendet, um Schnitte für das Elektronenmikroskop zu bekommen: Sie haben abwechselnd Ultradünnschnitte und Semidünnschnitte hergestellt und sich die Ultradünnschnitte angesehen, wenn sie im benachbarten Semidünnschnitt eine Berliner-Blau-Reaktion bekommen haben. Problematisch daran ist, dass die Schnitte dann maximal eine Fläche von 1 x 1 mm haben können, was, wenn man den ganzen Schnabel betrachtet, nicht viel ist. Ich habe ebenfalls in Semidünnschnitten eine Region ausgesucht, in der ich eisenhaltige Dendriten gefunden habe, habe aber die Semidünnschnitte von der gesamten Schnabelhaut gemacht. Dies erhöht die Chance erheblich, eisenhaltige Dendriten zu treffen. Ich habe dann einen ungefärbten Semidünnschnitt der entsprechenden Region wieder aufgenommen und in Ultradünnschnitte zerteilt. Ich hatte dann ca. 100 Ultradünnschnitte pro Semidünnschnitt von der entsprechenden Region, und es war trotzdem immer noch ein beträchtlicher Aufwand, die Strukturen zu finden. Ich denke, eisenhaltige Dendriten im Elektronenmikroskop zu finden, ohne vorab den gesamten Schnabel betrachtet zu haben, ist fast unmöglich.

Da ich bei Hühnern die von Fleissner et al. (2003) für Tauben beschriebenen eisenhaltigen Dendriten im Schnabel finden konnte, schließe ich, dass sie auch bei Tauben existieren und Treiber et al. (2012) sie übersehen haben. Obwohl ich einige technische Schwierigkeiten beim Auffinden dieser Strukturen sehe (s. o.), habe ich keine befriedigende Erklärung, warum Treiber et al. (2012) zu dem Schluss kommen, dass die von Fleissner et al. (2003) beschriebenen Strukturen eisenhaltige Makrophagen seien. Meiner Meinung nach hätten Treiber et al. ihre Färb- und vor allem Auswerttechniken weiter an das bestehende Problem anpassen müssen, sie wären dann sicherlich zu einem anderen Schluss gelangt.

3.5.2 Wofür nutzen Hühner eisenhaltige Magnetrezeptoren?

Eine andere generelle Frage ist allerdings, wofür Hühner überhaupt eisenhaltige Magnetrezeptoren brauchen. Es wird angenommen, dass die eisenhaltigen Dendriten im Schnabel die Intensität des Magnetfeldes messen, die ein Faktor der Gradientenkarte ist (R. Wiltschko et al. 2010a). Die Intensität des Magnetfeldes stellt eine Komponente der Karte da, die bei Tauben zur Navigation über weitere Strecken verwendet wird (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Allerdings können Tauben mit eingeschränkter Sicht eventuell mit magnetischen Faktoren in die direkte Nähe ihres Schlags fliegen (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2003). Aber wofür nutzen Hühner diese Karte und somit den Magnetrezeptor im Schnabel, sie legen ja gewöhnlich keine so großen Strecken zurück? Der Schwerpunkt in der Orientierung bei Hühnern bezieht sich auf ihren Heimbereich, für den bei Tauben angenommen wird, dass sie hier die Mosaikkarte verwenden (bei Tauben ca. 6 km - 10 km um den Heimschlag, Schiffner 2010). Wenn Hühner auch in ihrem Heimbereich magnetische Faktoren in einer Karte für die Orientierung verwenden, sollten kleinste Änderungen des lokalen Magnetfeldes wahrgenommen werden können. Für mich wäre denkbar, dass die große Anzahl der Felder der eisenhaltigen Dendriten und auch die große Anzahl der eisenhaltigen Dendriten pro Feld einen Einfluss auf die Sensitivität dieses Systems haben. Auch stellt sich die Frage, ob die Besonderheit bei den Hühnern, dass es Felder von eisenhaltigen Magnetrezeptoren gibt, innerhalb deren verschiedene Raumrichtungen abgedeckt sind (triangelförmige Anordnung der einzelnen Dendriten), in ähnlicher Weise interpretiert werden kann. Es ist unklar, wie diese besondere Anordnung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren untereinander verschaltet ist. Für die Felder, die jeweils in einer der drei Achsen angeordnet sind, wird angenommen, dass sie in der jeweiligen Ebene den Magnetfeldvektor messen und durch die Verrechnung der Ergebnisse der verschiedenen ausgerichteten Felder der gesamte Magnetfeldvektor wahrgenommen wird. Das könnte auch für ein einzelnes Feld gelten, in dem alle Raumrichtungen abgedeckt sind. Allerdings bleibt unklar, inwieweit es vorteilhaft wäre, diese Informationen innerhalb eines Feldes zu verrechnen, da dies ja laut Modell (Fleissner et al. 2007a) bereits aus den anderen Feldern zusammengenommen abgeleitet werden kann.

3.6 Ausblick

3.6.1 Methodische Erweiterungsvorschläge zur Analyse der Funktionsweise des eisenhaltigen Magnetrezeptors

Es gibt mehrere Schwierigkeiten beim Nachweis der eisenhaltigen Magnetrezeptoren. So reagiert z. B. das DAB, welches als Substrat zur Visualisierung der Immunmarkierung dient, mit der Berliner-Blau-Reaktion, und die beiden Färbungen sind nicht mehr klar abgegrenzt (siehe z. B. Abb. 3.5). Ich schlage vor, die Immunfärbung durch einen sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, zu visualisieren, so dass es hier nicht mehr zu einer weiteren chemischen Reaktion kommt. Als ein weiteres Problem sehe ich die mangelnde Spezifität der Kernechtrotfärbung zum Nachweis von Zellkernen. Es werden immer auch andere Strukturen rot angefärbt. Eine sehr spezifische Färbung der Zellkerne kann durch den DNA-Fluoreszenzmarker DAPI (Diamidin-Phenylindol) erzielt werden, der auch bei Vögeln funktioniert. Diese Gegenfärbungen würden sich auch nicht störend auf die Auswertung der Berliner-Blau-Reaktion auswirken, da sie erst durch Fluoreszenz mit bestimmten Filtern sichtbar werden und das Blau des Eisennachweises nicht überdecken.

Attraktiv wäre ein direkter Nachweis, dass es sich bei den dargestellten Strukturen um afferente sensorische Dendriten handelt. Dies könnte prinzipiell mit guten Antikörpern gegen Neurofilament und deren elektronenmikroskopischem Nachweis gelingen. Allerdings sind Immunfärbungen für das Elektronenmikroskop sehr aufwendig und schwierig umzusetzen. Speziell in diesem Fall sollte man eine Färbung nach der Einbettung machen, da die eisenhaltigen Dendriten vorab identifiziert werden müssten. Diese Methode führt allerdings häufig nicht zum Erfolg.

Eine Kartierung der Felder der eisenhaltigen Dendriten könnte Aufschluss über die Verarbeitung geben, und interessant wäre auch zu wissen, wie genau sie dann an das zentralnervöse System angebunden sind.

3.6.2 Korrelation zwischen der Wahrnehmung des Magnetfeldes bei juvenilen Hühnern im Verhalten und dem Aufbau der Magnetrezeptoren

In Hinblick auf juvenile Hühner wäre es interessant zu testen, ob 10 Tage alte Hühner die ihnen gestellte magnetische Aufgabe im Verhaltensversuch (Denzau et al. 2011) mit den Magnetrezeptoren im Schnabel oder denen im Auge lösen. Cry1a ist bereits am 5. Tag in den violetten Zapfen der Hühner nachweisbar. Im Schnabel sind in dieser Entwicklungs-

phase allerdings nur einzelne eisenhaltige Dendriten zu finden. Bei beiden Systemen ist nicht bekannt, ab wann die neuronalen Strukturen im Gehirn, die für die Verarbeitung zuständig sind, funktionsfähig sind. Im Verhaltensversuch kann man eine Störung des Magnetkompasses mittels einer Behandlung mit Hochfrequenzfeldern oder alternativ eine Störung des 'Magnetometers' durch Betäuben der Schnabelhaut erzeugen. Können die Hühner unter einer der zwei Bedingungen die magnetische Aufgabe nicht mehr lösen, würde klar, auf welchen Rezeptor sie dabei zurückgreifen. Benutzen sie dafür wirklich die Rezeptoren im Schnabel, sollten die individuell getesteten Hühner histologisch auf die Anzahl der eisenhaltigen Magnetrezeptoren untersucht werden. Die Korrelation der Anzahl der eisenhaltigen Magnetrezeptoren mit einem Funktionieren des Rezeptorsystems, erkennbar an der Verhaltensantwort der Tiere, könnte Aufschluss über die Funktionsweise der eisenhaltigen Magnetrezeptoren liefern. Wird das System durch mehr eisenhaltige Dendriten genauer?

Daran anknüpfend stellt sich mir die Frage, wann bei juvenilen Tauben eisenhaltige Magnetrezeptoren angelegt werden. Hühner sind Nestflüchter, Tauben dagegen Nesthocker. Der Vergleich der beiden Arten könnte zeigen, ob der Zeitpunkt der Entwicklung dieser Magnetrezeptoren etwas mit den äußeren Bedingungen bzw. mit der Lebensweise zu tun hat. Allerdings werden die eisenhaltigen Magnetrezeptoren meines Erachtens bei Hühnern eher spät angelegt (ab dem 10.Tag); deswegen erwarte ich keine Unterschiede in der Entwicklung.

4 Allgemeine Diskussion

4.1 Die zwei Magnetrezeptoren der Vögel

Die Klasse der Vögel ist mit circa 9600 Arten die artenreichste innerhalb der Landwirbeltiere. In den letzten 60 Jahren konnte bei über 20 Arten aus 4 Ordnungen nachgewiesen werden, dass sie über einen Magnetkompass verfügen. Hierzu gehören Vogelarten verschiedener Kontinente wie Rotkehlchen und australische Brillenvögel, aber auch Zugvögel, die zu unterschiedlichen Tageszeiten ziehen, und nichtziehende Vogelarten wie Tauben oder Hühner. Dies zeigt, dass Vögel unabhängig von ihrer Lebensweise und unabhängig vom Zug unter anderem über einen Magnetkompass zur Orientierung verfügen (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007; siehe auch Abb. 4.1). Bei Tauben und Singvögeln konnten dazu auch verhaltensbiologische Hinweise auf das 'Magnetometer' der Vögel erbracht werden, mit dem die Vögel vermutlich die Intensität des Magnetfeldes wahrnehmen und deren Verlauf Teil der Karte ist (W. Wiltschko et al. 1994, Munro et al. 1997, W. Wiltschko et al. 1998, R. Wiltschko et al. 2010a). Unter dem Begriff der Karte stellt man sich eine innere mentale Repräsentation von äußeren Faktoren vor, durch die ein Bezug vom aktuellen Standort zum jeweiligen Ziel hergestellt werden kann (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999b). Sowohl Tauben als auch Rotkehlchen gehören systematisch zu den Neoaves; sie haben sich in der späten Kreide, also vor circa 75 Millionen Jahren, von einander abgespalten. Die Neoaves und die Galloanseres, zu denen unter anderem die Hühner gehören, sind unter den Vögeln nur weitläufig miteinander verwandt; sie haben sich bereits vor 95 Millionen Jahren voneinander getrennt (Abb. 4.1; Ericson et al. 2006).

4.1.1 Struktur der Magnetrezeptoren bei verschiedenen Vogelarten

Den Magnetkompass der Vögel charakterisiert, dass es sich um einen Inklinationskompass handelt, dass er nur in einem bestimmten Fenster bezüglich der Intensität funktioniert und dass er einem Radikalpaar-Mechanismus unterliegt. Getestet wurden bei den verschiedenen Vogelarten selten alle dieser Charakteristika, allerdings gibt es bislang keine Vögel, die andere Funktionsweisen des Magnetkompasses zeigen (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007). Rotkehlchen und Hühner sind die beiden Vogelarten, die ich in meiner Arbeit auf das Vorkommen von Cry1a untersucht habe. Für beide Arten ist nachgewiesen, dass ihr Magnetkompass ein funktionales Fenster bezüglich der Intensität hat und auf einem Radikalpaar-Mechanismus basiert (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007, W. Wiltschko et al. 2007a). Das potenzielle Rezeptormolekül des Magnetkompasses Cry1a ist bei den beiden untersuchten Vogelarten, Rotkehlchen und Hühnern, an die Diskmembranen der UV/V-

Zapfen gebunden. Die Dichte der UV-Zapfen der Rotkehlchen ist höher als die der V-Zapfen der Hühner, die Verteilung innerhalb der Retina ist aber bei beiden Arten gleichmäßig. Somit gibt es zwischen den beiden untersuchten Vogelarten keine Unterschiede in der Lokalisation, Verteilung und Ultrastruktur des cry-basierten potenziellen Magnetrezeptors.

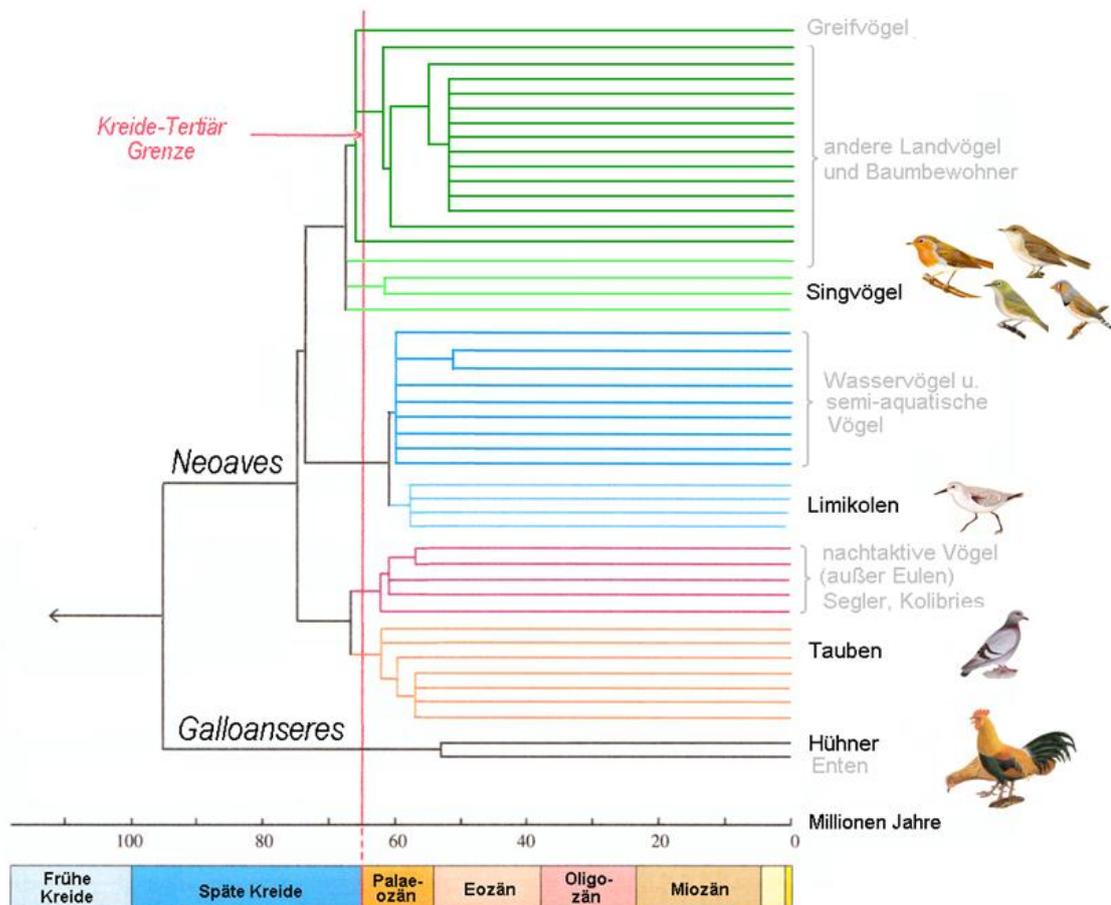


Abb. 4.1 Stammbaum der rezenten neognathen Vögel. Unten sind die verschiedenen erdgeschichtlichen Zeitalter aufgetragen, und oben ist dazu die Abspaltung der verschiedenen taxonomischen Gruppen der Vögel in Bezug gesetzt. Die Vögel teilen sich systematisch in die Palaeognathae und die Neognathae. Zu den Palaeognathae gehören beispielsweise die Straußenvögel und die Emus (Rheidae) so wie die Kiwis (Apterygidae, nicht gezeigt). Die Neognathae teilen sich wiederum in die Galloanseres mit den Hühnervögeln (Galliformes) und den Gänsevögeln (Anseriformes) und die Neoaves, zu denen 95% aller zurzeit lebenden Vogelarten gehören. Die Neoaves teilen sich ihrerseits in die Metaves und die Cornaves. Zu den Metaves gehören zwei Gruppen, der einen sind systematisch die Tauben (Columbidae) zuzuordnen, der zweiten unter anderem die Kolibris (Trochilidae). Die Cornaves beinhalten die Gruppe der Watvögel, die Gruppe der aquatischen und semiaquatischen Vögel und die Gruppe der terrestrischen und baumbewohnenden Vögel, zu denen dann auch die Sperlingsvögel gehören (Abbildung aus Ericson et al. 2006, mit Ergänzungen von R. Wiltschko). Die Bilder der Vögel zeigen von links nach rechts und von oben nach unten Rotkehlchen, Gartengrasmücke, australischer Brillenvogel, Zebrafink, Sanderling (*Calidris alba*), Taube und Huhn. Bei diesen Arten wurde ein Magnetkompass nachgewiesen (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007).

Der Magnetrezeptor des 'Magnetometers' ist dadurch charakterisiert, dass er eisenmineralbasiert ist, durch den ophthalmischen Ast des Trigemini übertragen wird und die so gewonnene Information Eingang in die Karte findet (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Diese Charakteristika lassen sich (1) durch einen magnetischen Puls testen, der Eisenmineralteilchen ummagnetisiert, (2) durch Betäuben oder Durchtrennen des ophthalmischen Nervs oder (3) indirekt durch Verhaltensversuche in künstlichen oder natürlichen magnetischen Anomalien. Gepulst wurden Singvögel, wie australische Brillenvögel und Reisstärliche, und auch Tauben. Bei denselben Vogelarten gelangen durch Betäuben oder Durchtrennen des Nervs auch Nachweise, dass der ophthalmische Nerv beteiligt ist und dass diese Information in die Karte Eingang findet (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Bei der von mir untersuchten Vogelart, nämlich Hühnern, gibt es verhaltensbiologisch lediglich Versuche, die zeigen, dass Hühner magnetische Anomalien wahrnehmen können (Denzau et al. 2011), auf welche Weise, ist aber nicht untersucht. Allerdings weisen auch beim 'Magnetometer' wie beim Magnetkompass keine Ergebnisse darauf hin, dass es Unterschiede in der Funktionsweise dieses Sinnesorgans gibt; diese Aussage stützt sich jedoch auf deutlich weniger Versuche als beim Magnetkompass (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Die Struktur der eisenhaltigen Magnetrezeptoren unterscheidet sich in der Ultrastruktur zwischen Tauben (Fleissner et al. 2003) und Hühnern nicht. So haben beide den gleichen Aufbau mit einem Vesikel, Plättchen und Kugeln. In der Anordnung der Strukturen im Schnabel gibt es wie beim Cry1a im Auge gewisse Abweichungen in der Zahl, allerdings beim eisenhaltigen Magnetrezeptor auch in der Anordnung. Die Eisenoxid-Zusammensetzung ist bei Singvögeln, Tauben und Hühnern dieselbe (siehe auch Falkenberg et al. 2010).

Die strukturellen Details so wie die funktionellen Merkmale beider Magnetrezeptoren stimmen zwischen den verschiedenen getesteten Vogelarten überein. Tauben und Singvögel haben sich ja bereits vor 95 Millionen Jahren von den Hühnern abgespalten und sind so nur noch weitläufig mit ihnen verwandt (Ericson et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei beiden Magnetrezeptoren um sehr einheitliche und alte Rezeptor-Systeme handelt.

4.1.2 Mögliche Interaktionen der beiden Magnetrezeptoren

Es stellt sich die Frage, ob die beiden Magnetrezeptoren der Vögel in ihrer Verarbeitung miteinander interagieren. Der chemische Kompass kann die Intensität des Magnetfeldes vermutlich nicht genau genug ermitteln, obwohl wahrscheinlich je nach Intensität des Magnetfeldes unterschiedliche Muster auf der Retina entstehen (Ritz et al. 2000). Tauben können Intensitätsunterschiede des Magnetfeldes von circa 20 nT wahrnehmen (Keeton et al. 1974, Schiffner & Wiltschko 2011), und das biologische Fenster des Magnetkompasses,

in dem die Differenzen im entstehenden Muster nicht zu Unterschieden in der Interpretation führen, dehnt sich auf 20% - 30% Abweichung aus, also beispielsweise in Frankfurt auf bis zu ± 6900 nT (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2005). Es bleibt folglich unklar, ob dazwischenliegende Mustertypen auch auf Intensitätsunterschiede ausgewertet werden könnten, darauf gibt es allerdings bislang keine Hinweise.

Der eisenmineral-basierte Magnetrezeptor könnte theoretisch auch Richtungen des Magnetfelds messen (Fleissner et al. 2007a, Solovyov & Greiner 2007). In einer sehr unnatürlichen Situation passiert das auch, nämlich bei den sogenannten Fixrichtungen, die durch verschiedene monochromatische oder bichromatische Lichtbedingungen bei Rotkehlchen in Laborversuchen ausgelöst werden (siehe auch Abschnitt 2.1.1.3). Diese Fixrichtungen könnten Hinweise darauf liefern, ob Magnetkompass und 'Magnetometer', obwohl sie zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige Funktionen haben, eventuell miteinander interagieren. Die Fixrichtungen unterscheiden sich in ihrer Richtung, je nachdem, von welcher monochromatischen bzw. bichromatischen Lichtbedingung sie ausgelöst wurden (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Da es im Moment keine Hinweise darauf gibt, dass das 'Magnetometer' im Schnabel selbst lichtempfindlich ist, gehe ich davon aus, dass diese Unterschiede durch das cryptochrom-basierte System im Auge oder dem Sehprozess an sich bedingt werden. Allerdings gibt es kein erkennbares Muster, wie die Verarbeitung der Systeme zusammenhängen könnten. Desorientierung beispielsweise kommt unter gelbem und rotem Licht niedriger Intensität zustande (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Unter rotem Licht ist kein lichtaktiviertes Cry1a vorhanden, unter Gelb allerdings schon. Eventuell ist die Verarbeitung des Signals unter Gelb anders als unter anderen Wellenlängen des Lichts, da sich gelbes Licht in Verbindung mit anderen Lichtern störend auswirkt, aber unter Gelb allein sich Rotkehlchen nicht orientieren (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b). Eine Sonderstellung von gelbem Licht erklärt jedoch nicht, warum im Dunkeln wiederum eine Fixrichtung und keine Desorientierung zustande kommt (Zfg. R. Wiltschko et al. 2010b), obwohl hier wie in Rot kein lichtaktiviertes Cry1a vorliegt. Vielleicht kommen Fixrichtungen zustande, wenn das zentrale Nervensystem oder die entsprechenden Areale im Gehirn erkennen, dass vom cryptochrom-basierten System kein auswertbares Signal mehr kommt, und Desorientierung, wenn zwar theoretisch der Radikalpaar-Mechanismus funktionieren sollte, aber beispielsweise durch oszillierende Felder gestört wird. Für mich ist aber im Moment nicht ableitbar, welche Faktoren dazu führen, dass eine Störung erkannt wird, und welche nicht. Eventuell hat dies auch nichts mit dem Cryptochrom selbst zu tun, sondern mit dem Sehprozess an sich, da Fixrichtungen zwar in ihrer Richtung variieren, sich aber nicht durch die Zugabe von oszillierenden Feldern verändern. Allerdings ist unklar, wie

der Sehprozess die Verarbeitung des magnetischen Signals beeinflusst, da ein visuelles Signal allgemein unter allen monochromatischen Bedingungen zustande kommt.

Insgesamt scheint die Verarbeitung von Information aus dem eisenmineral-basierten System keine Information bereitzustellen, die zum Auffinden der Zugrichtung verwendet werden kann. Allerdings beeinflusst Licht diese Verarbeitung, und bei der Auswertung von Richtungen aus dem eisenmineral-basierten System kommt es zu Interaktionen mit der Auswertung von Information aus dem Auge. Keine Hinweise gibt es darauf, ob es eine Interaktion der Systeme gibt, wenn vom eisenmineral-basierten System Informationen über die Intensität des Magnetfeldes abgerufen werden. Aus Versuchen mit juvenilen Vögeln kann man schließen, dass der Magnetkompass nicht gestört wird, wenn der eisenmineral-basierte Rezeptor gepulst ist, also veränderte Informationen liefert, da diese Vögel, die noch keine Karte besitzen, keine Abweichung von ihrer Zugrichtung zeigen (siehe auch Abschnitt 3.1.3, Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 2012). Daraus kann man schließen, dass es keinen Einfluss des eisenmineral-basierten Systems auf die Verarbeitung des Magnetkompasses gibt, obwohl der eisenmineral-basierte Magnetrezeptor theoretisch Richtungen wahrnehmen könnte (Solovyov & Greiner 2007).

4.1.3 Evolution der Magnetrezeptoren

Weder das Magnetometer noch der Magnetkompass sind in ihrer Spezialisierung und Funktionsweise bei anderen Wirbeltieren verbreitet, auch nicht bei den Reptilien, den nächsten Verwandten der Vögel (siehe unten). Bellrose (1972) ging davon aus, dass sich die Orientierungs-Mechanismen der Vögel zusammen mit dem Zug entwickelt haben. Es gibt mehrere Thesen, wie der Vogelzug entstand (Zfg. Salewski & Bruderer 2007). Jedoch unabhängig davon, ob der Vogelzug durch eine Erweiterung des Brutgebietes in günstiger gelegene Areale oder durch eine höhere Überlebenschance außerhalb der Brutsaison durch die Überwinterung in besser geschützten Gebieten entstand, stellt sich die Frage, wie Magnetkompass und Karte sich hierbei entwickelt haben könnten. Gegen die These, dass diese Mechanismen überhaupt eine Anpassung an den Vogelzug sind, spricht, dass auch Standvögel wie Hühner, Tauben und Zebrafinken über dieselben Orientierungs-Mechanismen verfügen wie Zugvögel (Zfg. W. Wiltschko & Wiltschko 2007). Auch sind die Orientierungs-Mechanismen unter den Vögeln so einheitlich, dass davon auszugehen ist, dass sie bereits von den Vorfahren der Vögel übernommen wurden und so schon vor dem Vogelzug existierten. Es ist zum einen vorstellbar, dass frühe Orientierung im Heimbereich durch Wegumkehr mit dem Magnetkompass bewerkstelligt wurde, woraus sich die Mosaikkarte und später auch die Gradientenkarte abgeleitet hätten (Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1999d). Für mich wäre allerdings auch vorstellbar, dass anfänglich im Heimbereich

die Orientierung an Landmarken zur Orientierung genügte und sich daraus die Mosaikkarte entwickelte. Erst als diese durch Gradienten erweitert wurde, wurde ein Kompass nötig, da die Gradientenkarte auch in Gebieten funktioniert, die dem Vogel unbekannt sind. Sollte das eisenmineral-basierte 'Magnetometer' das ältere System sein, stellt sich mir die Frage, warum damit dann heute keine Richtungen sinnvoll abgeleitet werden, wenn dies doch theoretisch möglich ist, und warum sich dann überhaupt noch der Magnetkompass entwickelte. Dies führt mich zu meiner Hypothese, dass der Magnetkompass das ältere System ist und dann erst der eisenmineral-basierte Rezeptor entstand. Vielleicht gibt hier eine Betrachtung der bei anderen Tieren bekannten Funktionsmechanismen von Magnetorientierung Aufschluss.

4.2 Magnetrezeption bei anderen Tieren

Magnetrezeption ist bei Vögeln am besten untersucht, allerdings gibt es bei recht vielen Tiergruppen Versuche, die zeigen, dass Vögel nicht die einzigen Tiere/Organismen sind, die sich am Magnetfeld orientieren. So besitzen auch Bakterien Magnetotaxis, um sich in der Sedimentschicht zu positionieren, die ihren Lebensansprüchen genügt. Allerdings handelt es sich hierbei um einen passiven Vorgang, der nicht mit Magnetrezeption zu verwechseln ist. Selbst tote magnetotaktische Bakterien richten sich noch am Magnetfeld aus (Zfg. Schüler 2008). Meine Versuche zur Zusammensetzung des Eisenoxids der Magnetosomen im Vergleich zur Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Dendriten im Schnabel von Hühnern haben gezeigt, dass es sich hierbei um unterschiedliche Eisenoxid-Zusammensetzungen handelt (siehe auch Abschnitt 3.4.1.3). Auch gibt es keine Proteine bei der Biomineralisation, die sich bei den beiden Organismen entsprechen (siehe auch Abschnitt 3.4.2.2 und Anhang 3.2). Es gibt also neben der fehlenden Verwandtschaft (Ciccarelli et al. 2006) vermutlich auch keine funktionellen Gemeinsamkeiten in der Synthese und Verwendung von Magnetit zur 'Magnetfeldmessung' zwischen Bakterien und Vögeln.

4.2.1 Magnetrezeption bei Reptilien

Mit den Vögeln am nächsten verwandt sind von den noch heute lebenden Arten die Krokodile. Vögel und Krokodile gehören zu den Archosauriern, zu denen unter anderem auch die ausgestorbenen Dinosaurier gehören. Rodda (1984) verfrachtete junge Krokodile (*Alligator mississippiensis*) aus unterschiedlichen Gebieten und untersuchte anschließend in einer Arena, welche bevorzugte Richtung sie einschlugen. Er testete zwei Gruppen, nämlich juvenile Tiere im ersten Lebensjahr und juvenile Tiere im zweiten Lebensjahr. Sie wurden auf unterschiedlich langen Wegen vom Ort, an dem sie gefangen genommen wurden, zum Versuchsort gebracht. Krokodile im ersten Lebensjahr bevorzugten die individuelle

Heimrichtung nur, wenn sie vorher auf einem relativ direkten Weg verfrachtet wurden. Wurden bei der Verfrachtung diverse Umwege eingebaut, wählten sie eine Richtung, die sie zum Wasser bringen würde. Dies wurde als einfache Kompassorientierung interpretiert, die vermutlich nicht magnetisch bedingt ist, da die Tiere den Himmel sehen konnten. Juvenile Krokodile im zweiten Jahr waren unter allen Bedingungen heimwärts gerichtet. Hierbei waren allerdings geringe Abweichungen von der Heimrichtung korreliert mit Schwankungen des Magnetfeldes, was meines Erachtens die Interpretation zulässt, dass Krokodile wie Vögel eine Karte besitzen, die vom Magnetfeld Informationen erhält. Bei den einjährigen Tieren, auch bei denen, die heimwärts gerichtet waren, konnte keine Korrelation von Magnetfeldschwankungen und Abweichungen von der Richtung gefunden werden, vielleicht weil diese wie junge Vögel noch keine Karte besitzen.

Neben den Krokodilen sind die Meeresschildkröten die einzigen Reptilien, bei denen Magnetorientierung bekannt und untersucht ist. In Florida schwimmen junge Meeresschildkröten (*Caretta caretta*) nach dem Schlupf in den Golfstrom. In diesem durchqueren sie den Nordatlantik und die Sargassosee und gelangen vorbei an Afrika wieder zurück nach Florida, wo sie geschlüpft sind. Um diesen Strom nicht versehentlich zu verlassen, benötigen sie ein geeignetes Orientierungssystem. Eine Karte, um Informationen über ihre Position in diesem Gewässer abzuleiten, aber auch ein Kompass, um Richtungen anzustreben, scheinen unerlässlich. In Studien wurden frisch geschlüpfte Schildkröten verschiedenen Magnetbedingungen ausgesetzt, die verschiedene Stellen auf ihrer Wanderung simulieren, die als Trigger fungieren. Diese Trigger wirken hier als Orientierungspunkte, an denen sie eine andere Richtung als davor anstreben, um auf ihrer Route zu bleiben. Im Experiment strebten sie ebenfalls verschiedene Richtungen an, die jeweils äquivalent zu denen waren, die sie in der Natur hätten einschlagen müssen (Zfg. Lohmann et al. 2012). Auf ihrer Wanderung gibt es alle möglichen Kombinationen aus unterschiedlichen Richtungen und Intensitäten des Magnetfeldes. Allerdings gibt es Punkte, die die gleiche Intensität, aber andere Richtungen aufweisen, und ebenso Stellen mit unterschiedlichen Intensitäten, aber identischer Richtung. Dies konnte im Versuch genutzt werden, um zu zeigen, dass Meeresschildkröten sowohl die Richtung als auch die Intensität des Magnetfeldes als Orientierungsfaktor benutzen (Lohmann & Lohmann 1994, 1996). Bekannt ist, dass ihr Magnetkompass ein Inklinationskompass ist, der allerdings kein Licht benötigt (Lohmann 1991). Pulsversuche zeigen, dass Magnetit an der Magnetrezeption der Schildkröten beteiligt ist; unklar ist allerdings, ob damit sowohl Richtung als auch Intensität wahrgenommen wird oder nur einer der Parameter wie bei Vögeln (Irvine & Lohmann 2005).

4.2.2 Magnetrezeption bei Säugetieren

Die Säugetiere stammen wie die Vögel von den Reptilien ab. Sambische Graumulle (*Fukomys amatus*) bauen ihr Nest in einer runden Arena bevorzugt im Südosten. Dieses Verhalten kann in Versuchen genutzt werden. So konnte gezeigt werden, dass der Magnetkompass der Sambischen Graumulle ein Polaritätskompass ist (Marhold et al. 1997a). Bei einem Polaritätskompass wird die Polarität des Magnetfeldes wahrgenommen und nicht die Achse der Feldlinien wie beim Inklinationskompass. Der Polaritätskompass der Mulle ist nicht lichtabhängig, und Verhaltensversuche mit einem starken magnetischen Puls legen nahe, dass er auf Magnetit basiert. Der Effekt des Pulses hielt über drei Monate an, deutlich länger als bei Vögeln, was auf einen Mechanismus hindeutet, der auf SD-Magnetit basiert (Marhold et al. 1997b). Versuche mit oszillierenden Feldern bestätigen, dass dem Magnetkompass der Mulle kein Radikalpaar-Mechanismus zu Grunde liegt, da die Tiere von diesen magnetischen Feldern nicht beeinträchtigt werden (Thalau et al. 2006). Des Weiteren konnten bestimmte Zellen im *superior colliculus*, ein Teil des Mittelhirns, charakterisiert werden, die auf magnetische Reizung reagieren (Nemec et al. 2001).

Bei Säugetieren sind noch diverse andere Phänomene bekannt, in denen sie sich am Magnetfeld ausrichten. Beispielsweise grasen Kühe und Rotwild signifikant öfter in Nord-Süd-Richtung als in anderen Richtungen (Begall et al. 2008, Begall et al. 2011). Füchse springen beim Jagen hoch, um ihre Beute zu überraschen. Dies führt öfters zum Erfolg, wenn dieser Sprung in nord-östlicher Richtung vollzogen wird (Cervený et al. 2011). Ob von diesem Verhalten automatisch auf die Fähigkeit zur Magnetrezeption geschlossen werden kann, ist unklar, da hier auch andere Faktoren genutzt werden könnten, die durch das Magnetfeld beeinflusst werden.

Selbst bei Menschen gibt es Hinweise auf Magnetrezeption. In Manchester, in England wurden Studenten mit verbundenen Augen in einem Minibus auf unterschiedlichsten Wegen an verschiedene Versuchsorte gebracht. Anschließend waren sie trotzdem in der Lage, die Richtung zu nennen, in der die Universität lag (Baker 1980). Erst kürzlich wurde menschliches Cry2 in einer Studie in *Drosophila* exprimiert und war hier magnetsensitiv (Foley et al. 2011). Allerdings ist zu beachten, dass Cryptochrome immer Radikalpaare bilden, die prinzipiell zur Magnetfeldwahrnehmung genutzt werden können, sofern es einen entsprechenden reizleitenden Apparat gibt. *Drosophila* besitzt die erforderlichen Proteine und Nervenverbindungen die dafür notwendig sind. Es ist jedoch nicht sicher, ob auch Menschen sie haben und, wenn ja, ebenso auf diese Weise nutzen.

4.2.3 Magnetrezeption bei Amphibien

Auch bei Amphibien ist Magnetrezeption bekannt. So ist für den Wassermolch *Notophthalmus viridescens* ein lichtabhängiger Inklinationskompass nachgewiesen (Phillips & Borland 1992), der allerdings sowohl in kurzen als auch in langen Wellenlängen des Lichtes funktioniert. Lange Wellenlängen des Lichtes (≥ 500 nm) führen allerdings zu einer Drehung um 90° gegenüber kürzeren Wellenlängen oder weißem Licht (Phillips et al. 2010). Vermutlich ist der Magnetrezeptor dieses Wassermolches im Pineal lokalisiert und nicht in der Retina wie bei Vögeln (Deutschlander et al. 1999). Auch amerikanische Ochsenfrösche (*Rana catesbeiana*) zeigen die gleiche 90° -Abweichung der Richtung bei Wellenlängen von ≥ 500 nm (Freake & Phillips 2005). Dies lässt vermuten, dass möglicherweise auch bei Amphibien ein einheitlicher Mechanismus eines Magnetkompasses zu Grunde liegt, der sich aber von dem der Vögel unterscheidet. Es gibt aber auch Hinweise auf eine magnetit-abhängige Magnetrezeption bei Molchen. Bei Tests mit Molchen, die von ihren Laichplätzen verfrachtet wurden, wurde die Abweichung der Richtung in langen Wellenlängen des Lichts nicht beobachtet, sondern es kam zu Desorientierung. Dies wurde als zweiter magnetsensitiver Mechanismus interpretiert (Phillips & Borland 1994). Brassart et al. (1999) konnten Magnetit im Körper der Molche messen, und Philipps et al. (2002) konnten eingrenzen, dass es sich dabei wohl um einen magnetit-basierten Mechanismus handelt, der in der Karte Eingang findet.

4.2.4 Magnetrezeption bei Fischen

Auch bei Fischen gibt es verschiedene Hinweise auf Magnetrezeption. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Gelbflossenthune (*Thunnus albacares*) (Walker 1984) ebenso wie Aale (*Anguilla anguilla* und *Anguilla japonica*) (Tesch 1974, Nishi et al. 2004), Lachse (*Oncorhynchus nerka*) (Quinn & Brannon 1982), Forellen (*Oncorhynchus mykiss*) (Walker et al. 1997), Zebrafische (*Danio rerio*) (Shcherbakov et al. 2005) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) (Hart et al. 2012) sich am Magnetfeld orientieren.

Bei wandernden Fischen wie Lachsen oder Aalen kann dieses Verhalten wie bei ziehenden Vögeln für Versuche genutzt werden. Junge Lachse, die auf ihrer Wanderung ins Meer gefangen und in Tanks getestet wurden, drehten ihre Richtung nur mit dem veränderten Magnetfeld, wenn ihnen die Sicht auf den Himmel genommen war. Konnten sie den Himmel sehen, hielten sie die Richtung zum Ort ihrer Gefangennahme ein, unabhängig davon ob das Magnetfeld gedreht war oder nicht (Quinn & Brannon 1982). Fische scheinen also visuelle Faktoren zur Orientierung zu bevorzugen. Vögel reagieren unterschiedlich auf eine solche Konfliktsituation. Langfristig scheinen aber alle getesteten Arten den Magnetkompass dem Sonnen- oder Sternenkompas vorzuziehen (R. Wiltschko & Wiltschko 1999a). In der Elbe in

der Nähe von Hamburg gefangen Aale (*Anguilla anguilla*) wurden in verschiedenen magnetischen Bedingungen, aber auch in Meer- und Süßwasser auf ihre Richtungsbevorzugung getestet. Hierbei veränderte sich die bevorzugte Richtung nicht nur durch das veränderte Magnetfeld, sondern auch durch unterschiedliche Salinität des Wassers. Der Autor schloss daraus, dass die eingeschlagene Richtung durch das Magnetfeld, aber auch durch den Salzgehalt des Wassers beeinflusst wird (Tesch 1974). Andere Versuche mit Aalen zeigten einen Zusammenhang zwischen der Richtung und der Temperatur des Wassers, in dem der Versuch stattfand. Vermutlich ist dies eine Reaktion der Tiere auf veränderte Umweltbedingungen während ihrer Wanderungen. Die Richtungsabweichung der Tiere nach Veränderungen der magnetischen Richtung im Experiment zeigt, dass die Tiere über einen Magnetkompass verfügen (Durif et al. 2013). Ob es sich dabei um einen Polaritätskompass oder einen Inklinationskompass wie bei Vögeln handelt, ist jedoch unklar.

Eine andere experimentelle Möglichkeit ist auch bei Fischen eine Konditionierung auf bestimmte magnetische Reize. Diese kann entweder durch ein bestimmtes Verhalten der Tiere (z. B. Walker 1984) oder auch durch Messung der Herzfrequenzen in einem Elektrokardiogramm (z. B. Nishi et al. 2004, Shcherbakov et al. 2005) überprüft werden. Aale, (*Anguilla japonica*) die auf Magnetfelder verschiedener Intensität, aber gleicher Richtung, nämlich in Ost-West-Achse und parallel zum Fisch konditioniert wurden, zeigten eine Erniedrigung der Herzfrequenz bei Zugabe dieser Magnetfelder (Nishi et al. 2004). So können Aale wohl sowohl die Richtung als auch die Intensität des Magnetfeld wahrnehmen. Ob sie die Intensität auch wie Vögel in einer Karte nutzen, ist unklar.

Eine dritte Möglichkeit ist die Beobachtung von Ausrichtreaktionen, wie bereits für Kühe und Rotwild beschrieben (Begall et al. 2008, Begall et al. 2011). So richteten sich Karpfen in Fässern auf Weihnachtsmärkten in Tschechien signifikant öfter in Nord-Süd-Richtung aus als in Ost-West-Richtung (Hart et al. 2012). Jedoch ist auch hier unklar, wie diese Ausrichtreaktion zu bewerten ist.

Allerdings gibt es bei Fischen auch histologische und elektrophysiologische Befunde, nämlich bei Forellen (Walker et al. 1997). Vorab wurde getestet, auf welche magnetischen Reize die Tiere reagieren. Hierfür wurden sie darauf trainiert, Futter mit einer Magnetanomalie zu assoziieren. Forellen nehmen die Intensität des Magnetfeldes wahr. Anschließend konnten die Autoren zeigen, dass die Reaktionen auf Intensitätsänderungen aus dem trigeminalen System kommen, und fanden Magnetit in der Basallamina des olfaktorischen Systems. Bei diesem Magnetit handelt es sich um SD-Magnetit (Diebel et al. 2000), welches in Zellen im Riechepithel an Membranen assoziiert ist und sich somit prinzipiell als Magnetrezeptor eignen würde (Eder et al. 2012). Auch Hellinger und Hoffmann

(2012) bestätigen eine Beteiligung des trigeminalen Systems in der Magnetrezeption von Forellen. Sie testeten die Tiere auf Veränderungen der Richtung wie auch der Intensität mittels eines Elektrokardiogramms. Nach der Betäubung des ophthalmischen Asts des Trigeminus reagierten die Tiere nur noch auf die Veränderungen der Richtung des Magnetfeldes, die Veränderung der Intensität wurde offensichtlich nicht mehr wahrgenommen. Sie testeten ebenfalls die Reaktion auf die verschiedenen Magnetfeldbedingungen unter rotem Licht und im Dunkeln. Die Tiere konnten sowohl die Intensitätsänderung wie auch die Richtungsänderung im Dunkeln wie im roten Licht noch wahrnehmen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass bei Forellen das trigeminale System bei der Wahrnehmung der Intensität des Magnetfeldes beteiligt ist und es einen zweiten Mechanismus geben muss, der die Richtung des Magnetfeldes misst, dieser ist allerdings lichtunabhängig. Auch bei Lachsen sind Ketten von SD-Magnetit aus dem Riechepithel beschrieben (Mann et al. 1988). Somit kann man vermuten, dass Fische einen oder auch zwei durchaus einheitliche Mechanismen der Magnetrezeption besitzen, wovon aber mindestens einer auf SD-Magnetit beruht.

4.2.5 Magnetrezeption bei Arthropoden und Mollusken

Auch bei Tieren, die nicht zu den Wirbeltieren gehören, gibt es Nachweise von Magnetrezeption, nämlich bei Arthropoden, wie Insekten und Krebsen, und Mollusken, wie Schnecken.

Eine Art der Monarchfalter (*Aphrissa statira*) orientiert sich auf ihrer Wanderung wohl unter anderem magnetisch. Im Experiment wurden die Tiere gefangen und dann einem starken magnetischen Feld ausgesetzt. Wurden sie dann wieder freigelassen, zeigten sie mehr Streuung und eine abweichende Richtung gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Wurde im Laborexperiment das Magnetfeld hinsichtlich der Richtung manipuliert, zeigten aber auch die Kontrollen eine abweichende bevorzugte Richtung, die sich jedoch trotzdem noch von der Richtung der behandelten Tiere unterschied. Die Autoren schlossen aus diesem Unterschied, dass Monarchfalter das Magnetfeld wahrnehmen können (Srygley et al. 2006). Aber auch eusoziale Insekten wie Ameisen und Honigbienen nutzen das Magnetfeld zur Orientierung. Bienen führen ihren Schwänzeltanz in einem bestimmten Winkel zum Magnetfeld aus. Dies kann sowohl durch Veränderungen der Intensität, der Polarität als auch der Wellenlänge des Lichtes beeinflusst werden (Zfg. Wajnberg et al. 2010). Sowohl bei Bienen als auch bei Ameisen wurde in diversen Körperpartien Magnetit nachgewiesen, allerdings wird vermutet, dass eine Anreicherung im Abdomen und in den Antennen als Magnetrezeptoren dienen könnte (Zfg. Wajnberg et al. 2010). Auch Termiten (*Amitermes meridionalis*) scheinen das Magnetfeld wahrzunehmen, denn sie richten ihren Galerien-Bau

in einer Richtung am Magnetfeld aus (z. B. Becker 1964, von Frisch 1974 zitiert nach Zfg. R. Wiltschko & Wiltschko 1995). Studien mit Fliegen (*Drosophila*) sowie mit Mehlkäfern (*Tenebrio*) zeigen in Verhaltensexperimenten, dass ihr Magnetkompass lichtabhängig ist. Beide zeigen eine Verschiebung um 90°, wenn sich die Wellenlänge des Lichtes verändert. Die Autoren schließen auf eine mögliche Beteiligung von Cryptochrom bei der Magnetrezeption dieser beiden Insektenarten (Zfg. Phillips et al. 2010).

Auch Langusten (*Panulirus argus*) sind in der Lage, bestimmte magnetische Positionen im Ozean zu erkennen und danach zu navigieren (Zfg. Cain et al. 2005). Nach Verfrachtung in Gefangenschaft schlagen sie einen Kurs ein, der sie zum Ort der Gefangennahme zurückbringen würde (Boles & Lohmann 2003). In Tests mit Spulensystemen im Meer konnte gezeigt werden, dass diese Tiere über einen Polaritätskompass verfügen (Lohmann et al. 1995).

Bei der zu den Nudibranchia gehörenden *Tritonia diomedea* konnte früh nachgewiesen werden, dass sich auch Schnecken am Erdmagnetfeld orientieren. Hierbei gibt es Variationen in der eingeschlagenen magnetischen Richtung, die sich mit einem circa-lunaren Rhythmus korrelieren lassen. Bei diesen Tieren gibt es also einen Zusammenhang zwischen Magnetrezeption und Mondphasen (Lohmann & Willows 1987). Diese Schnecken haben mit circa 7000 Neuronen ein relativ einfaches Nervensystem und eignen sich dadurch gut, um bestimmte Neurone ausfindig zu machen. Es konnten zwei Paar Neurone identifiziert werden, die auf Richtungsänderungen, und ein Paar, das auf Intensitätsänderungen des Magnetfeldes reagiert (Zfg. Cain et al. 2005).

4.3 Schlussfolgerungen

Magnetrezeption scheint also im Tierreich keinem einheitlichen Mechanismus zu unterliegen. Es gibt aber immer wieder Hinweise auf eine Beteiligung von Magnetit, aber auch von Cryptochromen an Prozessen der Magnetorientierung. Cryptochrome kommen im gesamten Tier- und Pflanzenreich vor, sogar bei Bakterien (Zfg. Chaves et al. 2011). Allerdings scheinen jeweils andere Cryptochrome als Rezeptormolekül zu dienen (Ahmad et al. 2007, Yoshii et al. 2009, Nießner et al. 2011). Ich denke, Magnetrezeption ist eher ein Nebenprodukt des Cryptochrom-Zyklus, da vermutlich nicht der eigentliche Weg der Signaltransduktion, nämlich die Konformationsänderung, genutzt wird, sondern ein Radikalpaar, das in jedem Fall entsteht (siehe auch 2.6.5). Somit könnte theoretisch in jeder Zelle, in der sich Cryptochrome befinden, auch das Magnetfeld gemessen werden. Allerdings benötigt es auch einen reizleitenden Apparat mit einer Signaltransduktionskaskade und den

zugehörigen Proteinen, die die über das Magnetfeld gewonnene Information weiterleiten können.

Auch Magnetit ist aus dem gesamten Tierreich und von Bakterien bekannt. Eisen II und Eisen III sind gängige Bestandteile des Eisenstoffwechsels (Zfg. Wang & Pantopoulos 2011). Bei magnetithaltigen Systemen wurde selten die genaue Zusammensetzung der Eisenoxide bestimmt, allerdings die Lokalisation der Zellen oder Zellbestandteile, in denen sie vorkommen. Diese Lokalisation stimmt bei bislang untersuchten Tieren nicht überein. Ich denke, auch Magnetit eignet sich auf Grund seiner Eigenschaften in biologischen Systemen gut, um damit das Magnetfeld zu messen. Meiner Einschätzung nach handelt es sich bei beiden magnetsensitiven Systemen und den dazugehörigen Magnetrezeptoren – im ganzen Tierreich betrachtet – um voneinander unabhängige, also analog entstandene Sinnesorgane.

Unter den Vögeln sind die beiden magnetsensitiven Systeme allerdings sehr einheitlich. Alle bis heute untersuchten Vogelarten weisen dieselben funktionellen Mechanismen und strukturellen Details der Magnetrezeptoren auf. Meines Erachtens gehen sie auf denselben Ursprung zurück, es handelt sich um homolog entstandene Rezeptoren. Hierbei finde ich bemerkenswert, dass sogar Hühner noch dieselben Strukturen aufweisen; sie sind nicht nur evolutionär gesehen eher fern mit den anderen untersuchten Vögeln wie z. B. Singvögeln verwandt, sondern werden auch schon sehr lange domestiziert. Auch wenn sie bis vor circa 100 Jahren noch naturnah auf Bauernhöfen gehalten wurden, brauchen sie sicherlich verglichen mit anderen Vögeln ihre Orientierungsfähigkeit eher weniger. Dass auch sie die Fähigkeit zur Magnetorientierung behalten haben, macht deutlich, dass Magnetorientierung für Vögel ein elementarer Bestandteil ihrer Lebensweise ist.

5 Zusammenfassung

Es gibt für die Orientierung von Vögel ein allgemeingültiges Konzept, das Karte-Kompass-Prinzip (Kramer 1953, 1957): Der Karten-Schritt besteht darin, den eigenen Standort zu ermitteln und mit dem Ziel in Beziehung zu setzen. Damit wird die geografische Richtung bestimmt, die im Kompass-Schritt in eine konkrete Richtung umgesetzt wird. Für Beides nutzen Vögel auch das Magnetfeld der Erde; in der Karte als einen Faktor den Verlauf der Intensität, im Magnetkompass die Achse der Feldlinien. Der Magnetrezeptor, der die Karte mit Informationen versorgt, ist im Schnabel lokalisiert, der des Kompasses im Auge. Ich habe mich in meiner Arbeit darauf konzentriert, die zwei potenziellen Magnetrezeptoren der Vögel feinstrukturell und immunhistologisch weiter zu charakterisieren.

Für den Magnetkompass wird auf Grund des Radikalpaar-Modells angenommen, dass Cryptochrome die Rezeptormoleküle sein könnten (Ritz et al. 2000). Bei Vögeln sind vier Cryptochrome bekannt, allerdings muss das Rezeptormolekül des Magnetkompasses auch in seiner Lokalisation bestimmte Kriterien erfüllen. Die für meine Arbeit bedeutsamen Kriterien sind: (1) die gleiche Ausrichtung der Proteine in einer Rezeptorzelle und (2), dass die einzelnen Rezeptorzellen alle Raumrichtungen abdecken. Ich habe in meiner Arbeit Cryptochrom 1a (Cry1a) und Cryptochrom 1b (Cry1b) auf ihr Vorkommen in der Retina von Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) und Hühnern (*Gallus gallus*) untersucht. Cry1b befindet sich bei Rotkehlchen während der Zugzeit in den Ganglienzellen, in denen es teilweise an Membranen gebunden vorliegt, die jedoch keine bevorzugte Richtung haben. Somit erscheint mir Cry1b als Rezeptormolekül für den Magnetkompass als eher ungeeignet. Cry1b könnte, wie viele Cryptochrome, an der Steuerung von circadianen Rhythmen beteiligt sein. Cry1a hingegen ist bei beiden untersuchten Vogelarten in den UV/V-Zapfen an die Diskmembranen gebunden, was eine Ausrichtung ermöglicht. Die UV/V-Zapfen sind über die gesamte Retina gleichmäßig verteilt, und durch die sphärische Form des Auges decken die einzelnen Rezeptoren jede Raumrichtung ab. Somit erfüllt Cry1a die Bedingungen des Radikalpaar-Modells, und ich schliesse daraus, dass es sich hierbei um das Rezeptormolekül des Magnetkompasses handeln könnte. Cry1a ändert nach Lichtabsorption wie viele Cryptochrome seine Konformation. Der von mir verwendete Antikörper bindet nur die lichtaktivierte Form des Proteins. In Versuchen, in denen Hühner verschiedenen monochromatischen Lichtern ausgesetzt wurden, zeigt sich, dass sich Cry1a in UV bis Gelb in lichtaktiviertem Zustand befindet. Dies stimmt sowohl mit der spektralen Empfindlichkeit des Magnetkompasses der Vögel als auch mit der des Flavins, des lichtsensitiven Teils des Cryptochroms, überein. Versuche mit grünem Licht lassen vorsichtige Rückschlüsse auf das für den Magnetkompass relevante Radikalpaar zu: so ist das Flavin erst im zweiten Oxidationsschritt grünlicht-sensitiv, und Cry1a ist nur nachweisbar, also lichtaktiviert, wenn

der erste Schritt bereits im Hellen abgelaufen ist. Versuche in denen die Tiere vorab im Dunkeln waren, führen nicht zur erneuten Lichtaktivierung unter grünem Licht. Dies macht nur eines der beiden im Flavinzyklus entstehenden Radikalpaare wahrscheinlich, nämlich das in der Reoxidation entstehende, da das Radikalpaar im ersten Schritt der Oxidation unter Grün nicht entsteht.

In Bezug auf den Magnetrezeptor im Schnabel konnte bereits bei Tauben eine detaillierte Struktur beschrieben werden, die als Magnetrezeptor geeignet ist, nämlich Magnetit- bzw. Maghemit-Teilchen in Dendriten der Nerven (Fleissner et al. 2003). Auch Hühner haben eisenhaltige Strukturen im Oberschnabel, die in ihrer Eisenoxid-Zusammensetzung denen der Tauben entsprechen (Falkenberg et al. 2010). Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass die eisenhaltigen Strukturen im Oberschnabel der adulten Hühner an oder in Nervenfasern liegen. Elektronenoptisch bestehen diese eisenhaltigen Strukturen im Nervengewebe bei Hühnern, wie bei Tauben beschrieben, aus einem 3-5 μm großen Vesikel, der von eisenhaltigen 'Schuppen' besetzt ist, aus circa 1 μm langen Plättchen und Kugeln mit einem Durchmesser von etwa 1 μm . Sie sind in Feldern angeordnet, in denen diese Zellstrukturen gleich ausgerichtet sind. In der Anzahl und Lokalisation der Felder der eisenhaltigen Dendriten gibt es Unterschiede zwischen Hühnern und Tauben, allerdings ist unklar, inwieweit dies zu Unterschieden in der Verarbeitung im Gehirn führt. Die Entwicklung der eisenhaltigen Dendriten der Hühner beginnt erst nach dem Schlupf, am Tag des Schlupfes haben Küken noch keine eisenhaltigen Strukturen, abgesehen von roten Blutkörperchen. In den ersten 5 Tagen werden eisenhaltige Makrophagen im frontalen Bereich des Schnabels gebildet, die anschließend wieder reduziert werden. Bei 12 Tage alten Hühnern werden diese auch im lateralen Bereich des Oberschnabels angelegt und ebenfalls dort bis Tag 21 wieder reduziert. 21 Tage alte Hühner haben nur noch wenige eisenhaltige Makrophagen, allerdings ein erstes Feld von eisenhaltigen Dendriten. Die Röntgenabsorption zeigt einen Unterschied in der Eisenoxid-Zusammensetzung zwischen eisenhaltigen Makrophagen und eisenhaltigen Dendriten. Es könnte sein, dass die eisenhaltigen Makrophagen an der Synthese der eisenhaltigen Dendriten beteiligt sind, da sie Eisen aufnehmen, aber auch wieder abgeben können und in demselben Zeitraum reduziert werden, wie die eisenhaltigen Dendriten aufgebaut werden.

Sowohl Tauben als auch Rotkehlchen haben sich phylogenetisch bereits vor 95 Millionen Jahren von den Hühnern abgespalten. Es gibt sowohl in der Lokalisation von Cry1a als auch in der Struktur der einzelnen eisenhaltigen Dendriten keine Unterschiede, so dass es sich bei den beiden Magnetrezeptoren der Vögel vermutlich um sehr alte Mechanismen handelt, die sich in der Evolution kaum verändert haben. Vermutlich sind sie vogelspezifisch, da es in dieser Hinsicht keine erkennbare Gemeinsamkeit mit anderen Wirbeltieren gibt.

6 Literatur

- Agarwal B. (2011): A role for anions in ATP synthesis and its molecular mechanistic interpretation. *J Bioenerg Biomembr* 43, 299-310.
- Ahmad M., Cashmore A. R. (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. (2007): Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 615-624.
- Bailey M. J., Chong N. W., Xiong J., Cassone V. M. (2002): Chickens' Cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. *FEBS Letters* 513, 160-174.
- Baker R. R. (1980): Goal orientation by blindfolded humans after long-distance displacement: possible involvement of a magnetic sense. *Science* 210, 555-557.
- 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., Brennon W. J. (1986): Natural and induced magnetization in the bobolink, (*Dolichonyx oryzivorus*). *Ethology* 91, 75-80.
- Beason R. C., Semm P. (1987): Magnetic responses of the trigeminal nerve system of the bobolink, *Dolichonyx oryzivorus*. *Neuroscience Letters* 80, 229-234.
- Beason R. C., Semm P. (1996): Does the avian ophthalmic nerve carry magnetic navigational information? *J Exp Biol* 199, 1241-1244.
- Beason R. C., Dussourd N., Deutschlander M. (1995): Behavioural evidence for the use of magnetic material in magnetoreception by a migratory bird. *J Exp Biol* 198, 141-146.
- Becker G. (1964): Reaktion von Insekten auf Magnetfelder, elektrische Felder und atmosphärische. *Z Angew Entomol* 54, 75-88.
- Begall S., Cerveny J., Neef J., Vojtech O., Burda H. (2008): Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 13451-13455.
- Begall S., Burda H., Cerveny J., Gerter O., Neef-Weisse J., Némec P. (2011): Further support for the alignment of cattle along magnetic field lines: reply to Hert et al. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197, 1127-1133.
- Bellrose E. C. (1972): Possible steps in the evolutionary development of bird navigation. In: Galler S.R., Schmidt-Koenig K., Jacobs G.J., Belleville R.E. (Eds.): *Animal orientation and navigation*. NASA SP-262, 223-257, Washington, D.C.
- Berthold P. (1988): The control of migration in European warblers. In: *Acta XIX Congr. Int. Ornithol.*, 215 (H. Ouellet, Eds.). University of Ottawa Press, Ottawa.
- Berthold P. (1990): *Vogelzug: eine kurze, aktuelle Gesamtübersicht*. Wiss. Buchges., Darmstadt.

- Besharse J. C., Hollyfield J. G., Rayborn M. E. (1977): Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *J Cell Biol* 75, 507-527.
- Bischof H. J., Nießner C., Peichl L., Wiltschko R., Wiltschko W. (2011): Avian ultraviolet/violet cones as magnetoreceptors: the problem of separating visual and magnetic information. *Communicative & Integrative Biology* 4, 713-716.
- Biskup T., Schleicher E., Okafuji A., Link G., Hitomi K., Getzoff E. D., Weber S. (2009): Direct observation of a photo-induced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Angew Chem Int* 48, 404-407.
- Boles L. C., Lohmann K. J. (2003): True navigation and magnetic map in spiny lobsters. *Nature* 421, 60-63.
- Bouly J.-P., Schleicher E., Dionisio-Sese M., Vandenbussche F., Van der Straeten D., Barkrin N., Meier S., Batschauer A., Galland P., Bittl R., Ahmad M. (2007): Cryptochrome blue-light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem* 282, 9383-9391.
- Bowmaker J. K. (1998): Evolution of colour vision in vertebrates. *Eye* 12, 541-547.
- Brassart J., Kirschvink J. L., Phillips J. B., Borland S. C. (1999): Ferromagnetic material in the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Biol* 202, 3155-3160.
- Buser H., Schwarzenbach D., Petter W., Ludi A. (1977): The crystal structure of prussian blue: $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. *Inorganic Chemistry* 16, 2704-2710.
- Cain S. D., Boles L. C., Wang J. H., Lohmann K. J. (2005): Magnetic orientation and navigation in marine turtles, lobsters, and molluscs: concepts and conundrums. *Integr Comp Biol* 45, 539-546.
- Carvalho L. S., Davies W. L., Robinson P. R., Hunt D. M. (2011): Spectral tuning and evolution of primate short-wavelength-sensitive visual pigments. *Proc Biol Sci* 279, 387-393.
- Cashmore A. R. (2003): Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114, 537-543.
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y.-J., Liu D. (1999): Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
- Červený J., Begall S., Koubek P., Nováková P., Burda H. (2011): Directional preference may enhance hunting accuracy in foraging foxes. *Biol Lett* 7(3), 355-357.
- Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L. O., van der Horst G. T., Batschauer A., Ahmad M. (2011): The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* 62, 335-364.
- Ciccarelli F. D., Doerks T., von Mehring C., Creevey C. J., Snel B., Brok P. (2006): Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311, 1283-1287.
- Curry-Lindahl K. (1982): Das große Buch vom Vogelzug. Paul Parey, Berlin.

- Dacey D. M. (2000): Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annu Rev Neurosci* 23, 743-775.
- Davila A. F., Fleissner Ge., Winklhofer M., Petersen N. (2003): A new model for a magnetoreceptor in homing pigeons based on interacting clusters of superparamagnetic magnetite. *Phys Chem Earth* 28, 647-652.
- Davila A. F., Winklhofer M., Shcherbakov V. P., Petersen N. (2005): Magnetic pulse affects a putative magnetoreceptor mechanism. *Biophys J* 89, 56-63.
- Davies A. M. (1988): The trigeminal system: an advantageous experimental model for studying neuronal development. *Development* 103, 175-183.
- Denzau S., Kuriakose D., Freire R., Munro U., Wiltschko W. (2011): Conditioning domestic chickens to a magnetic anomaly. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197, 1137-1141.
- Denzau S., Nießner C., Rogers L., Wiltschko W. (2013): Ontogenetic development of magnetic compass orientation in domestic chickens (*Gallus gallus*). *J Exp Biol* 216, 3143-3147.
- Deutschlander M. E., Borland S. C., Phillips J. B. (1999): Extraocular magnetic compass in newts. *Nature* 400, 324-325.
- Deutschlander M. E., Phillips J. B., Munro U. (2012): Age-dependent orientation to magnetically-simulated geographic displacements in migratory Australian silvereyes (*Zosterops l. lateralis*). *The Wilson Journal of Ornithology*, 124, 467-477.
- Diebel C. E., Proksch R., Green C. R., Neilson P., Walker M. M. (2000): Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406, 299-302.
- Drost R., Schutz E. (1932): Vom Zug des Rotkehlchens. *Vogelzug* 3, 164-169.
- Dubbeldam J. L. (1998): The sensory trigeminal system in birds: input, organization and effects of peripheral damage. *Arch Physiol Biochem* 106, 338-345.
- Durif C. M., Browman H. L., Phillips J. B., Skiftesvik A. B., Vollestad L. A., Stockhausen H. H. (2013): Magnetic compass orientation in the European eel. *PLoS One* 8, e59212.
- Eder S. H., Cadiou H., Muhamad A., McNaughton P. A., Kirschvink J. L., Winklhofer M. (2012): Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 12022-12027.
- Egevang C., Stenhouse I. J., Phillips R. A., Petersen A., Fox J. W., Silk J. R. (2010): Tracking of arctic terns *Sterna paradisaea* reveals longest animal migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 2078-2081.
- Emlen S. T., Emlen J. T. (1966): A technique for recording migratory orientation in captive birds. *Auk* 83, 361-367.
- Ericson G. P., Anderson C. L., Britton T., Elzanowski A., Johansson U. S., Källersjö M., Ohlson J. I., Parsons T. J., Zuccon D., Mayr G. (2006): Diversification of neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biol Lett* 2, 543-547.
- Faivre D., Schüler D. (2008): Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chem Rev* 108, 4875-4898.

- Falkenberg G., Fleissner Ge., Schuchardt K., Kuehbacher M., Thalau P., Mouritsen H., Heyers D., Wellenreuther G., Fleissner Gu. (2010): Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. PLoS One 5, e9231.
- Fleissner Ge., Holtkamp-Rötzler E., Hanzlik M., Winklhofer M., Fleissner Gu., Petersen N., Wiltschko W. (2003): Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. J Comp Neurol 458, 350-360.
- Fleissner Ge., Stahl B., Thalau P., Falkenberg G., Fleissner Gu. (2007a): A novel concept of Fe-mineral-based magnetoreception: histological and physicochemical data from the upper beak of homing pigeons. Naturwissenschaften 94, 631-642.
- Fleissner Ge., Fleissner Gu., Stahl B., Falkenberg G. (2007b): Iron-mineral-based magnetoreception in birds: the stimulus conducting system. J Ornithol 148, 643-648.
- Foley L. E., Gegear R. J., Reppert S. M. (2011): Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. Nat Commun 2, 356.
- Frankel R. B. (1991): Iron Biominerals: An Overview. In: Frankel R. B., Blackmore S.: Iron biominerals. Plenum Press, New York.
- Freake M. J., Phillips J. B. (2005) Light-dependent shift in bullfrog tadpole magnetic compass orientation: evidence for a common magnetoreception mechanism in anuran and urodele amphibians. Ethology 111, 241-254.
- Freire R., Birch T. E. (2010): Conditioning to magnetic direction in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*). J Exp Biol 213, 3423-3426.
- Freire R., Munro U. H., Rogers L. J., Wiltschko R., Wiltschko W. (2005): Chickens orient using a magnetic compass. Curr Biol 15, 620-621.
- Freire R., Eastwood M. A., Joyce M. (2011): Minor beak trimming in chickens leads to loss of mechanoreception and magnetoreception. J Anim Sci 89, 1201-1206.
- Freire R., Dunston E., Fowler E. M., McKenzie G. L., Quinn C. T., Michelsen J. (2012): Conditioned response to a magnetic anomaly in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*) involves the trigeminal nerve. J Exp Biol 215, 2399-2404.
- 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.
- Fujiwara K., Okamura-Ikeda K., Motokawa Y. (1987): Amino acid sequence of the phosphopyridoxyl peptide from P-protein of the chicken liver glycine cleavage system. Biochem Biophys Res Commun 149, 621-627.
- Gagliardo A. (2013): Forty years of olfactory navigation in birds. J Exp Biol 216, 2165-2171.
- Ganz T. (2012): Macrophages and systemic iron homeostasis. J Innate Immun 4, 446-453.
- Gehring D., Wiltschko W., Güntürkün O., Denzau S., Wiltschko R. (2012): Development of lateralization of the magnetic compass in a migratory bird. Proc Biol Sci 22, 4230-4235.

- Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K. (2003): Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature Struct Biol* 6, 489-490.
- Glutz von Blotzheim U. N. (1981): Handbuch der Vögel Mitteleuropas. Bd. 5: Galliformes und Gruiformes. Nachdr., bis auf wenige Korrekturen unverändert. Wiesbaden, Aula-Verlag.
- Glutz von Blotzheim U. N. (Hrsg.) (1988): Passeriformes: Turdidae. Handbuch der Vögel Mitteleuropas Bd. 11, 2. Wiesbaden, Aula-Verlag.
- Gross J. C. (2009): Cytokine-dependent localization, modification and interaction of shrew-1 in epithelial cells. Dissertation Frankfurt am Main.
- Hamburger V., Hamilton H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.
- Hanzlik M., Heunemann C., Holtkamp-Rötzler E., Winklhofer M., Petersen N., Fleissner Ge. (2000): Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *Biometals* 13, 325-331.
- Haque R., Chaurasia S. S., Wessel J. H., Iovome P. M. (2002): Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *NeuroReport* 13, 2247-2251.
- Harris S. R., Henbest K. B., Maeda K., Pannell J. R., Timmel C. R., (2009): Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *J R Soc Interface* 6, 1193-1205.
- Hart N. S. (2001): The visual ecology of avian photoreceptors. *Progr Ret Eye Res* 20, 675-703.
- Hart N. S., Hunt D. M. (2007): Avian visual pigments: characteristics, spectral tuning, and evolution. *Am Nat* 1, 7-26.
- Hart V., Kušta T., Němec P., Bláhová V., Ježek M., Nováková P., Begall S., Cervený J., Hanzal V., Malkemper E. P., Stípek K., Vole C., Burda H. (2012): Magnetic alignment in carps: evidence from the czech christmas fish market. *PLoS One* 7, e51100.
- Hayman P., Hume R. (2003): Die Kosmos-Vogelenzyklopädie. Stuttgart, Kosmos.
- Hein C. M., Engels S., Kishkinev D., Mouritsen H. (2011): Robins have a magnetic compass in both eyes. *Nature* 471, E11-2.
- Hein L. (1961): Die neue Brehm-Bücherei: Unser Haushuhn. A. Ziemsen, Lutherstadt Wittenberg.
- Helfer G., Fidler A. E., Vallone D., Foulkes N. S., Brandstaetter R. (2006): Molecular analysis of clock gene expression in the avian brain. *Chronobiol Int* 23, 113-127.
- Hellinger J., Hoffmann K.-P. (2012): Magnetic field perception in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: magnetite mediated, light dependent or both? *J Comp Physiol A* 198, 593-605.
- Hemmi J. M., Grünert U. (1999): Distribution of photoreceptor types in the retina of a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Vis Neurosci* 16, 291-302.

- Heyers D., Manns M., Luksch H., Güntürkün O., Mouritsen H. (2007): A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *PLoS One* 2, e937.
- Heyers D., Zapka M., Hoffmeister M., Wild J. M., Mouritsen H. (2010): Magnetic field changes activate the trigeminal brainstem complex in a migratory bird. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 9394-9399.
- Hill E., Ritz T. (2010): Can disordered radical pair systems provide a basis for a magnetic compass in animals? *J R Soc Interface* 7, 265-271.
- Holland R. A. (2010): Differential effects of magnetic pulses on the orientation of naturally migrating birds. *J R Soc Interface* 7, 1617-1625.
- Holland R. A., Helm B. (2013): A strong magnetic pulse affects the precision of departure direction of naturally migrating adult but not juvenile birds. *J R Soc Interface* 10, 2192-2200.
- Holtkamp-Rötzler E., Fleissner Ge., Hanzlik M., Wiltschko W., Petersen N. (1997): Mechanoreceptors in the upper beak of homing pigeons as putative structural candidates for magnetoreception. *Verh Deutsche Zool Ges* 90, 290.
- Holtkamp-Rötzler E. (1999): Verhaltensphysiologische, physikalische und neuroanatomische Befunde zur Magnetperzeption bei Brieftauben (*Columba livia*). Dissertation Frankfurt am Main.
- Hsu C.-Y., Chan Y.-P. (2011): Identification and localization of proteins associated with biomineralization in the iron deposition vesicles of Honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 6, e19088.
- Hsu P., Raine L., Fanger H. (1981): Use of the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *Journal of histochemistry & cytochemistry* 29, 577-580.
- Hsu D. S., Zhao X., Zhao S., Kazantsev A., Wang R. P., Todo T., Wei Y. F., Sancar A. (1996): Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *A Biochemistry* 35, 13871-13877.
- Irvine P. W., Lohmann K. J. (2005): Disruption of magnetic orientation in hatchling loggerhead sea turtles by pulsed magnetic fields. *J Comp Physiol A* 191, 475-480.
- Ishikawa T., Matsumoto A., Kato T. Jr., Togashi S., Ryo H., Ikenaga M., Todo T., Ueda R., Tanimura T. (1999): DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm. *Genes Cells* 4, 57-65.
- Jogler C., Schüler D. (2009): Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annu Rev Microbiol* 63, 501-521.
- 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, 507-528.
- Keary N., Ruploh T., Voss J., Thalau P., Wiltschko R., Wiltschko W., Bischof H. J. (2009): Oscillating magnetic field disrupts magnetic orientation in Zebra finches, *Taeniopygia guttata*. *Front Zool* 6, 25.

- Keary N., Voss J., Lehmann K., Bischof H. J., Lowel S. (2010): Optical imaging of retinotopic maps in a small songbird, the zebra finch. PLoS One 5, e11912.
- Keeton W. T., Larkin T. S., Windsor D. M. (1974): Normal fluctuations in the earth's magnetic field influence pigeon orientation. J Comp Physiol 95, 95-103.
- King A. S., McLelland J. (1978): Anatomie der Vögel: Grundzüge und vergleichende Aspekte. Ulmer, Stuttgart.
- Kirschvink J. L., Gould J. L. (1981): Biogenetic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. BioSystems 13, 181-201.
- Kirschvink J. L., Walker M. M. (1985): Particle-size considerations for magnetite-based magnetoreceptors. In: Kirschvink J. L., Jones D. S., MacFadden B. J. (Eds.): Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms. Plenum Press, New York, London.
- Kirschvink J. L., Jones D. S., MacFadden B. J. (1985): Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms. Plenum Press, New York, London.
- 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 Cells 5, 725-738.
- Kosman D. J. (2013): Iron metabolism in aerobes: managing ferric iron hydrolysis and ferrous iron autoxidation. Coord Chem Rev 257(1), 210-217.
- Kram Y. A., Mantey S., Corbo J. C. (2010): Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics. PLoS One 5, e8992.
- Kramer G. (1949): Über Richtungstendenzen bei der nächtlichen Zugunruhe gekäfigter Vögel. In: Mayr E., Schütz E., Ornithologie als biologische Wissenschaft. Winter, Heidelberg, 269-283.
- Kramer G. (1953): Wird die Sonnenhöhe bei der Heimorientierung verwendet? J für Ornithol 94, 201-219.
- Kramer G. (1957): Experiments in bird orientation and their interpretation. Ibis 99, 196-227.
- Kyriacou C. (2009): Clocks, cryptochromes and Monarch migrations. J Biol 8, 55.
- Lack D. (1946): The life of the Robin. London, Witherby, revidierte Auflage der Ausgabe von 1943.
- Lau J. C., Wagner-Rundell N., Rodgers C. T., Green N. J., Hore P. J. (2010): Effects of disorder and motion in a radical pair magnetoreceptor. J R Soc Interface 7 Suppl 2, 257-264.
- Lau J. C., Rodgers C. T., Hore P. J. (2012): Compass magnetoreception in birds arising from photo-induced radical pairs in rotationally disordered cryptochromes. J R Soc Interface 7 Suppl 9, 3329-3337.
- Laubinger S. (2006): Die Funktion der SPA-Gene in der lichtgesteuerten Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation Düsseldorf.

Literatur

- LaVail M. M. (1976): Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194, 1071-1074.
- Leask M. J. M. (1977): A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature* 267, 144-145.
- Lieckfeld C. P., Strauß V. (2002): *Mythos Vogel: Geschichte, Legenden*. BLV Buchverlag München.
- Liedvogel M., Mouritsen H. (2010): Cryptochromes – a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know? *J R Soc Interface* 7, 147-162.
- Liedvogel M., Feenders G., Wada K., Troje N. F., Jarvis E. D., Mouritsen H. (2007a): Lateralized activation of Cluster N in the brains of migratory songbirds. *Eur J Neurosci* 25, 1166-1173.
- Liedvogel M., Maeda K., Henbest K., Schleicher E., Simon T., Timmel C. R., Hore P. J., Mouritsen H. (2007b): Chemical magnetoreception: bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived radical-pairs. *PLoS One* 2, e1106.
- Lin C. (2002): Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14, 207-225.
- Lin C., Shalitin D. (2003): Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 54, 469-496.
- Lin C., Todo T. (2005): The cryptochromes. *Genome Biol* 6, 220.
- Lin C., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J., Cashmore A. R. (1998): Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2686-2690.
- Lohmann K. J. (1991): Magnetic orientation by hatchling loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *J Exp Biol* 155, 37-49.
- Lohmann K. J., Lohmann C. M. F. (1994): Detection of magnetic inclination angle by sea turtles: a possible mechanism for determining latitude. *J Exp Biol* 194, 23-32.
- Lohmann K. J., Lohmann C. M. F. (1996): Detection of magnetic field intensity by sea turtles. *Nature* 380, 59-61.
- Lohmann K. J., Willows A. O. D. (1987): Lunar-modulated geomagnetic orientation by a marine mollusk. *Science* 235, 331-334.
- Lohmann K. J., Pentcheff N. D., Nevitt G. A., Stetten G. D., Zimmer-Faust R. K., Jarrard H. E., Boles L. C. (1995): Magnetic orientation of spiny lobsters in the ocean: experiments with underseas coil systems. *J Exp Biol* 198, 2041-2048.
- Lohmann K. J., Putman N. F., Lohmann M. F. C. (2012): The magnetic map of hatchling loggerhead sea turtles. *Curr Opin Neurobiol* 22, 336-342.
- Maeda K., Henbest K. B., Cintolesi F., Kuprov I., Rodgers C. T., Liddell P. A., Gust D., Timmel C. R., Hore P. J. (2008): Chemical compass model of avian magnetoreception. *Nature* 453, 387-390.

- Maier E. J., Bowmaker J. K. (1983): Colour vision in the passerine bird *Leiothrix lutea*: correlation of visual pigment absorbance and oil droplet transmission with spectral sensitivity. *J Comp Physiol A* 172, 295-302.
- Mann S., Sparks N. H. C., Walker M. M., Kirschvink J. L. (1988): Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from Sockeyes salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J Exp Biol* 140, 35-49.
- 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 the common molarat from Zambia. In: Orientation and navigation of birds, humans and other animals. Royal Instit of Navig, Oxford, 51-59.
- Mataki S., Ohya K., Ino M., Ogura H. (1991): Studies on the transport mechanisms of iron in rat incisor enamel. In: Suga S., Nakahara H. (1991): Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems. Springer, Tokyo.
- McNeil R., McSween A., Lachapelle P. (2005): Comparison of the retinal structure and function in four bird species as a function of the time they start singing in the morning. *Brain Behav Evol* 65, 202-214.
- Merkel F. W., Wiltschko W. (1965): Magnetismus und Richtungsfinden zugunruhiger Rotkehlchen. *Vogelwarte* 23, 71-77.
- Meyer D. B., May H. C. Jr. (1973): The topographical distribution of rods and cones in the adult chicken retina. *Exp Eye Res* 17, 347-355.
- Möller A. (2006): Cryptochrom als potenzielles Rezeptormolekül für die lichtabhängige Magnetkompassorientierung von Zugvögeln. Dissertation Frankfurt am Main.
- 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.
- Moody S. A., Quigg M. S., Frankfurter A. (1989): Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 279, 567-580.
- Mora C. V., Davison M., Wild J. M., Walker M. M. (2004): Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature* 432, 508-511.
- Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dirks P., Weiler R. (2004): Cryptochrome and activity markers co-localize in bird retina during magnetic orientation. *Proc Natl Acad. Sci USA* 101, 14294-14299.
- Mouritsen H., Feenders G., Liedvogel M., Wada K., Jarvis E. D. (2005): Night-vision brain area in migratory songbirds. *Proc Natl Acad Sc USA* 102, 8339-8344.
- Müller P., Ahmad M. (2011): Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J Biol Chem* 286, 21033-21040.
- Munro U., Munro J. A., Phillips J. B., Wiltschko R., Wiltschko W. (1997): Evidence for a magnetite-based navigational "map" in birds. *Naturwissenschaften* 84, 26-28.

- Murray R. W. (1962): The response of the ampullae of Lorenzini of elasmobranchs to electrical stimulation. *J Exp Biol* 39, 119-128.
- Nemec P., Altmann J., Marhold S., Burds H., Oelschläger H. H. A. (2001): Neuroanatomy of magnetoreception: the superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science* 294, 366-368.
- Nießner C., Denzau S., Gross J. C., Peichl L., Bischof H. J., Fleissner G., Wiltschko W., Wiltschko R. (2011): Avian ultraviolet/violet cones identified as probable magnetoreceptors. *PLoS One* 6, e20091.
- Nießner C., Denzau C., Stapput K., Ahmad M., Peichl L., Wiltschko W., Wiltschko R. (2013): Magnetoreception: Activated Cryptochrome 1a concurs with magnetic orientation in birds. *J R Soc Interface*, DOI 10.1098/rsif.2013.0638.
- Nishi T., Kamawura G., Matsumoto K. (2004): Magnetic sense in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Exp Biol* 207, 2965-2970.
- Oehme H. (1961): Vergleichend-histologische Untersuchungen an der Retina von Eulen. *Zool Jb Anat* 79, 439-478.
- Oehme H. (1962): Das Auge von Mauersegler, Star und Amsel. *J Ornithol* 103, 189-212.
- Ozer Z., Reardon J. T., Hsu D. S., Malhotra K., Sancar A. (1995): The other function of DNA photolyase: stimulation of excision repair of chemical damage to DNA. *Biochemistry* 34, 15886-15889.
- Oztürk N., Song S. H., Özgür S., Selby C. P., Morrison L., Partch C., Zhong D., Sancar A. (2007): Structure and function of animal cryptochromes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 119-131.
- Pallen J. M., Wren W. B. (1997): The HrtA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26, 209-221.
- 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.
- Phillips J. B., Borland S. C. (1992): Wavelength specific effects of light on magnetic compass orientation in the eastern red-spotted newt. *Ethol Ecol Evol* 4, 33-42.
- Phillips J. B., Borland S. C. (1994): Use of a specialized magnetoreception system for homing by the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Biol* 188, 275-291.
- Phillips J. B., Borland S. C., Freake M. J., Brassart J., Kirschvink J. L. (2002): "Fixed-axis" magnetic orientation by an amphibian: non-shoreward-directed compass orientation, misdirected homing or positioning a magnetite-based map detector in a consistent alignment relative to the magnetic field? *J Exp Biol* 205, 3903-3914.
- Phillips J. B., Jorge P. E., Muheim R. (2010): Light-dependent magnetic compass orientation in amphibians and insects: candidate receptors and candidate molecular mechanisms. *J R Soc Interface* 7, 241-256.

- Pierre T. G. A. T., Tran K. C., Webb J., Macey D. C., Pootrakul P. (1991): Mineralization of iron in ferritin and haemosiderin: The effect of tissue environment on mineral structure. In: Suga S., Nakahara H. (1991) Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems. Springer, Tokyo.
- Pischinger A. (1904): Der Vogelzug bei den griechischen Dichtern des klassischen Altertums. Ein zweiter Beitrag zur Würdigung des Naturgefühls der antiken Poesie. Eichstätt.
- Press F., Siever R. (1995): Allgemeine Geologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (u. a.).
- Quinn T. P., Brannon E. L. (1982): The use of celestial and magnetic cues by orienting sockeye salmon smolts. J Comp Physiol 147, 547-552.
- Rappl R., Wiltschko R., Weindler P., Berthold P., Wiltschko W. (2000): Orientation behaviour of garden warblers, *Sylvia borin*, under monochromatic light of various wavelengths. Auk 117, 256-260.
- Rashid N., Andrew R. J. (1989): Right hemisphere advantage for topographical orientation in the domestic chick. Neuropsychologia 27, 937-948.
- Ritz T., Adem S., Schulten K. (2000): A model for photoreceptor-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.
- Ritz T., Wiltschko R., Hore P. J., Rodgers C. T., Stapput K., Thalau P., Timmel C. R., Wiltschko W. (2009): Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. Biophys J 96, 3451-3457.
- Ritz T., Ahmad M., Mouritsen H., Wiltschko R., Wiltschko W. (2010): Photoreceptor-based magnetoreception: optimal design of receptor molecules, cells, and neuronal processing. J R Soc Interface 7 Suppl 2, 135-146.
- Rodda G. H. (1984): The orientation and navigation of juvenile alligators: evidence of magnetic sensitivity. J Comp Physiol A 154, 649-658.
- Rogers L. J. (1995): The development of brain and behaviour in the chicken. Wallingford, CAB International.
- Rogers L. J., Munro U., Freire R., Wiltschko R., Wiltschko W. (2008): Lateralized response of chicks to magnetic cues. Behav Brain Res 186, 66-71.
- Salewski V., Bruderer B. (2007): The evolution of bird migration a synthesis. Naturwissenschaften 94, 268-279.
- Sancar A. (2003): Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chem Rev 103, 2203-2237.
- Sassoe-Pognetto M., Wassle H., Grunert U. (1994): Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. J Neurosci 14, 5131-5146.

- Schiffner I., Wiltschko R. (2011): Temporal fluctuations of the geomagnetic field affect pigeons' entire homing flight. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197, 765-772.
- Schiffner I. (2010): Characterisation and identification of the navigational processes in homing pigeons. Dissertation Frankfurt am Main.
- Schiffner I., Fuhrmann P., Wiltschko R. (2011): Tracking pigeons in a magnetic anomaly and in magnetically "quiet" terrain. *Naturwissenschaften* 98, 575-581.
- Schiviz A. N., Ruf T., Kuebber-Heiss A., Schubert C., Ahnelt K. P. (2008): Retinal cone topography of artiodactyl mammals: influence of body height and habitat. *J Comp Neurol* 507, 1336-1350.
- Schüler D. (2008): Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32, 654-672.
- Schulten K., Windemuth A. (1986): Model for a physiological magnetic compass. In: Maret G., Boccara N., Kiepenheuer J.: *Biophysical effects of steady magnetic fields*. Springer, Berlin, 99-106.
- Selby C. P., Sancar A. (2006): A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17696-17700.
- 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. (1978): Electrophysiology of the pigeon's habenular nuclei: evidence for pineal connections and input from the visual system. *Brain Res Bull* 12, 115-121.
- 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 pigeon's brain. *J Comp Physiol A* 155, 283-288.
- Seydewitz V., Rothermel A., Fuhrmann S., Schneider A., DeGrip W. J., Layer P. G., Hofmann H.-D. (2004): Expression of CNTF receptor- α in chick violet-sensitive cones with unique morphologic properties. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 655-661.
- Shcherbakov V. P., Winklhofer M. (1999): The osmotic magnetometer: a new model for a magnetite-based magnetoreceptor in animals. *Eur Biophys J* 28, 380-392.
- Shcherbakov D., Winklhofer M., Petersen N., Steidle J., Hilbig R., Blum M. (2005): Magnetosensation in zebrafish. *Curr Biol* 15, 161-162.
- 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.
- Smith E. L., Greenwood V. J., Bennett A. T. (2002): Ultraviolet colour perception in European starlings and Japanese quail. *J Exp Biol* 205, 3299-3306.
- Solovyov I. A., Greiner W. (2007): Theoretical analysis of an iron mineral-based magnetoreceptor model in birds. *Biophys J* 93, 1493-1509.

- Solovjov I. A., Schulten K. (2012): Reaction kinetics and mechanism of magnetic field effects in cryptochrome. *J Phys Chem B* 116, 1089-1099.
- Srygley R. B., Dudley R., Oliveira E. G., Riveros A. J. (2006): Experimental evidence for a magnetic sense in neotropical migrating butterflies (Lepidoptera: Pieridae). *Anim Behav* 71, 183-191.
- Stapput K., Thalau P., Wiltschko R., Wiltschko W. (2010): Magnetoreception of directional information in birds requires nondegraded vision. *Curr Biol* 20, 1259-1262.
- Stark D. (1979): Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionsbiologischer Grundlage. Das Skelettsystem: Allgemeines, Skelettsubstanzen, Skelett der Wirbeltiere einschl. Lokomotionstypen. Bd. 2 aus der Reihe: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionsbiologischer Grundlage. Springer, Berlin.
- Stoneham A. M., Gauger E. M., Porfyrakis K., Benjamin S. C., Lovett B. W. (2012): A new type of radical-pair-based model for magnetoreception. *Biophys J* 102, 961-968.
- Tesch F. W. (1974): Influence of geomagnetism and salinity on the direction choice of eels. *Helgol Meeresunters* 26, 382-392.
- 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. E., Wiltschko R. (2006): The magnetic compass mechanisms of birds and rodents are based on different physical principles. *J R Soc Interface* 22, 583-587.
- Thalau P., Holtkamp-Rötzler E., Fleissner Ge., Wiltschko W. (2007): Homing pigeons (*Columba livia f. domestica*) can use magnetic cues for locating food. *Naturwissenschaften* 94, 813-819.
- Tian L., Xiao B., Lin W., Zhang S., Zhu R., Pan Y. (2007): Testing for the presence of magnetite in the upper beak skin of homing pigeons. *Biometals* 20, 197-203.
- Treiber C. D., Salzer M. C., Riegler J., Edelman N., Sugar C., Breuss M., Pichler P., Cadiou H., Saunders M., Lythgoe M., Shaw J., Keays D. A. (2012): Clusters of iron-rich cells in the upper beak of pigeons are macrophages not magnetosensitive neurons. *Nature* 484, 367-370.
- Vallortigara G., Andrew R. J. (1991): Lateralisation of response by chicks to change in a model partner. *Anim Behav* 41, 187-194.
- Van der Horst M. A., Hellingwerf K. J. (2004): Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res* 37, 13-20.
- Ventura D. F., Zana Y., de Souza J. M., Devoe R. D. (2001): Ultraviolet colour opponency in the turtle retina. *J Exp Biol* 204, 2527-2534.

- Vieira J., Jones A. R., Danon A., Sakuma M., Hoang N., Robles D., Tait S., Heyes D. J., Picot M., Yoshii T., Helfrich-Förster C., Soubigou G., Coppee J. Y., Klarsfeld A., Rouyer F., Scrutton N. S., Ahmad M. (2012): Human cryptochrome-1 confers light independent biological activity in transgenic *Drosophila* correlated with flavin radical stability. PLoS One 7:e31867.
- von Frisch K. (1974): Animal architecture. Hartcourt Brace Jovanovich, New York.
- Wajnberg E., Acosta-Avalos D., Alves O. C., de Oliveira J. F., Srygley R. B., Esquivel D. M. S (2010): Magnetoreception in eusocial insects: an update. J R Soc Interface 7, 207-225.
- Walker M. M. (1984): Learned magnetic field discrimination in the yellowfin thuna, *Thunnus albacares*. J Comp Physiol A 155,673-679.
- 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 J., Pantopoulos K. (2011): Regulation of cellular iron metabolism. Biochem J 434, 365-381.
- Wang S. Z., Adler R., Nathans J. (1992): A visual pigment from chicken that resembles rhodopsin: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. Biochemistry, 31, 3309-3315.
- Watari R., Yamaguchi C., Zemba W., Kubo Y., Okano K., Okano T. (2012): Light-dependent structural change of chicken retinal cryptochrome 4. J Biol Chem 287, 42634-42641.
- Webb J., Evans L. A., Kim K.-S., Pierre T. G. St., Macey D. J. (1991): Controlled deposition and transformation of iron biominerals in chiton radula teeth. In: Suga S., Nakahara H. (1991): Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems. Springer, Tokyo.
- Weltrowski A. (2006): Die Funktion und Struktur des CDF-Proteins CzcD aus *Cubriavidus metallidurans*. Dissertation Halle.
- Wilke M., Farges F., Petit P. E., Brown G., Martin F. (2001): Oxidation state and coordination of Fe in minerals: an Fe K Xanes spectroscopic study. Am Mineral 86, 714-730.
- Wilkie S. E., Visser P. M. A. M., Das D., DeGrip W. J., Bowmaker J. K., Hunt D. M. (1998): The molecular basis for UV vision in birds: spectral characteristics, cDNA sequence and retinal localization of the UV-sensitive visual pigment of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). Biochem J 330, 541-547.
- Williams M. N., Wild J. M. (2001): Trigeminally innervated ironcontaining structures in the beak of homing pigeons, and other birds. Brain Res 889, 243-246.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1995): Magnetic orientation in animals. Zoophysiology 33 Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1998): Pigeon homing: effect of various wavelengths of light during displacement. Naturwissenschaften 85, 164-167.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1999a): Orientierungssystem der Vögel: I. Kompassmechanismen. J Ornithol 140, 1-40.

- Wiltschko R., Wiltschko W. (1999b): Orientierungssystem der Vögel: II. Heimfinden und Navigation. *J Ornithol* 140, 129-164.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1999c): Orientierungssystem der Vögel: III. Zugorientierung. *J Ornithol* 140, 273-308.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (1999d): Orientierungssystem der Vögel: VI. Evolution. *J Ornithol* 140, 393-417.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (2003): Avian navigation: from historical to modern concepts. *Animal Behaviour* 65, 257-272.
- Wiltschko R., Wiltschko W. (2012): The magnetite-based receptors in the beak of birds and their role in avian navigation. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 199, 89-98.
- Wiltschko R., Nohr D., Wiltschko W. (1981): Pigeons with a deficient sun compass use the magnetic compass. *Science* 214, 343-345.
- Wiltschko R., Ritz T., Stapput K., Thalau P., Wiltschko W. (2005): Two different types of light-dependent responses to magnetic fields in birds. *Curr Biol* 15, 1518-1523.
- Wiltschko R., Stapput K., Bischof H. J., Wiltschko W. (2007): Light-dependent magneto-reception in birds: increasing intensity of monochromatic light changes the nature of the response. *Front Zool* 4, 5.
- Wiltschko R., Schiffner I., Fuhrmann P., Wiltschko W. (2010a): The role of the magnetite-based receptors in the beak in pigeon homing. *Curr Biol* 20, 1534-1538.
- Wiltschko R., Stapput K., Thalau P., Wiltschko W. (2010b): Directional orientation of birds by the magnetic field under different light conditions. *J R Soc Interface* 7, 163-177.
- Wiltschko W. (1968). Über den Einfluß statischer Magnetfelder auf die Zugorientierung der Rotkehlchen. *Z Tierpsychol* 25, 537-558.
- Wiltschko W. (1978): Further analysis of the magnetic compass of migratory birds. In: Schmidt-König K., Keeton W. T. (Eds.): *Animal migration, navigation and homing*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 302-310.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1972): Magnetic compass of European robins. *Science* 176, 62-64.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1981): Disorientation of inexperienced young pigeons after transportation in total darkness. *Nature* 291, 433-434.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (1999): The effect of yellow and blue light on magnetic compass orientation in European robins, *Erithacus rubecula*. *J Comp Physiol A* 184, 295-299.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2001): Light-dependent magnetoreception in birds: the behaviour of European robins, *Erithacus rubecula*, under monochromatic light of various wavelengths and intensities. *J Exp Biol* 204, 3295-3302.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2002): Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften* 89, 445-452.

- Wiltschko W., Wiltschko R. (2005): Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *J Comp Physiol A* 191, 675-693.
- Wiltschko W., Wiltschko R. (2007): Magnetoreception in birds: two receptors for two different tasks. *J Ornithol* 148, Suppl. 1, 61-76.
- 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., Munro U., Beason R. C., Ford H., Wiltschko R. (1994): A magnetic pulse leads to a temporary deflection in the orientation of migratory birds. *Experientia* 50, 697-700.
- Wiltschko W., Munro U., Ford H., Wiltschko R. (1998): Effect of a magnetic pulse on the orientation of silvereyes, *Zosterops lateralis*, during spring migration. *J Exp Biol* 201, 3257-3261.
- Wiltschko W., Munro U., Wiltschko R., Kirschvink J. L. (2002a): Magnetite-based magnetoreception in birds: the effect of a biasing field and a pulse on migratory behavior. *J Exp Biol* 205, 3031-3037.
- Wiltschko W., Traudt J., Güntürkün O., Prior H., Wiltschko R. (2002b): Lateralization of magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* 419, 467-470.
- Wiltschko W., Munro U., Hugh F., Wiltschko R. (2003): Lateralisation of magnetic compass orientation in Silvereyes, *Zosterops lateralis*. *Australian J Zool* 51, 597-602.
- 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.
- Wiltschko W., Stapput K., Thalau P., Wiltschko R. (2006): Avian magnetic compass: Fast adjustment to intensities outside the normal functional window. *Naturwissenschaften* 93, 300-304.
- Wiltschko W., Freire R., Munro U., Ritz T., Rogers L. Thalau P., Wiltschko R. (2007a): The magnetic compass of domestic chickens, *Gallus gallus*. *J Exp Biol* 210, 2300-2310.
- Wiltschko W., Ford H., Munro U., Winklhofer M., Wiltschko R. (2007b): Magnetite-based magnetoreception: the effect of repeated pulsing on the orientation of migratory birds. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 193, 515-522.
- Wiltschko W., Munro U., Ford H., Wiltschko R. (2009): Avian orientation: the pulse effect is mediated by the magnetite receptors in the upper beak. *Proc Biol Sci.* 276, 2227-2232.
- Wilzeck C., Wiltschko W., Güntürkün O., Wiltschko R., Prior H. (2010): Lateralization of magnetic compass orientation in pigeons. *J R Soc Interface* 7 Suppl 2, 235-240.
- Winklhofer M., Holtkamp-Rötzler E., Hanzlik M., Fleissner Ge., Petersen N. (2001): Clusters of superparamagnetic magnetite particles in the upper beak skin of homing pigeons: evidence of a magnetoreceptor? *Eur J Mineral* 13, 659-669.
- Yamamoto K., Okano T., Fukada Y. (2001): Chicken pineal Cry genes: light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts. *Neurosci Lett* 313, 13-16.
- Yorke E. D. (1979): A possible magnetic transducer in birds. *J theor Biol* 77, 101-105.

Literatur

- Yoshii T., Ahmad M., Helfrich-Föster C. (2009): Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock. *PLoS Biol* 7, e1000086.
- Young R. W. (1978): The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 105-116.
- Zapka M., Heyers D., Hein C. M., Engels S., Schneider N. L., Hans J., Weiler S., Dreyer D., Kishkinev D., Wild J. M., Mouritsen H. (2009): Visual but not trigeminal mediation of magnetic compass information in a migratory bird. *Nature* 461, 1274-1277.
- Zapka M., Heyers D., Liedvogel M., Jarvis E. D., Mouritsen H. (2010): Night-time neuronal activation of Cluster N in a day- and night-migrating songbird. *Europ J Neurosc* 31, 619-624.
- Zhu H., Green C. B. (2001): Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. *Mol Vis* 7, 210-215.

Anhang

A.1 Allgemeiner Anhang

A. 1.1 Materialien und Geräte

Tab. A.1.1 Primäre Antikörper

Antikörper/Prä-Immuneserum/ Peptid	Spezies	Herkunft der Antikörper
Cry1a-Antiserum	Guinea pig	GENOVAC GmbH, Freiburg, D [*]
Prä-Immuneserum zu Anti-Cry1a Peptid (Antigen) zu Anti-Cry1a	Guinea pig	GENOVAC GmbH, Freiburg, D [*]
Cry1b-Antiserum (GEN)	Rabbit	BioScience, Göttingen, D [*]
Prä-Immuneserum zu Anti-Cry1b (Bio)	Rabbit	BioScience, Göttingen, D [*]
Cry1b-Antiserum (Bio)	Rabbit	GENOVAC GmbH, Freiburg, D [*]
Prä-Immuneserum zu Anti-Cry1b (GEN)	Rabbit	GENOVAC GmbH, Freiburg, D [*]
Peptid von Anti-Cry1b (GEN)		GENOVAC GmbH, Freiburg, D [*]
Antiserum sc-14363	Goat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Antiserum JH492	Rabbit	Hergestellt von J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore; USA
Antiserum Protein-Kinase C	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA
Antiserum E-cadherin	Mouse	BD Transduction Laboratories, Los Angeles, CA, USA
Antiserum RARalpha	Mouse	Abcam, Cambridge, UK
Antiserum Histon H3	Mouse	Sigma, St. Louis, MO, USA
Antiserum Aktin	Rabbit	Sigma, St. Louis, MO, USA
Antiserum MAB 1621	Mouse	Millipore GmbH, D

^{*} Auf Bestellung produziert

Tab. A.1.2 Sekundäre Antikörper und Normal-Seren

Antikörper	Konjugation	Spezies	Firma
Anti-Guinea pig-IgG H+L	Cy3	Goat	Dianova, Hamburg, D
Anti-Guinea pig-IgG H+L	Cy5	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Guinea pig-IgG H+L	Dylight 649	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Guinea pig-IgG H+L	Biotin	Goat	Vector laboratories, Servion, CH
Anti-Guinea pig-IgG H+L	Meerrettichperoxidase	Goat	Dianova, Hamburg, D
Anti-Rabbit-IgG H+L	Rhodamin Red X	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Rabbit-IgG H+L	Cy5	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Rabbit-IgG H+L	Alexa 488	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Rabbit-IgG H+L	Biotin	Goat	Vector laboratories, Servion, CH
Anti-Goat-IgG H+L	Cy3	Donkey	Dianova, Hamburg, D
Anti-Mouse-IgG H+L	Biotin	Horse	Vector laboratories, Servion, CH
Normal-Goat-Serum (NGS)			Vector laboratories, Servion, CH
Normal-Donkey-Serum (NDS)			Dianova, Hamburg, D
Normal-Horse-Serum (NHS)			Vector laboratories, Servion, CH

Tab. A.1.3 Verwendete Chemikalien und Puffer

Name	Firma oder Zusammensetzung
Agar	Merck, Darmstadt, D
Agar Low Viscosity Resin	Plano, Marburg, D
Ammoniumchlorid	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Aqua-Poly-Mount	Polysciences Eppenheim, D
Araldit	Merck, Darmstadt, D
Bleicitrat	Serva, Heidelberg, D
Bovine-Serum-Albumin (BSA, 2%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Cacodylatpuffer	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Diaminobenzidin (0.025%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
di-Natriumtertraborat (2,5%)	Merck, Darmstadt, D
Glutardialdehyd (0,1%)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D
Gold-III-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm, Ulm, D
Hexamethylentetramin (3%)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhexacyanoferrat II (5% KCF II)	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Kupfergrids	Plano, Marburg, D
Luminol (2,5 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos, D
Natriumthiosulfat	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D
Paraffin	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Paraformaldehyd (PFA, 4%)	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
p-Coumarinsäure (0.4 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Phosphat Puffer saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4)	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Pioloform	Plano, Marburg, D
ProteoExtract [®] Subcellular Proteome Extraction Kit manual	Calbiochem, La Jolla, USA
RIPA-Puffer	0.5% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet P 40, 0.1% SDS, 1 mM EDTA in PBS mit Protease Inhibitor (Roche, Grenzach-Wyhlen, D)
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl 5%)	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Silbernitrat	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Star-Frost-Objektträger	Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Waltham, USA
Super-Frost-Plus-Objektträger	Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Waltham, USA
Technovit 7100	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Tissue Freezing Medium	Sakura, Berlin, D
Tris-HCl (100 mM)	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Triton X-100 (0.25%)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, D
Ultraclear	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D
Ultralenfolie	SPEX Certiprep Inc., Metuchen, NJ, USA.
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, D
Vectastain Elite ABC kit	Vector Laboratories Servion, CH
Xylol	Morphisto GmbH, Frankfurt/M, D

Tab. A.1.4 Verwendete Geräte und Software

Name	Firma
Vibratom	Lancer, Bridgeton, MO, USA
Konfokales Laserscanmikroskop (Typ 510 META)	Zeiss, Jena, D
Ultra S-Mikrotom	Reichert-Jung, A und Leica, Wetzlar, D
Transmissions-Elektronenmikroskop (CM12)	Philips, Hamburg, D
LED UV 373 nm (HR 370F)	Lasertechnik, Düren, D
LED Türkis 502 nm (HLMP-CE 30)	Lasertechnik, Düren, D
LED Grün 565 nm (HLMP-3950HP)	Mütron, Achim, D
LED Rot 645 nm (182249)	Conrad, Hirschau, D
Optometer, P9719	Gigahertz Optik, Türkenfeld, D
Zugehöriger Messkopf, RW-3703-2	Gigahertz Optik, Türkenfeld, D
LUX-Messkopf, L-3702-2	Gigahertz Optik, Türkenfeld, D
UV-Messkopf, UV 3701-2	Gigahertz Optik, Türkenfeld, D
Schlittenmikrotom	Leica, Wetzlar, D
Rotationsmikrotom	Leica, Wetzlar, D
Polycut-Ultrafräse	Reichert-Jung, A
Kryostat	Leica, Wetzlar, D
Mikroskop Reichert-Polyvar	Reichert-Jung, A
Application Suite Version 3.5.0	Leica, Wetzlar, D
IMARIS Software	Bitplane AG, Zürich, CH
BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Tab. A.1.5 Proben für die Lokalisation von Cry1a und Cry1b

Tier	R/L	Datum und Uhrzeit	Fixierung	Einbettmedium	Färbungen	Bemerkung
RK A 1	R	29.09.2006, 19:30	4% PFA	-	-	natürlicher Herbstzug
	L	29.09.2006, 19:30	4% PFA	Agarose	Cry1a, Cry1b (GEN) TEM	ingeschläfert wegen gebrochenem Bein
RK A2	R	06.04.2008, 20:00	0,25% GA + 2% PFA	-	-	nicht mehr zugunruhig*
	L	06.04.2008, 20:00	0,25% GA + 2% PFA	Agarose	Cry1a, Cry1b (GEN) TEM	ingeschläfert wegen Muserschwierigkeiten
RK A3	R	21.04.2008, 14:45	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b (bio), Cry1b (GEN)	natürlicher Frühjahrszug
	L	21.04.2008, 14:45	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b (bio), Cry1b (GEN)	Unfall, gegen Scheibe
RK A4	R	09.01.2009, 17:30	-	-	-	zugunruhig, künstlich induziert*
	L	09.01.2009, 17:30	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, sc-14363, JN 492, Cry1b (bio), Cry1b (GEN)	Unfall im Trichter, Präparationsprobleme bei L
RK A5	R	03.10.2009, 12:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1b (Bio), Cry1a, Cry1b (GEN)	natürlicher Herbstzug
	L	03.10.2009, 12:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1b (Bio), Cry1a, Cry1b (GEN)	
RK A6	R	06.04.2010, 13:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, sc-14363, JN492, Cry1b (GEN)	nicht mehr zugunruhig*
	L	06.04.2010, 13:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, sc-14363, JN492, Cry1b (GEN)	Unfall, in Hand gestorben
RK A7	R	18.10.2010, 08:00	-	Zell-Fraktionierung	Cry1a, Cry1b (GEN),	natürlicher Herbstzug
	L	18.10.2010, 08:00	4% PFA	Whole Mount	Cry1a, sc-14363	
	Z	08:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	

RK – Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*), A – Auge, L – linkes Auge, R – rechtes Auge, Z – Zunge, PFA – Paraformaldehyd, GA – Glutardialdehyd. Augen ohne Färbung sind bei 4°C im Kühlschrank unter Zugabe von Natriumazid aufbewahrt. *Hier wurde die Zugunruhe bereits Anfang Januar künstlich ausgelöst. Tiere ohne besondere Bemerkung wurden abgetötet.

Anhang

Tier	Alter	R/L	Datum und Uhrzeit	Fixierung	Einbettmedium	Färbungen	Bemerkung
GG A1	19. Tag	R	18.04.2008, 14:30	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
		L	18.04.2008, 14:30	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
GG A2	19. Tag	R	18.04.2008, 21:00	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
		L	18.04.2008, 21:00	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
GG A3	21. Tag	R	19.04.2008, 02:30	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
		L	19.04.2008, 02:30	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
GG A4	21. Tag	R	19.04.2008, 08:00	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
		L	19.04.2008, 08:00	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b	
GG A5	24 Tage	L	29.10.2008, 08:30	0,25% GA + 2% PFA	Tissue Tec	Cry1b (Bio)	
GG A6	25 Tage	R	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
		L	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
		Z	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
GG A7	25 Tage	R	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
		L	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
		Z	09.12.2008, 11:00		Ripa	Cry1a, Cry1b	
GG A8	5 Monate	R	01.04.2009, 09:00	4% PFA	-	-	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	01.04.2009, 09:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, sc-14363, JN492, Cry1b	
GG A9	5 Monate	R	01.04.2009, 09:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b (Bio)	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	01.04.2009, 09:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b (Bio)	
GG A10	5 Monate	R	01.04.2009, 09:00	4% PFA	-	-	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	01.04.2009, 09:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, Cry1b (Bio)	
GG A11	5 Monate	R	01.04.2009, 09:00		Zell-Fraktionierung		Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	01.04.2009, 09:00		Zell-Fraktionierung		
GG A12	5 Monate	R	01.04.2009, 09:00		Zell-Fraktionierung		Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	01.04.2009, 09:00		Zell-Fraktionierung		
GG A13	1.5 Jahre	R	08.07.2009, 09:00	4% PFA	-	Cry1a, sc-14363	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	08.07.2009, 09:00	4% PFA	-	-	
GG A14	21 Tage	R	21.10.2009, 11:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1b(GEN), Cry1b (Bio)	
		L	21.10.2009, 11:00	4% PFA	Tissue Tec	Cry1b(GEN),	

Anhang

GG A15	21 Tage	R	11:00 21.10.2009,	4% PFA	Tissue Tec	Cry1b (Bio) Cry1b(GEN), Cry1b (Bio)	
		L	11:30 21.10.2009,				
GG A16	1.5 Jahre	R	09:00 24.03.2010,	4% PFA	Tissue Tec	Cry1a, sc- 14363, JN492, Cry1b (GEN)	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	09:00 24.03.2010,				
GG A17	1.5 Jahre	R	09:00 24.03.2010,	4% PFA	Whole Mount	Cry1a, sc- 14363	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	09:00 24.03.2010,				
GG A18	1.5 Jahre	R	09:00 24.03.2010,	4% PFA	-	-	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	09:00 24.03.2010,				
GG A19	26 Tage	R	12:30 30.01.2010,	0,25% GA + 2% PFA	Agarose	Cry1a, Cry1b (GEN)	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	12:30 30.01.2010,				
GG A20	26 Tage	R	12:30 30.01.2010,	0,25% GA + 2% PFA	Agarose	-	Landwirtschaftliche Schlachtung
		L	12:30 30.01.2010,				

GG – Huhn (*Gallus gallus*), A – Auge, L – linkes Auge, R – rechtes Auge, Z – Zunge, PFA – Paraformaldehyd, GA – Glutardialdehyd. Augen ohne Färbung sind bei 4°C im Kühlschrank unter Zugabe von Natriumazid aufbewahrt. GG A14 und GG A15 entsprechen GG UV^S und GG G^S (siehe unten). Tiere ohne besondere Bemerkung wurden mit einer Überdosis Narcoren (Merial GmbH) abgetötet.

Tab. A.1.6 Proben für die Untersuchungen zur Lichtaktivierung von Cry1a

Tier	Alter	Auge	Datum und Uhrzeit	Schnitt oder Whole Mount
GG UV ^S	21 Tage	R	21.10.2009, 11:00	Kryostatschnitte
		L	21.10.2009, 11:00	Kryostatschnitte
GG G ^S	21 Tage	R	21.10.2009, 11:30	Kryostatschnitte
		L	21.10.2009, 11:30	Kryostatschnitte
GG UV ^S	26 Tage	R	30.01.2010, 10:30	Kryostatschnitte, SW 1
		L	30.01.2010, 10:30	Kryostatschnitte, SW 2
GG T ^S	26 Tage	R	30.01.2010, 10:50	Kryostatschnitte, SW 3
		L	30.01.2010, 10:50	Kryostatschnitte, SW 4
GG UV ^{XS}	26 Tage	R	30.01.2010, 11:20	Kryostatschnitte, SW 3
		L	30.01.2010, 11:20	Kryostatschnitte, SW 4
GG T ^L	26 Tage	R	30.01.2010, 11:35	Kryostatschnitte, SW 1
		L	30.01.2010, 11:35	Kryostatschnitte, SW 2
GG G ^S	26 Tage	R	30.01.2010, 11:50	Kryostatschnitte, SW 1
		L	30.01.2010, 11:50	Kryostatschnitte, SW 2
GG G ^L	26 Tage	R	30.01.2010, 12:05	Kryostatschnitte, SW 3
		L	30.01.2010, 12:05	Kryostatschnitte, SW 4
GG R ^S	26 Tage	R	30.01.2010, 12:20	Kryostatschnitte, SW 1
		L	30.01.2010, 12:20	Kryostatschnitte, SW 2
GG R ^S	23 Tage	R	09.02.2011, 12:15	Whole Mount
		L	09.02.2011, 12:15	Whole Mount
GG UV ^{XS}	23 Tage	R	09.02.2011, 12:25	Whole Mount
		L	09.02.2011, 12:25	Whole Mount
GG UV ^S	23 Tage	R	09.02.2011, 12:35	Whole Mount

Anhang

		L	09.02.2011, 12:35	Whole Mount
GG D	23 Tage	R	09.02.2011, 12:45	Whole Mount
		L	09.02.2011, 12:45	Whole Mount
GG G ^L	23 Tage	R	09.02.2011, 13:40	Whole Mount
		L	09.02.2011, 13:40	Whole Mount
GG T ^S	23 Tage	R	09.02.2011, 13:50	Whole Mount
		L	09.02.2011, 13:50	Whole Mount
GG G ^S	23 Tage	R	09.02.2011, 14:00	Whole Mount
		L	09.02.2011, 14:00	Whole Mount
GG T ^L	23 Tage	R	09.02.2011, 14:10	Whole Mount
		L	09.02.2011, 14:10	Whole Mount
GG S	23 Tage	R	09.02.2011, 14:20	Whole Mount
		L	09.02.2011, 14:20	Whole Mount
GG G ^{XL}	23 Tage	R	09.02.2011, 14:30	Whole Mount
		L	09.02.2011, 14:30	Whole Mount
GG D	23 Tage	R	04.04.2012, 10:30	Whole Mount
		L	04.04.2012, 10:30	Whole Mount
GG UV ^{XS}	23 Tage	R	04.04.2012, 10:50	Whole Mount
		L	04.04.2012, 10:50	Whole Mount
GG D/UV ^{XS}	23 Tage	R	04.04.2012, 11:05	Whole Mount
		L	04.04.2012, 11:05	Whole Mount
GG 1hUV ^{XS}	23 Tage	R	04.04.2012, 11:25	Whole Mount
		L	04.04.2012, 11:25	Whole Mount
GG UV ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 11:30	Whole Mount
		L	04.04.2012, 11:30	Whole Mount
GG UV ^M	23 Tage	R	04.04.2012, 11:50	Whole Mount
		L	04.04.2012, 11:50	Whole Mount
GG R ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 12:10	Whole Mount
		L	04.04.2012, 12:10	Whole Mount
GG G ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 14:00	Whole Mount
		L	04.04.2012, 14:00	Whole Mount
GG T ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 14:05	Whole Mount
		L	04.04.2012, 14:05	Whole Mount
GG D/G ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 14:20	Whole Mount
		L	04.04.2012, 14:20	Whole Mount
GG D/T ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 14:40	Whole Mount
		L	04.04.2012, 14:40	Whole Mount
GG 1hG ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 14:50	Whole Mount
		L	04.04.2012, 14:50	Whole Mount
GG 1hT ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 15:10	Whole Mount
		L	04.04.2012, 15:10	Whole Mount
GG G ^L	23 Tage	R	04.04.2012, 15:20	Whole Mount
		L	04.04.2012, 15:20	Whole Mount
GG B ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 15:40	Whole Mount
		L	04.04.2012, 15:40	Whole Mount
GG T ^L	23 Tage	R	04.04.2012, 15:50	Whole Mount
		L	04.04.2012, 15:50	Whole Mount
GG G ^{XL}	23 Tage	R	04.04.2012, 16:05	Whole Mount
		L	04.04.2012, 16:05	Whole Mount
GG T ^{XL}	23 Tage	R	04.04.2012, 16:30	Whole Mount
		L	04.04.2012, 16:30	Whole Mount
GG 1hB ^S	23 Tage	R	04.04.2012, 16:40	Whole Mount
		L	04.04.2012, 16:40	Whole Mount
GG S	23 Tage	R	04.04.2012, 17:45	Whole Mount

Anhang

		L	04.04.2012, 17:45	Whole Mount
GG D	17 Tage	R	26.08.2012, 14:00	Whole Mount
		L	26.08.2012, 14:00	Whole Mount
GG Y ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 10:10	Whole Mount
		L	27.08.2012, 10:10	Whole Mount
GG 1hUV ^{XS}	18 Tage	R	27.08.2012, 10:20	Whole Mount
		L	27.08.2012, 10:20	Whole Mount
GG Y ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 10:30	Whole Mount
		L	27.08.2012, 10:30	Whole Mount
GG D/UV ^{XS}	18 Tage	R	27.08.2012, 10:55	Whole Mount
		L	27.08.2012, 10:55	Whole Mount
GG 1hB ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 11:10	Whole Mount
		L	27.08.2012, 11:10	Whole Mount
GG B ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 11:25	Whole Mount
		L	27.08.2012, 11:25	Whole Mount
GG D/B ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 11:40	Whole Mount
		L	27.08.2012, 11:40	Whole Mount
GG D/B ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 11:50	Whole Mount
		L	27.08.2012, 11:50	Whole Mount
GG 1hG ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 12:10	Whole Mount
		L	27.08.2012, 12:10	Whole Mount
GG 1hT ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 12:20	Whole Mount
		L	27.08.2012, 12:20	Whole Mount
GG D/G ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 12:40	Whole Mount
		L	27.08.2012, 12:40	Whole Mount
GG D/T ^S	18 Tage	R	27.08.2012, 12:50	Whole Mount
		L	27.08.2012, 12:50	Whole Mount
GG B ^L	18 Tage	R	27.08.2012, 13:10	Whole Mount
		L	27.08.2012, 13:10	Whole Mount
GG B ^{XL}	18 Tage	R	27.08.2012, 13:20	Whole Mount
		L	27.08.2012, 13:20	Whole Mount
GG B ^L	18 Tage	R	27.08.2012, 13:30	Whole Mount
		L	27.08.2012, 13:30	Whole Mount
GG T ^L	18 Tage	R	27.08.2012, 13:50	Whole Mount
		L	27.08.2012, 13:50	Whole Mount
GG D/5minUV ^{XS}	18 Tage	R	27.08.2012, 14:10	Whole Mount
		L	27.08.2012, 14:10	Whole Mount
GG D/5minUV ^{XS}	18 Tage	R	27.08.2012, 14:25	Whole Mount
		L	27.08.2012, 14:25	Whole Mount
GG S	18 Tage	R	27.08.2012, 15:00	Whole Mount
		L	27.08.2012, 15:00	Whole Mount

Die Fixierung aller Proben erfolgte in 4% PFA. Zum Schneiden wurden die Proben in Tissue Tec eingebettet. SW – Sandwich. Hierfür wurden immer drei bzw. vier Proben auf einmal geschnitten und demzufolge auch auf einem Objektträger gefärbt. GG – Huhn (*Gallus gallus*), UV – Ultraviolett, B – Blau, T – Türkis, G – Grün, Y – Gelb, R (in Spalte Tier) – Rot, D – Dunkel, S – Sonne, 1h – Zeitverlängerung von 30 min auf 1 h, D/ - im Dunkeln für 30 min vorbehandelt, R (in Spalte Auge) – rechtes Auge, L – linkes Auge, ^{XS} – $0,8 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$, ^S – 8×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$, ^M – 20×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$, ^L – 54×10^{15} quanta $s^{-1}m^{-2}$, ^{XL} – $\geq 200 \times 10^{15}$ quanta $s^{-1}m^{-2}$. Zu Abkürzungen und Versuchsbedingungen siehe auch Tab. 2.1.

Tab. A.1.7 Proben für die Untersuchungen an adulten Schnäbeln

Tier	Alter	Datum und Uhrzeit	Fixierung	Einbettung	Methode
GG AS 1	1,5 Jahre	01.04.2009, 13:00	Perf. 4% PFA	Paraffin	BB/ μ -XRF, μ -XANES
GG AS 2	9 Monate	21.07.2009, 11:00	Perf. 4% PFA	Technovit 7100	BB/ μ -XRF, μ -XANES
GG AS 3	1,5 Jahre	27.05.2009, 09:00	Imm. 4% PFA	Technovit 7100	BB,
GG AS 4	1,5 Jahre	27.05.2009, 09:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB / MAB 1621
GG AS 5	1,5 Jahre	27.05.2009, 09:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG AS 6	1,5 Jahre	27.05.2009, 09:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB, Kern
GG AS 7	1,5 Jahre	07.04.2010, 09:00	Imm. 4% GA	Araldit	TEM

GG – Huhn (*Gallus gallus*), A – Adult, S – Schnabel, PFA – Paraformaldehyd, GA – Glutardialdehyd, Perf – Perfusionsfixiert, Imm – Immersionsfixiert, BB – Berliner-Blau-Färbung, μ -XRF – X-ray fluorescence analysis, μ -XANES – X-ray fluorescence analysis, Kern – Kernechtrot.

Tab. A.1.8 Proben für die Untersuchungen an juvenilen Schnäbeln

Tier	Alter	Datum und Uhrzeit	Fixierung	Einbettung	Methode
GG OS 1	1 Tag	18.01.2011, 12:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 2	1 Tag	18.01.2011, 12:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 3	1 Tag	18.01.2011, 12:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 4	5 Tage	06.04.2008, 08:30	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB, dok
GG OS 5	5 Tage	27.10.2008, 08:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB, immun
GG OS 6	5 Tage	31.10.2008, 13:30	Perf. 4% PFA	Paraffin	BB, dok, μ -XRF, μ -XANES, Kern
GG OS 7	5 Tage	12.10.2010, 12:00	Perf. 4% PFA	Paraffin	BB, μ -XRF, μ -XANES
GG OS 8	5 Tage	22.01.2011, 11:00	Imm. 4% GA	Araldit	TEM
GG OS 9	10 Tage	08.04.2008, 08:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 10	12 Tage	10.04.2008, 08:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB, dok
GG OS 11	12 Tage	31.10.2008, 16:00	Perf. 4% PFA	Paraffin	BB, dok, μ -XRF, μ -XANES
GG OS 12	15 Tage	13.04.2008, 21:30	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 13	21 Tage	19.04.2008, 08:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 14	21 Tage	20.10.2008, 16:30	Perf. 4% PFA	Paraffin	BB, dok, μ -XRF, μ -XANES
GG OS 15	21 Tage	19.04.2008, 02:30	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 16	29 Tage	07.11.2007, 18:00	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB
GG OS 17	30 Tage	07.11.2007, 17:30	Imm. 4% PFA	Paraffin	BB

GG – Huhn (*Gallus gallus*), O – Ontogenie/Entwicklung, S – Schnabel, PFA – Paraformaldehyd, GA – Glutardialdehyd, Perf – Perfusionsfixiert, Imm – Immersionsfixiert, BB – Berliner-Blau-Färbung, dok – vollständig dokumentiert, μ -XRF – X-ray fluorescence analysis, μ -XANES – X-ray fluorescence analysis, Kern – Kernechtrot.

A.1.2 Beschreibung der Versuchstierarten

A.1.2.1 Das Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*)

Das Rotkehlchen gehört systematisch in die Ordnung der Passeriformes (Sperlingsvögel), in die Familie der Turridae (Drosselvögel) und dort in die Unterfamilie der Erithacinae (Schmätzer). Hauptmerkmal ist die orangefarbene Brust (Abb. A 1.1). Es wird ca. 14 cm groß und erreicht ein Gewicht von 9,5 g - 25 g. Bei Rotkehlchen gibt es keinen Geschlechtsdimorphismus. Die Jungvögel sind auf der Oberseite hell gefleckt, die Brust ist ingwerfarben mit dunkler Querfleckung (Glutz v. Blotzheim 1988; Hayman & Hume 2003).



Abb. A 1.1 Das Rotkehlchen (Foto: K. Stapput).

Rotkehlchen sind in ganz Europa bis nach Westsibirien hinein und bis nach Nordafrika verbreitet. In Mittel-, West-, und Nordeuropa gehören sie zu den häufigsten Brutvögeln. Das Brutgebiet zieht sich von Fennoskandien bis Nordafrika, Tunesien und Marokko und auf der Ost-West-Achse von Westeuropa bis Westsibirien (siehe Abb. A 1.2).

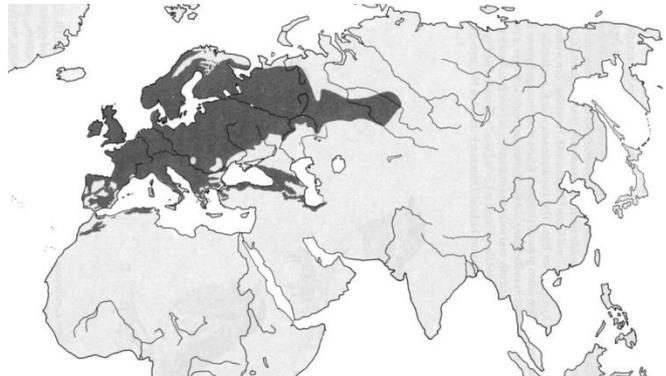


Abb. A 1.2 Brutareal des Rotkehlchens (verändert nach Glutz v. Blotzheim 1988).

Rotkehlchen sind Zugvögel, allerdings sogenannte Teilzieher. In den wärmeren Teilen des Verbreitungsgebietes ziehen Rotkehlchen nicht und bleiben ihren Revieren oft über mehrere Jahre treu. (Drost & Schütz 1932, Lack 1946). Nördliche und höher gelegene Teile des Brutareals werden allerdings im Herbst Richtung Süd-West und Süd-Süd-West weitgehend verlassen. So ziehen Rotkehlchen der Brutpopulation aus Südnorwegen, Süd- und Mittelschweden und Südwestfinland beispielsweise bis Portugal, bis zur Nordküste Afrikas und nach Sizilien (Glutz v. Blotzheim 1988). Der Herbstzug beginnt im August, der Hauptzug ist im September und Oktober. Anfang November lässt die Zugruhe dann nach. Der Frühjahrszug beginnt Februar bis März und endet je nach zurückzulegender Zugstrecke. Rotkehlchen ziehen abends und in der Nacht. Das Zugprogramm wird durch Umwelteinflüsse, aber auch durch endogene Rhythmen gesteuert (Berthold 1990). In der

Bundesrepublik Deutschland sind Rotkehlchen in tieferen Lagen verbreitet und weitgehend ein Standvogel.

A.1.2.2 Das Huhn (*Gallus gallus*)

Hühner gehören in die Ordnung der Galliformes (Hühnervögel) und in die Familie der Phasianidae (Fasanenartigen), der größten innerhalb der Galliformes. Hühnervögel sind Bodenvögel, und nahezu alle Arten sind Standvögel. Sie haben kurze, etwas gebogene Schnäbel, die es ermöglichen Nahrung aus dem Boden zu scharren. Auch die Füße sind hierfür ausgelegt, sie sind groß und kräftig (Abb. A 1.3). Sie sind Samen- und



Abb. A 1.3 Das Huhn (Foto P. Munck).

Grünpflanzenfresser, ergänzen dies aber auch durch tierische Nahrung. Die Küken aller Arten sind ausgesprochene Nestflüchter, deren gesamte Entwicklung (beispielsweise die Gefiederentwicklung) hieran angepasst ist. Es gibt bei den Galliformes einen deutlichen Sexualdimorphismus in Größe, Färbung und Ausbildung besonderer Gefieder- und Hautstrukturen (Glutz von Blotzheim 1981).

Das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) stammt ursprünglich vom Bankivahuhn ab, dessen rezentes Verbreitungsgebiet von Südostasien bis Südchina reicht. Bereits 500 v. Chr. berichteten griechische Schriftsteller über verschiedene Hühnerrassen, und auch die Römer (50 n. Chr.) hielten schon neun Rassen in ihren Schriften fest. Schon früh wurden Hühner auf Farben, Gestalt oder Verhaltensweisen gezüchtet. Heute wird zwischen Ausstellungsrassen und Wirtschaftsrassen unterschieden. Ausstellungsrassen werden nach dem Rassestandard des Bundes Deutscher Rassegeflügelzüchter nach Mittelmeerrassen, Rassen mit Hauben, Rassen im Kampfhuhntypus, Rassen mit massiger Würfelform (auch asiatische Rasse genannt), moderne Rassen mit asiatischem Blut und Zwergassen eingeteilt. Bei Wirtschaftsrassen gibt es die mit hoher Legeleistung, Rassen mit Doppelleistung Eier und Fleisch und Mastrassen. Diese können nach Farb- oder Formbesonderheiten unterschieden und benannt werden (Hein 1961). In meiner Arbeit habe ich ausschließlich Wirtschaftsrassen verwendet, nämlich auf Legeleistung gezüchtete Hühner wie die Rassen Lohmann Brown und White Leghorn.

A.2 Anhang zur Struktur der Magnetrezeptoren im Auge

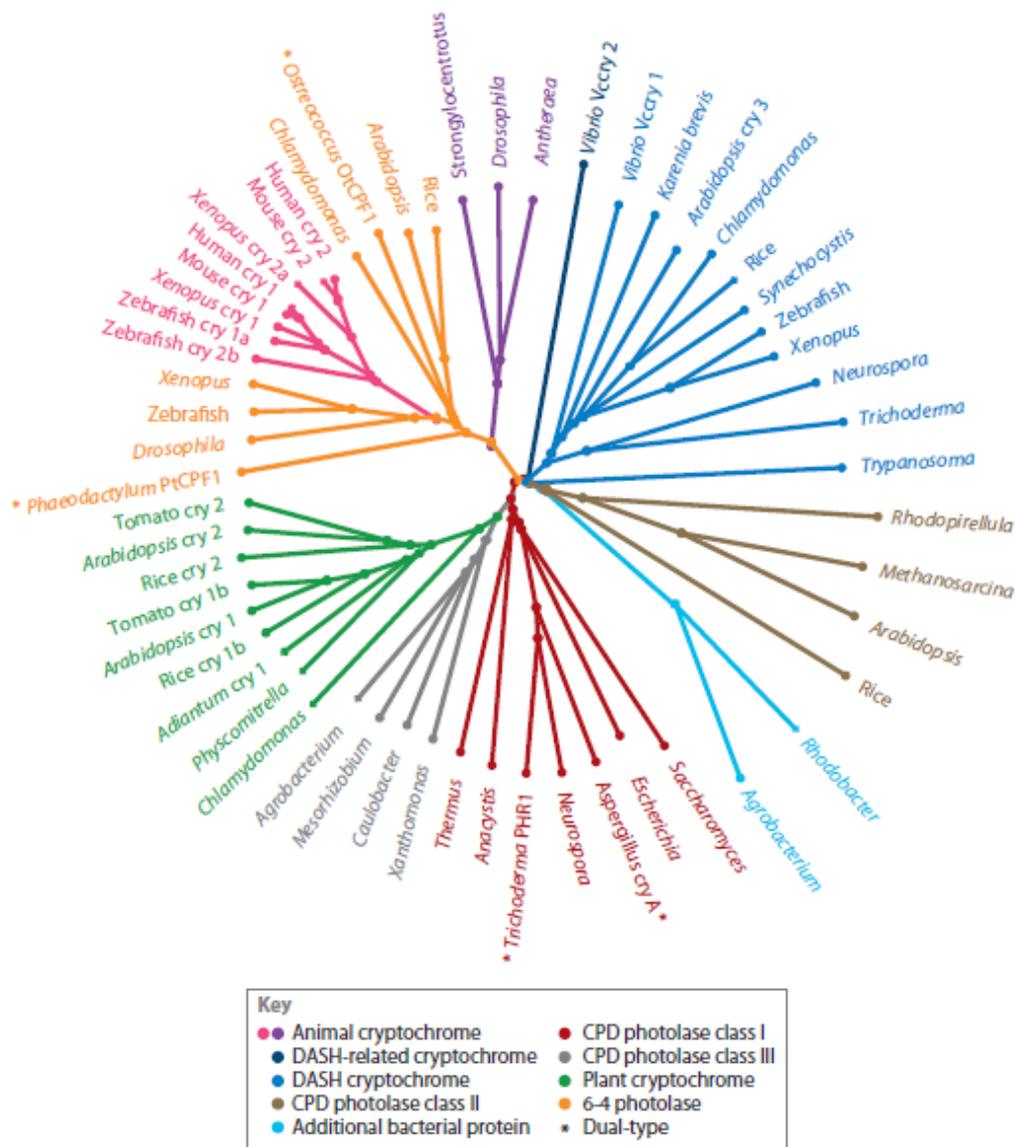


Abb. A 2.1 Phylogenetischer Stammbaum der Cryptochrome und Photolyasen. Die Cryptochrom/Photolyase-Familie besteht aus pflanzlichen Cryptochromen (grün), zwei Gruppen von tierischen Cryptochromen (pink und violett), DASH-Cryptochromen (hellblau) und ähnlichen Proteinen (dunkelblau), CPD-Photolyasen der Klassen I (rot), II (braun) und III (grau), (6-4) Photolyasen (orange) und bakteriellen Proteinen, die vermutlich eine eigene Gruppe bilden (türkis). Die tierischen Cryptochrome sind am nächsten mit den (6-4)-Photolyasen verwandt. Die in dieser Arbeit untersuchten Cryptochrom 1 Splice-Formen, Cry1a und Cry1b, von Hühnern und Rotkehlchen gehören in die Gruppe der tierischen Cryptochrome in Pink (aus Chaves et al. 2011).

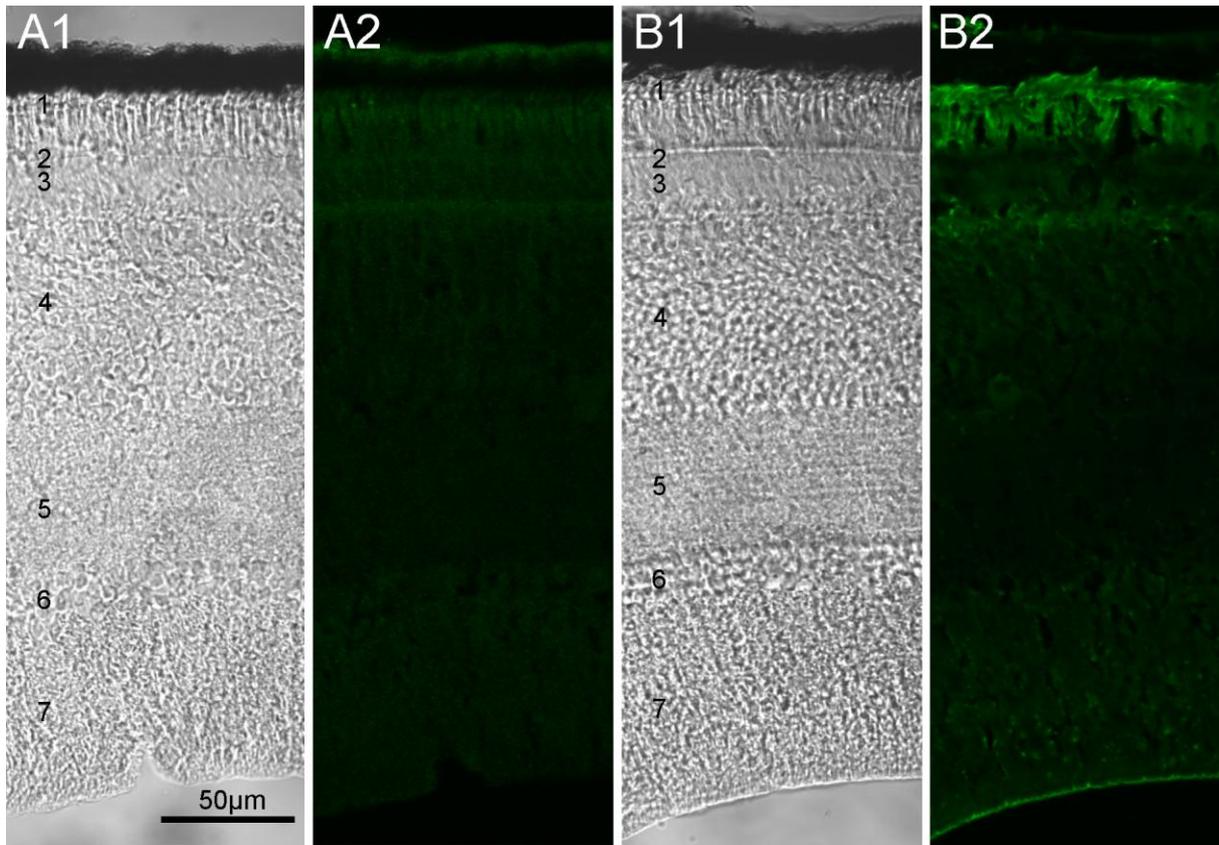


Abb. A 2.2 Kontrolle für Anti-Cry1b (GEN) zur Spezifität des sekundären Antikörpers und Kontrolle mit Prä-Immuserum an einer Rotkehlchenretina. (A1, B1) Phasenkontrastmikroskopie mit den verschiedenen Schichten der Retina: 1 Außen- und Innensegment des Fotorezeptors mit den Öltröpfchen in der Mitte; 2 äußere Körnerschicht; 3 äußere plexiforme Schicht; 4 innere Körnerschicht; 5 innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht; 7 Sehnerv. (A2) Kontrolle ohne Inkubation des Gewebes des primären Antikörpers, um unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper (*Anti-rabbit* gebunden an Rhodamin Red X) ausschließen zu können. (B2) Kontrolle mit dem Prä-Serum, das dem Tier vor der Immunisierung mit dem Antigen entnommen wurde, um unspezifische Bindungen von vorher bereits vorhandenen Antikörpern aus dem Serum auszuschließen. Beide Kontrollen zeigen keinerlei unspezifische Bindungen.

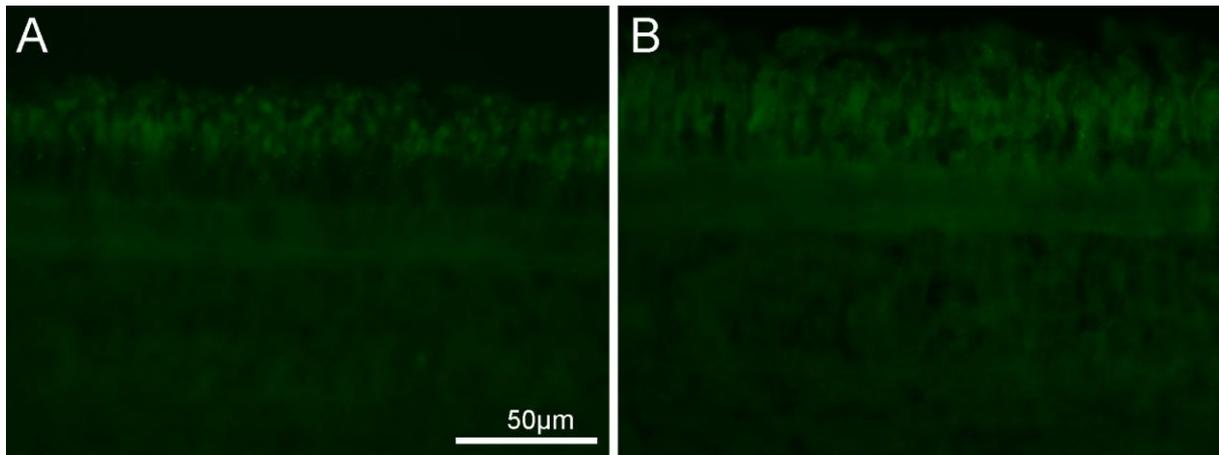


Abb. A 2.3 Kontrollen zur Spezifität von Anti-Cry1b (Bio) an einer Hühnerretina. (A) Kontrolle der Spezifität der sekundären Antikörper. Hierfür entfällt die Inkubation mit dem primären Antikörper in der Immunfärbung, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers auszuschließen. (B) Kontrolle mit dem Prä-Serum, das dem Tier vor der Immunisierung mit dem Antigen entnommen wurde, um unspezifische Bindungen von vorher bereits vorhandenen Antikörpern aus dem Serum auszuschließen. Beide Kontrollen zeigen keine unspezifischen Bindungen.

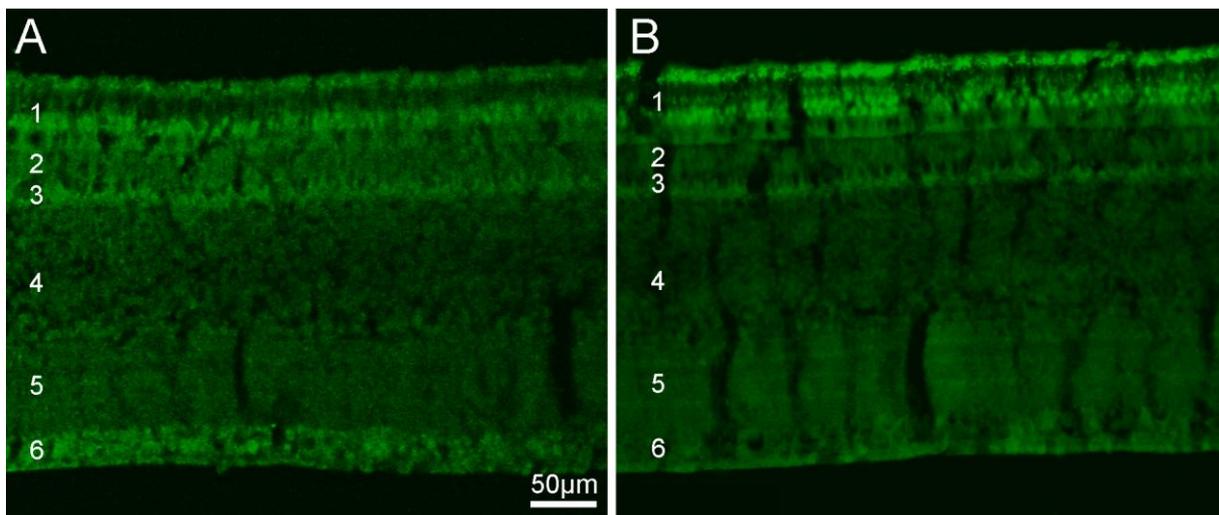


Abb. A 2.4 Markierung der Retina eines Rotkehlchens, das ca. 4 Wochen nach der Zugzeit entnommen wurde, mit Anti-Cry1b (GEN). (A) Immunmarkierung mit Anti-Cry1b (GEN) und (B) Kontrolle mit Prä-Serum. Für diese Kontrolle wird der primäre Antikörper durch Serum des entsprechenden Tieres, das vor der Immunisierung entnommen wurde, ersetzt. Dies dient der Kontrolle von unspezifischen Bindungen durch bereits bestehende Antikörper des Tieres. Bei diesem Rotkehlchen liegt Cry1b nur noch sehr schwach in den Ganglienzellen vor. Das Signal in den Innensegmenten der Fotorezeptoren ist unspezifisch (siehe auch Kontrolle). Das etwas stärkere Signal der Fotorezeptor-Innensegmente in der Kontrolle ist auf die Aufreinigung des Antikörpers zurückzuführen. Die Aufreinigung, bei der unspezifische Antikörper ausgefiltert werden, wird ausschließlich mit dem Antikörper und nicht mit dem Prä-Serum durchgeführt. Verschiedenen Schichten der Retina: 1 Fotorezeptoren; 2 äußere Körnerschicht; 3 äußere plexiforme Schicht; 4 innere Körnerschicht; 5 innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht.

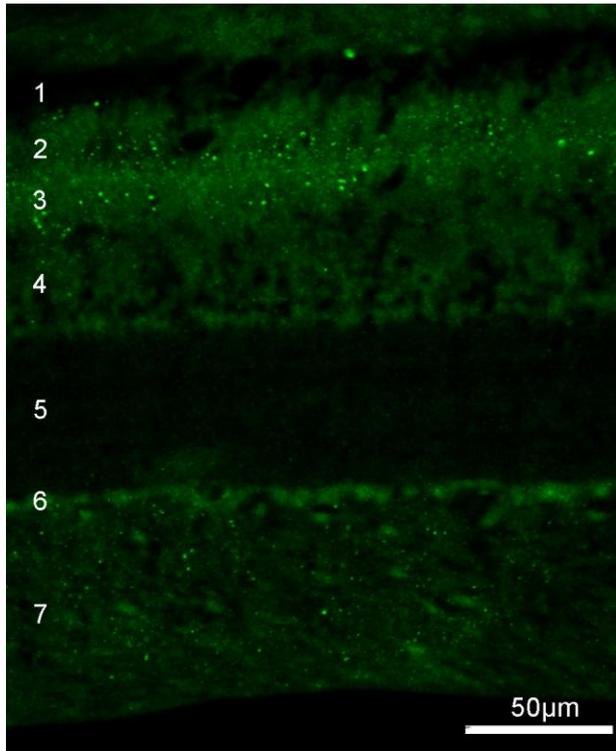


Abb. A 2.5 Lokalisation von Cry1b in der Retina von Hühnern. Die Hühnerretina enthält keine erkennbare Immunmarkierung, allerdings stimmt die Aminosäuresequenz von Cry1b im Huhn nicht mit dem Antigen des Antikörpers überein. Die Zellschichten der Retina sind mit Zahlen gekennzeichnet: 1 Fotorezeptoren; 2 Äußere Körnerschicht; 3 Äußere plexiforme Schicht; 4 Innere Körnerschicht; 5 Innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht; 7 Sehnerv.

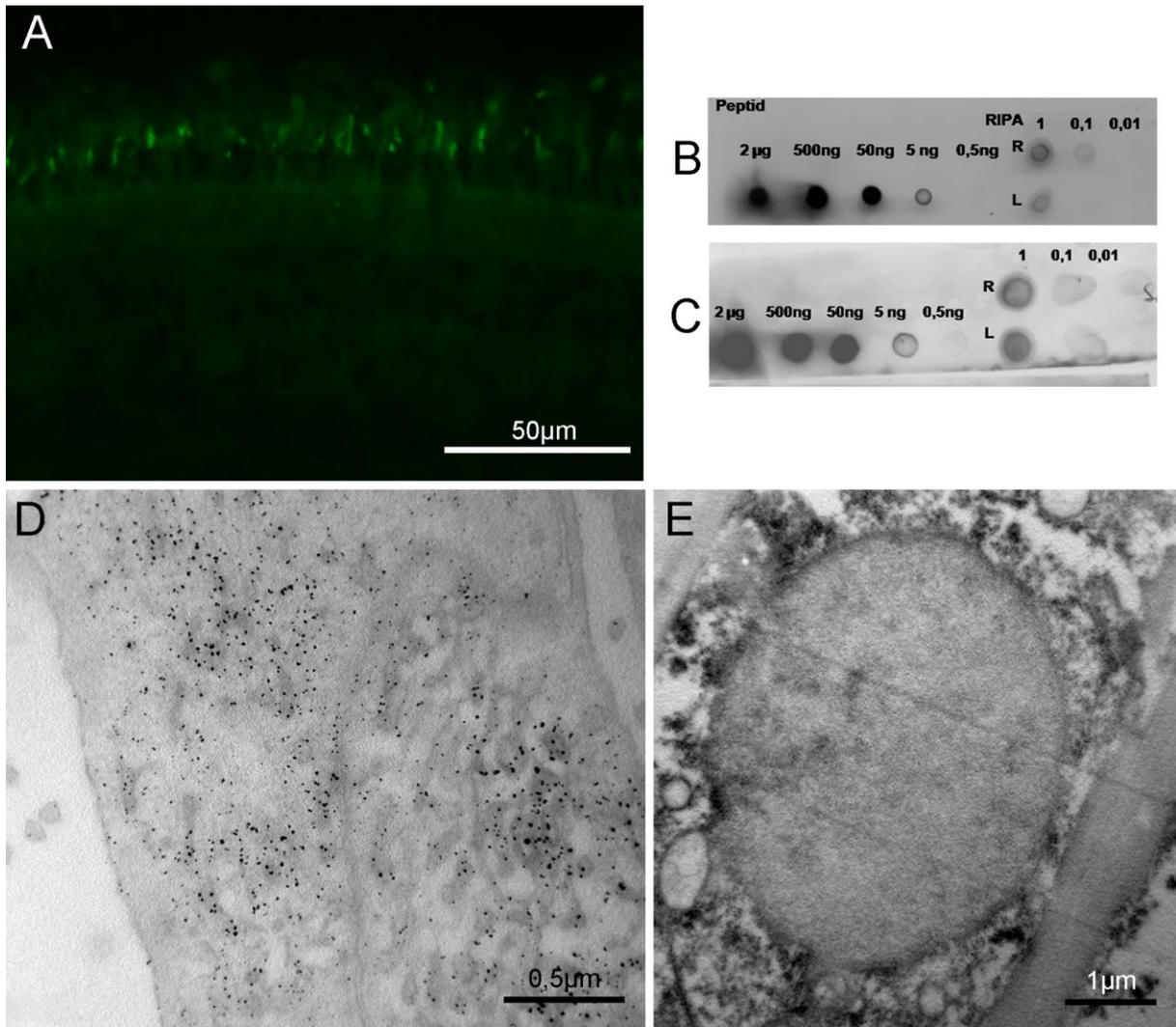


Abb. A.2.6 Immunhistologische Markierung der Retina vom Huhn (lichtmikroskopisch) und der Retina vom Rotkehlchen (elektronenmikroskopisch) mit Anti-Cry1b (Bio). Dot Blots zum Vergleich der Bindungseigenschaften von Anti-Cry1b (Bio) und Anti-Cry1b (GEN). (A) lichtmikroskopisches Bild einer Hühnerretina mit Anti-Cry1b (Bio) markiert. Cry1b ist in den Innensegmenten vieler Fotorezeptoren lokalisiert. **Dot Blots von (B) Anti-Cry1b (GEN) und durch (C) Anti-Cry1b (Bio) gegen das Peptid von Anti-Cry1b (GEN) und gegen das lysierte Retinagewebe (Ripa); beides in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen. Die beiden Antikörper weisen das Antigen nach, zu erkennen am dunklen Farbniederschlag. (D) und (E) elektronenmikroskopische Immunfärbung der Retina eines Rotkehlchen mit Anti-Cry1b (Bio) aus meiner Diplomarbeit. Die dunklen Punkte bestehen aus Diaminobenzidin und einer Silberintensivierung und markieren Cry1b. (D) Innensegment eines Fotorezeptors; (E) Ganglienzelle. Cry1b liegt in beiden Zellen zytosolisch, aber auch membran-assoziiert vor.**

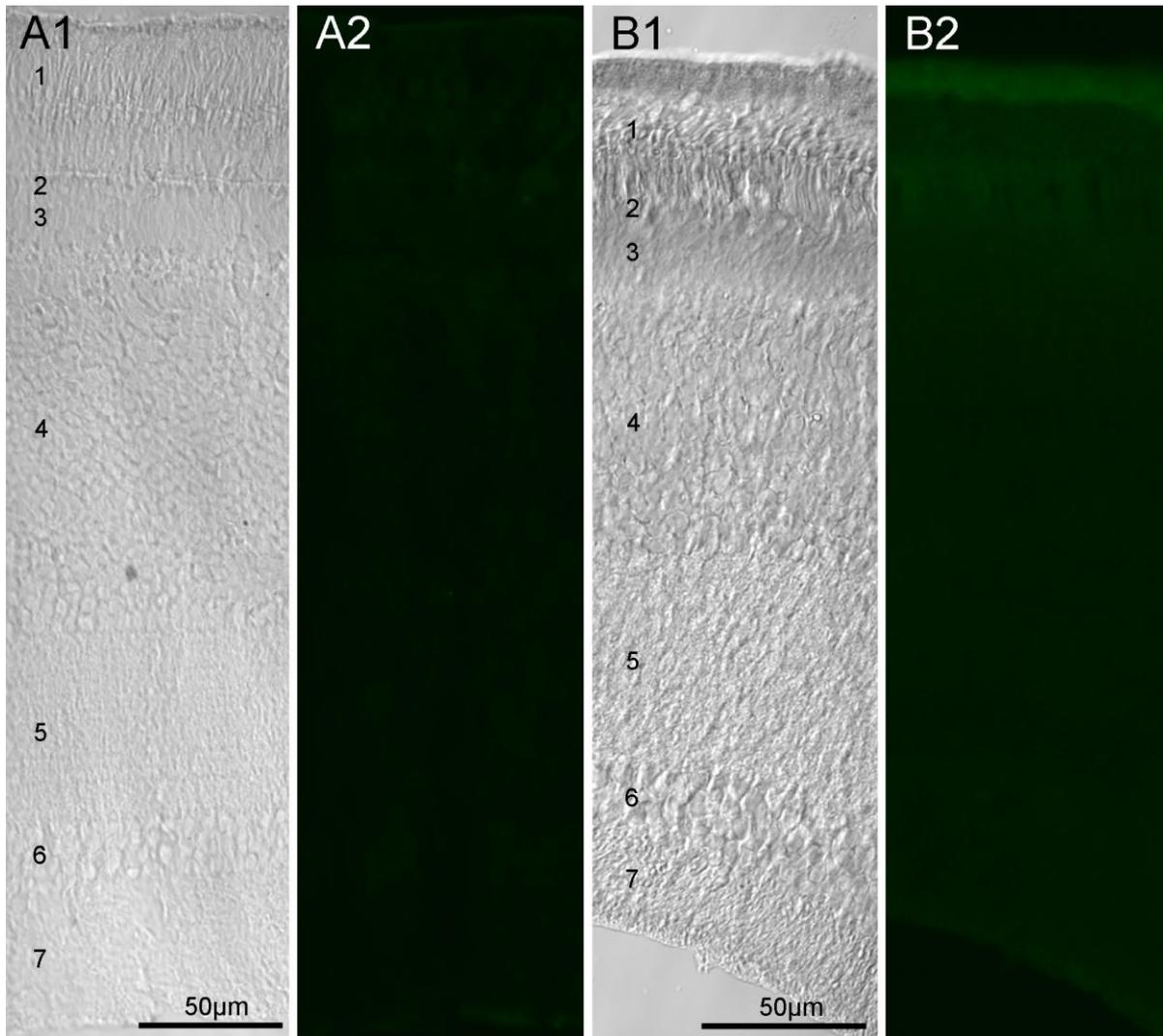


Abb. A 2.7 Prä-Immunsereum und Peptid-Kontrolle für Cry1a am Beispiel einer Rotkehlchen-retina. (A1, B1) Phasenkontrastmikroskopie mit den verschiedenen Schichten der Retina, die in Abb. A 2.2 beschrieben sind. (A2) Kontrolle mit dem Prä-Serum, das dem Tier vor der Immunisierung mit dem Antigen entnommen wurde, um unspezifische Bindungen von vorher bereits vorhandenen Antikörpern aus dem Serum auszuschließen. (B2) Kontrolle, bei der der primäre Antikörper mit dem spezifischen Peptid gebunden wurde. In dieser Kontrolle wird gezeigt, dass keine weiteren Antikörper im Serum an die Retina binden. Beide Kontrollen zeigen keinerlei unspezifische Bindungen.

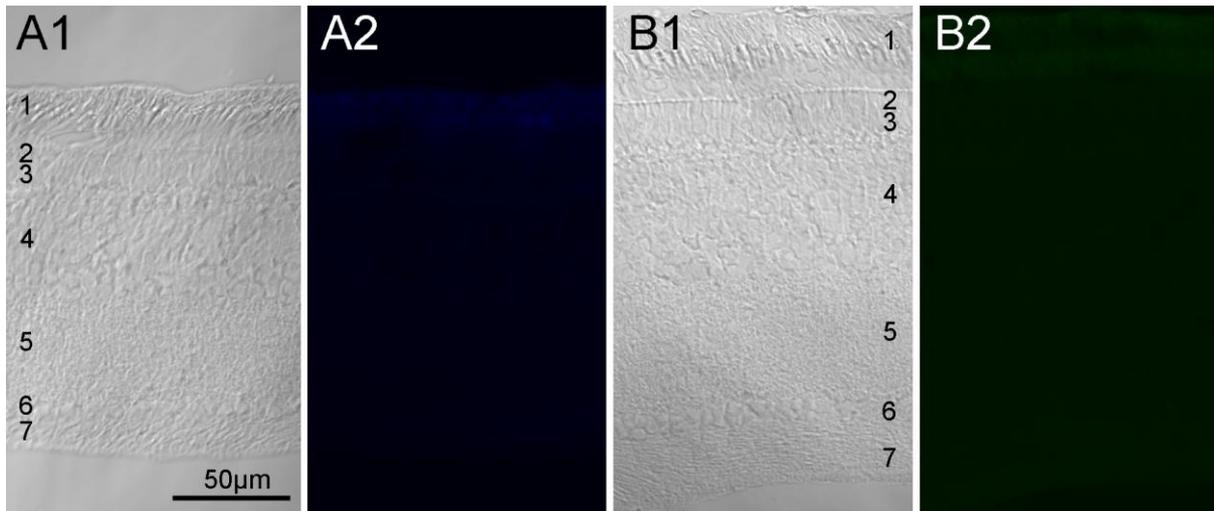


Abb. A 2.8 Kontrolle der Spezifität der sekundären Antikörper am Beispiel einer Rotkehlchenretina. Das Gewebe wurde in der Immunfärbung ohne die primären Antikörper gefärbt, um unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper ausschließen zu können. (A1, B1) Phasenkontrastmikroskopie mit den verschiedenen Schichten der Retina, die in Abb. A 2.2 beschrieben wurden; (A2) Anti-*goat* (CY3) und (B2) Anti-*guinea pig* (CY5). Beide sekundäre Antikörper zeigen keine unspezifischen Bindungseigenschaften.

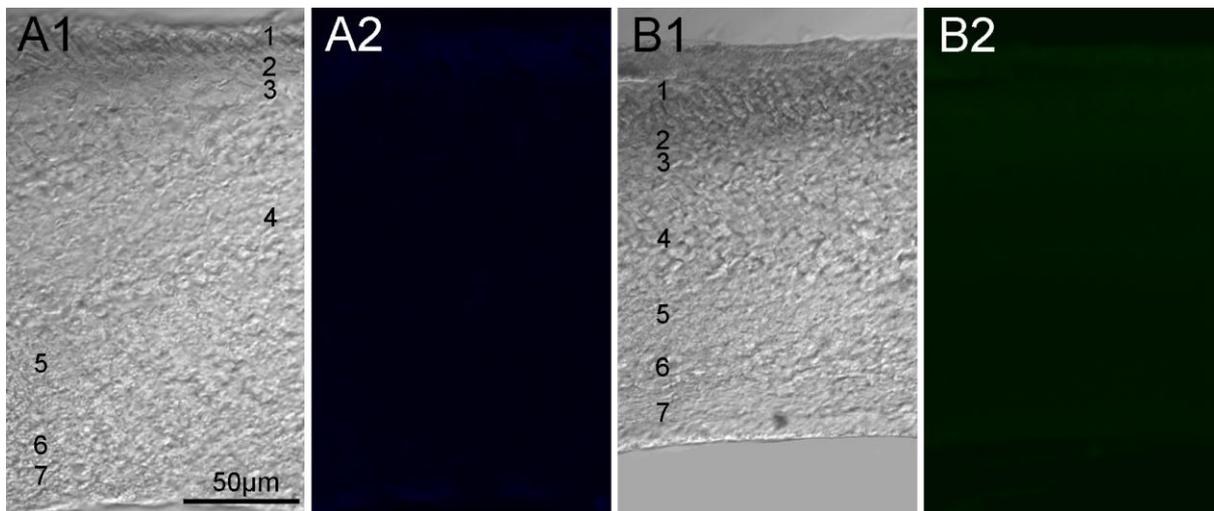


Abb. A 2.9 Kontrolle, dass keine Kreuzreaktionen zwischen den primären Antikörpern und den jeweils anderen sekundären Antikörpern in der Doppelfärbung bestehen, am Beispiel einer Rotkehlchenretina. (A1, B1) Phasenkontrastmikroskopie mit den verschiedenen Schichten der Retina, beschrieben in Abb. A 2.2. (A2) Kombination aus dem primären Antikörper Anti-Cry1a aus *guinea pig* mit dem anti-*goat*-sekundären Antikörper. (B2) Kombination aus dem primären Antikörper sc-14363 aus *Goat* mit dem anti-*guinea pig*-sekundären Antikörper. Die Kontrollen zeigen, dass die Antikörper nicht kreuzreagieren.

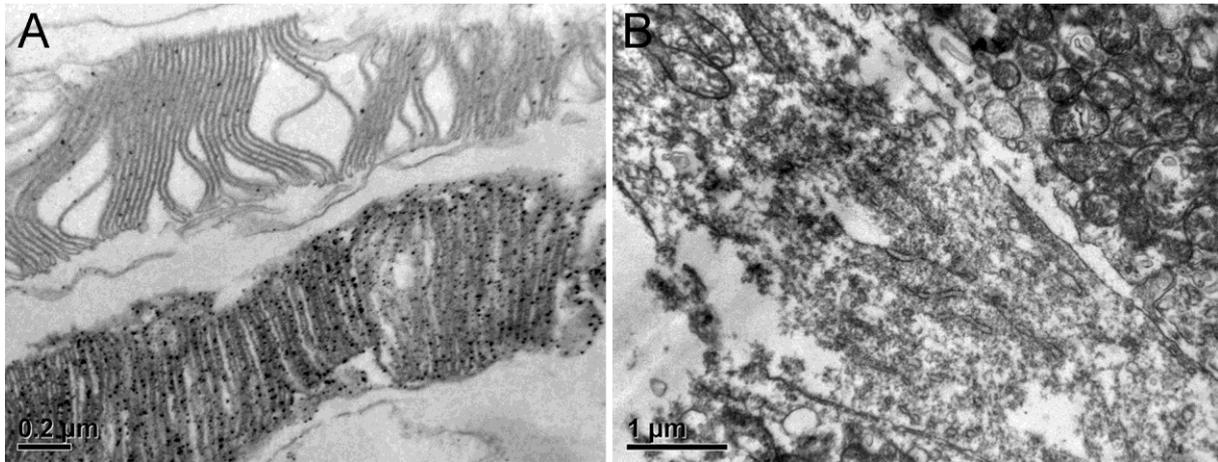


Abb. A 2.10 Elektronenoptische Aufnahmen der Immunmarkierung von Cry1a an einer Rotkehlchenretina. (A) zeigt zwei Außensegmente im Vergleich. Das untere Außensegment enthält Cry1a an den Diskmembranen, durch dunkle Punkte gekennzeichnet, die das Reaktionsprodukt der Immunfärbung sind. In dieser Immunmarkierung sind deutlich mehr Membranen Cry1a positiv als in allen anderen. Ich vermute, dass dies an einer Desynchronisierung des Tagesrhythmus bei diesem Rotkehlchen liegt, da vorher im Verhaltensversuch mehrfach die Tageslänge künstlich verändert wurde. Das oben liegende Außensegment zeigt keine Immunmarkierung und fungiert als indirekte Kontrolle. In (B) ist ein Innensegment der Immunfärbung mit Anti-Cry1a abgebildet. In den Innensegmenten konnte Cry1a auch elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

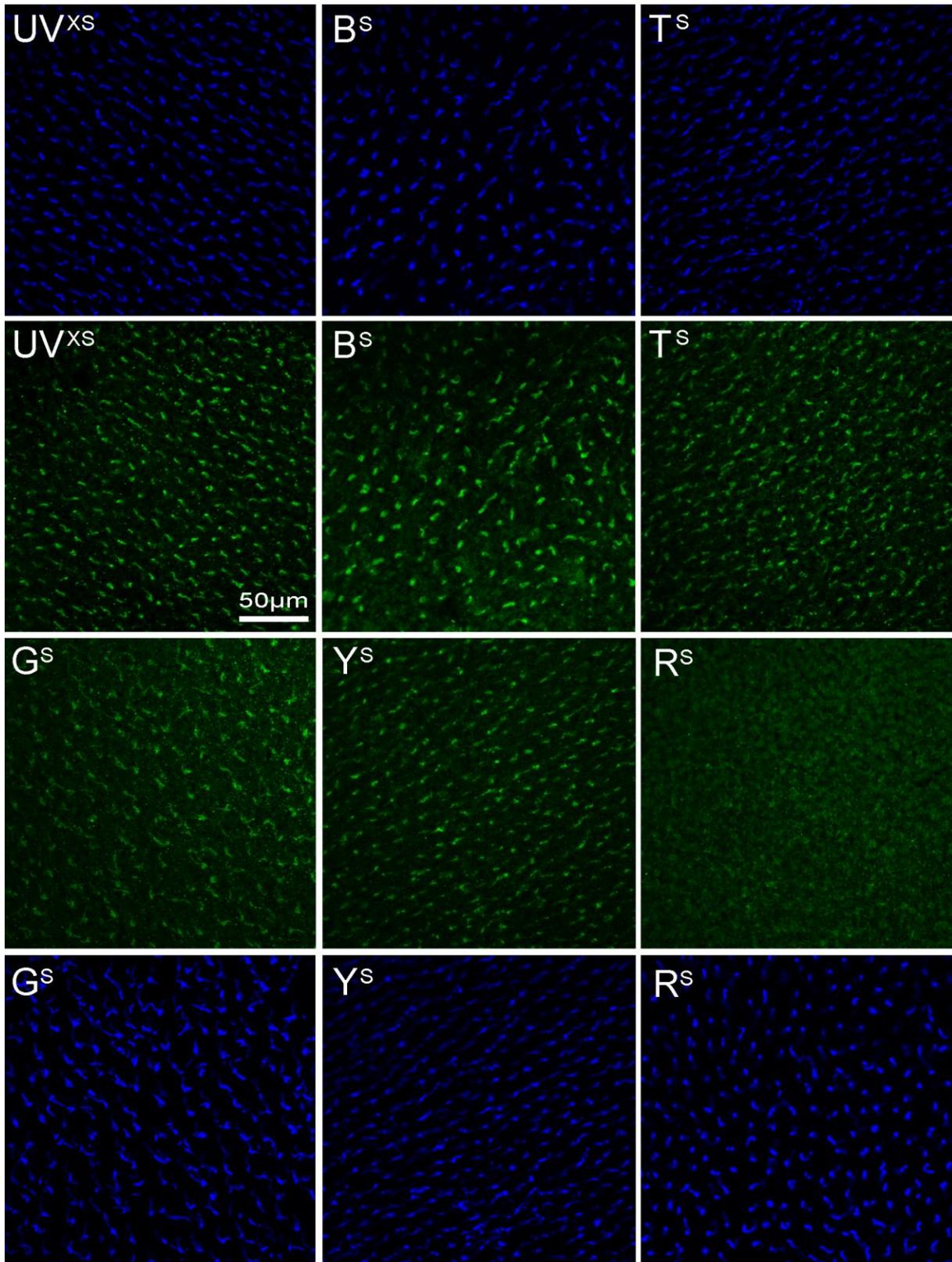


Abb. A 2.11 Lichtaktivierung von Cry1a nach der Behandlung mit verschiedenen monochromatischen Lichtern, ergänzt durch Bilder der UV-Opsin-Färbung. Die Lichtbedingungen sind jeweils in der oberen linken Ecke markiert. UV – Ultraviolett, B – Blau, T – Türkis, G – Grün, Y – Gelb, R – Rot, ^{XS} – $0,8 \times 10^{15}$ quanta/s m², ^S – 8×10^{15} quanta/s m². Diese Abbildung entspricht Abb. 2.16. Sie wurde um die entsprechenden UV-Opsin-Bilder (in Blau) ergänzt. Sie dienen der Kontrolle, dass keine Fehler im immunhistologischen Protokoll oder in der Präparation vorliegen. Die Retinastellen der Cry1a-Färbung sind mit denen der UV-Opsin-Färbung identisch.

A.3 Anhang zur Struktur der Magnetrezeptoren im Schnabel

A.3.1 Ergänzende Abbildungen

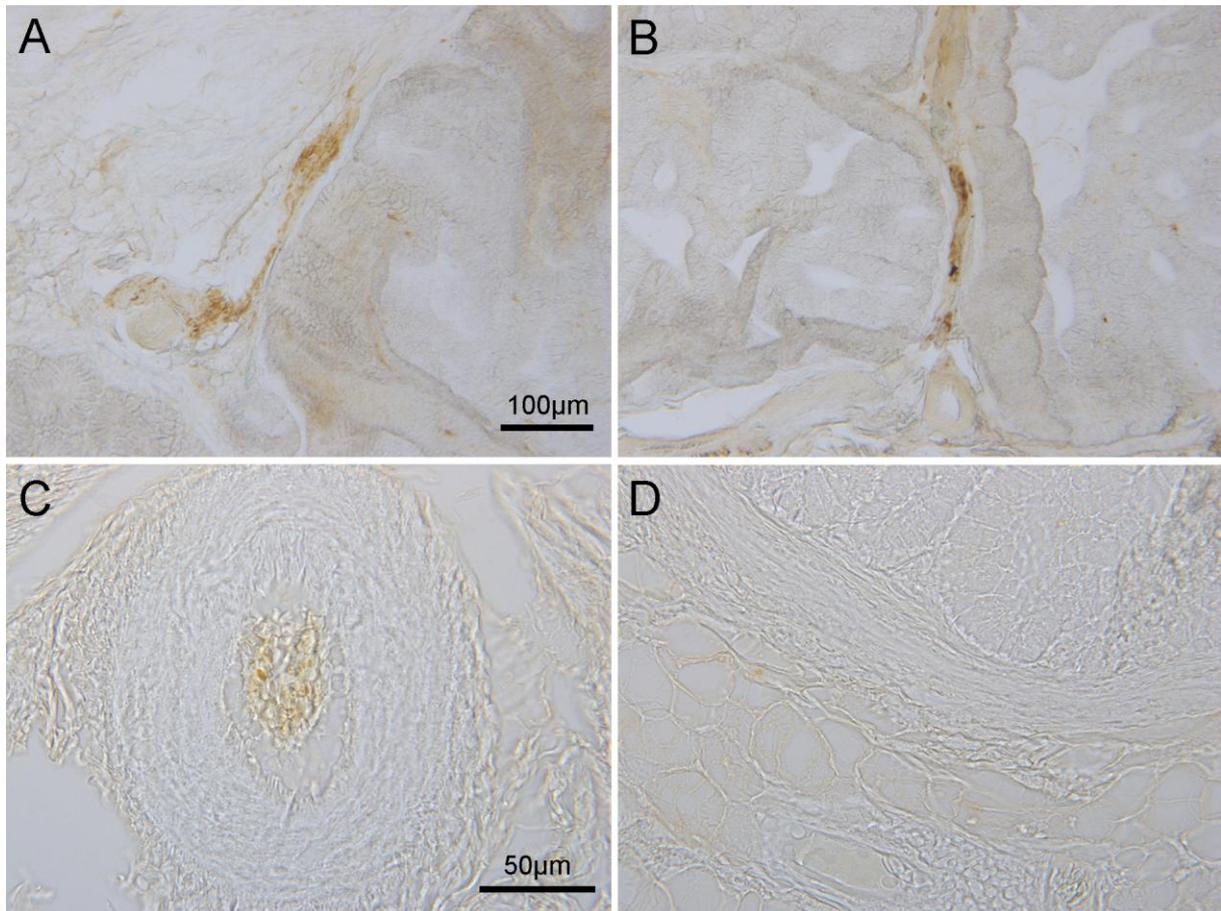


Abb. A 3.1 Kontrolle der Spezifität des Neurofilament-Antikörpers im Schnabel eines adulten Huhns. In dieser Kontrolle wurde das Gewebe in der Immunfärbung ohne den primären Antikörper gefärbt, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers ausschließen zu können. Zu erkennen sind leichte Niederschläge des Diaminobenzidins (Substrat des Immunnachweises) an manchen Strukturen, die in ihrer Intensität allerdings deutlich schwächer sind als die spezifische Immunreaktion des primären Antikörpers (siehe auch Abb. 3.5 und Abb. A 3.3 A).

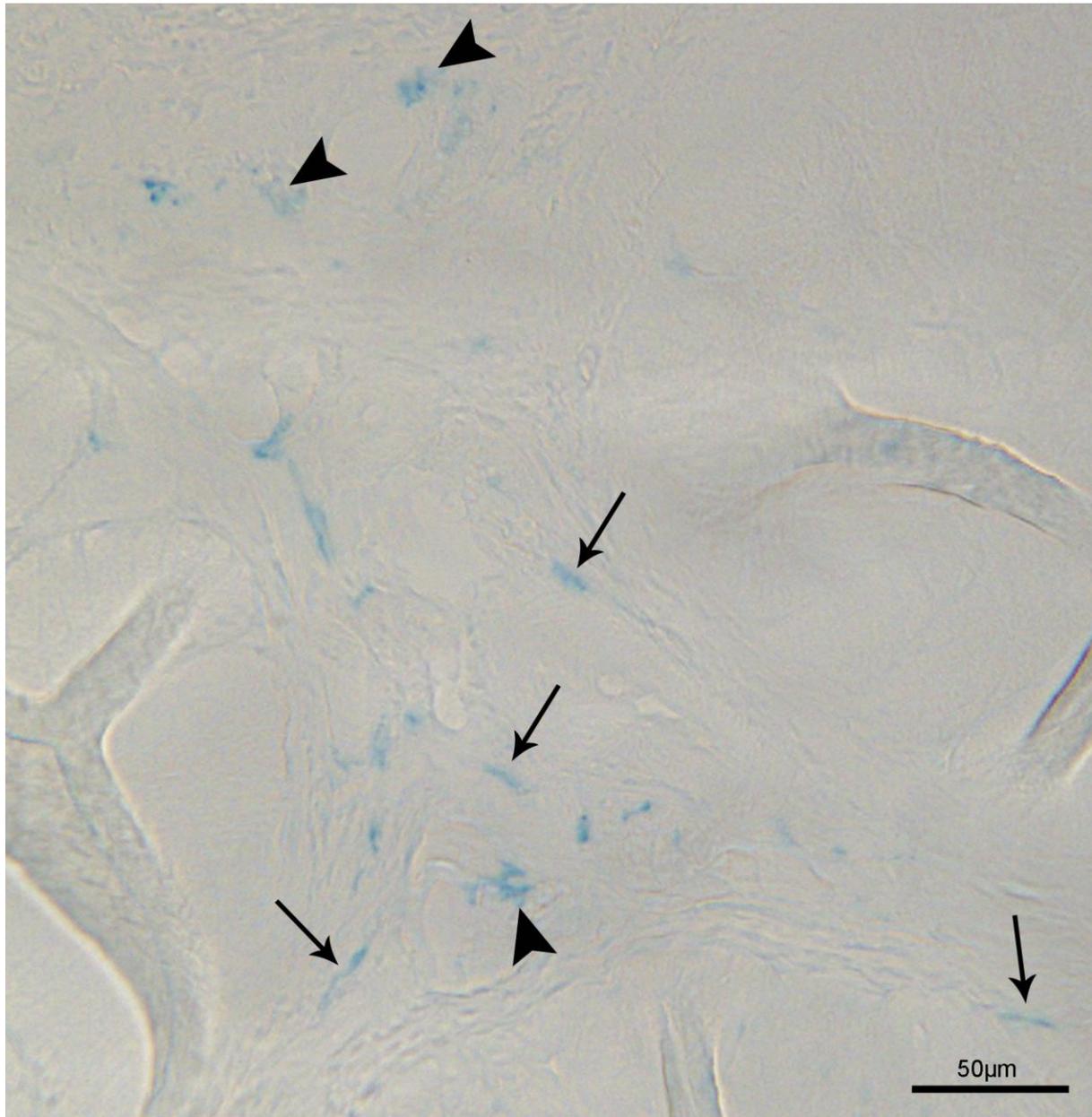


Abb. A 3.2 Eisenhaltige Makrophagen und eisenhaltige Dendriten in direkter Nachbarschaft beim adulten Huhn. Mit schmalen Pfeilen sind eisenhaltige Strukturen gekennzeichnet, die die Morphologie von eisenhaltigen Dendriten aufweisen und erkennbar auf Nervensträngen verlaufen. Mit Dreieckspfeilen sind Strukturen gekennzeichnet, die wie eisenhaltige Makrophagen aussehen. Sie liegen im oberen Bereich des Bildes nicht in Nervengewebe sondern im Bindegewebe. Kunststoffschnitt mit Berliner-Blau. Bekannt aus Abb. 3.3 B.

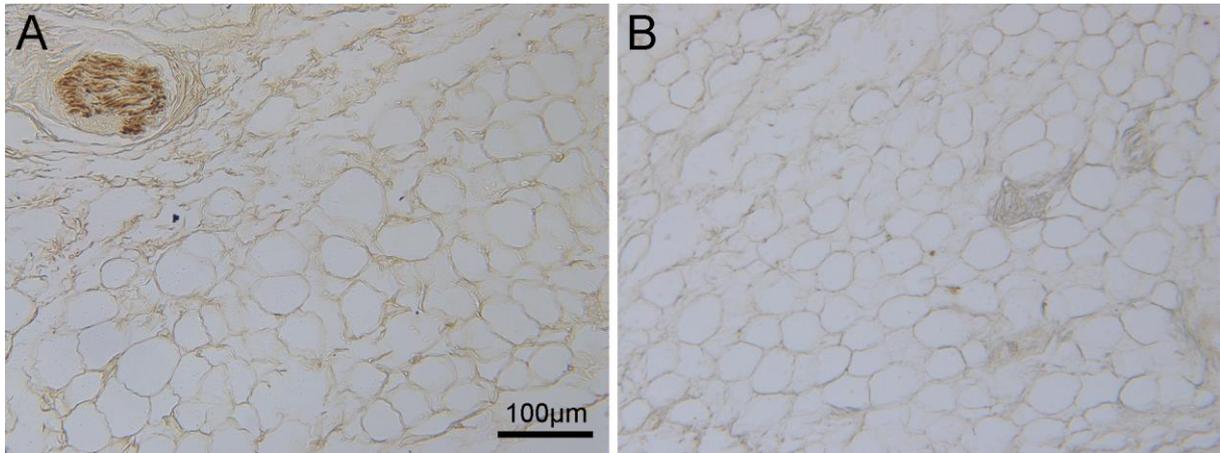


Abb. A 3.3 Immunmarkierung des Neurofilaments in der Schnabelhaut eines adulten Huhns. In beiden Bildern ist der Bereich der Schnabelspitze dargestellt, in dem bei 5 Tage alten Hühnern Berliner-Blau-Reaktionen beobachtet wurden. (A) oben links ist ein Nerv quer angeschnitten, im Gewebe darunter sind keine Nerven sichtbar. In diesem Bindegewebe, auch in (B) gezeigt, liegen bei 5 Tage alten Hühnern die rundlichen eisenhaltigen Strukturen.

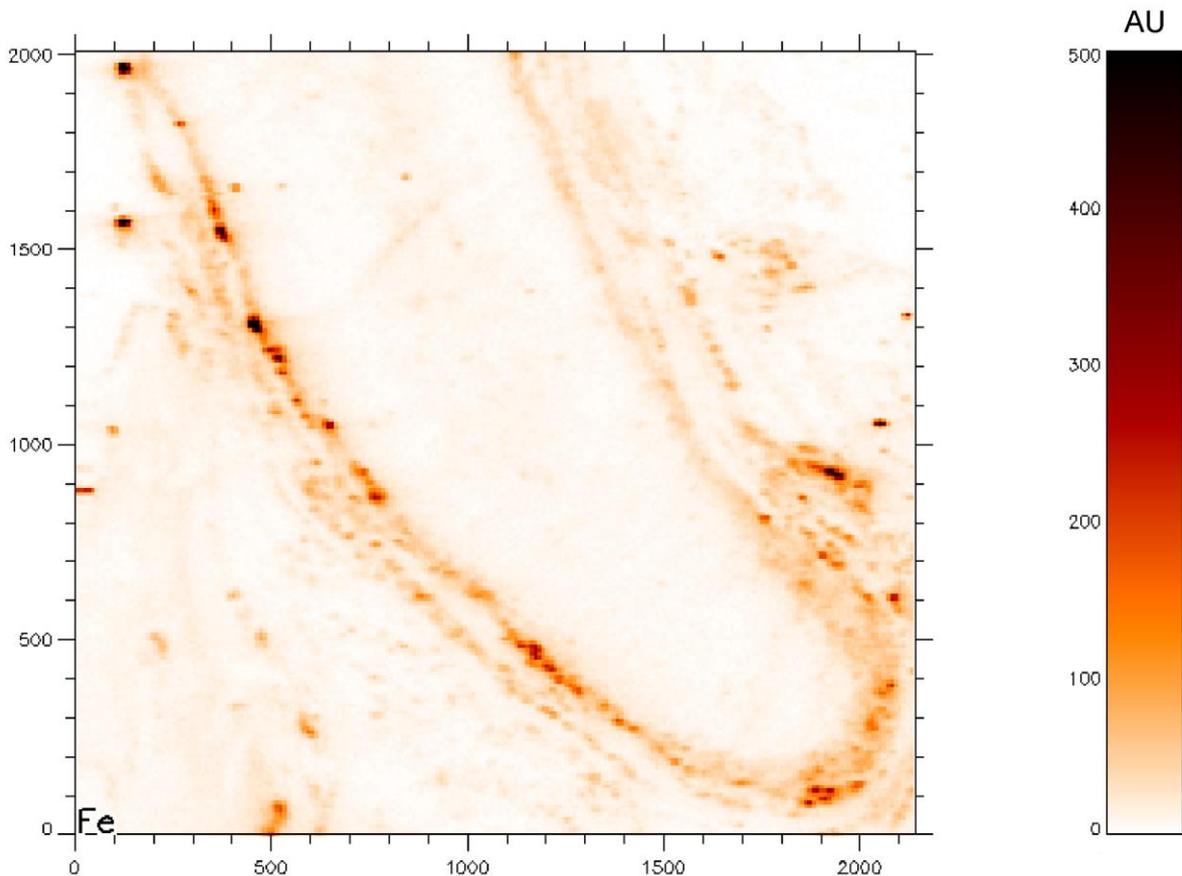


Abb. A 3.4 Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Dendriten eines adulten Huhns. Ein Teil des berliner-blau-gefärbten Parallelschnitts ist in Abb. 3.3 A zu sehen. Die dazugehörigen μ -XANES-Spektren in Abb. 3.22. Die Strukturen enthalten bis zu 500 AU an Eisen. AU – arbitrary units, willkürliche Einheit.

A.3.2 Vergleich der Proteine der Magnetosomen der Magnetbakterien mit denen des Huhns

A.3.2.1 Einleitung

Die Ultrastruktur, die Lokalisation, die Entwicklung und die Eisenoxid-Zusammensetzung der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel wurden bereits betrachtet. Neben Vögeln gibt es diverse andere Organismen, die eine auf Magnetit basierte Magnetsensitivität besitzen (siehe auch allgemeine Diskussion). Die magnetotaktischen Bakterien sind neben den Wirbeltieren die am besten untersuchten magnetsensitiven Organismen. Bei der Forschung an diesen Bakterien stehen zelluläre und genetische Fragestellungen im Vordergrund, so dass hier die Biomineralisation des Magnetits deutlich besser verstanden ist als bei den eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel. Bis jetzt konnten bei den eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel keine Proteine identifiziert werden, die an der Bildung und Formation des Magnetit/Maghemit-Verbundes beteiligt sind. Um mehr über die Biomineralisation der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel zu erfahren, soll ein Vergleich der Proteine des Huhns mit den Genen/Proteinen, die bei dem magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Abb. A 3.5) als an der Biomineralisation beteiligt identifiziert worden sind, vorgenommen werden.

A.3.2.1.1 Magnetotaktische Bakterien

Bei magnetotaktischen Bakterien handelt es sich um gramnegative Bakterien die sich in unterschiedliche phylogenetische Gruppen wie Stäbchen-, Vibrio-, Spirillen-, Kokken- und Eiförmige Bakterien gliedern (Zfg. Faivre & Schüler 2008).

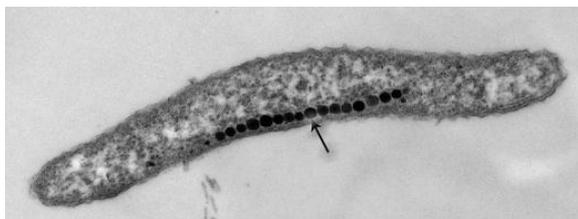


Abb. A 3.5 *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums. Der Pfeil markiert die Kette aus Magnetit in den Magnetosomen (aus Schüler 2008).

Die Magnetosomen sind spezielle Organellen, die es den magnetotaktischen Bakterien ermöglichen, sich am Erdmagnetfeld auszurichten. Dieser passive Vorgang ist nicht zu verwechseln mit einem Magnetfeldrezeptor, welcher Art auch immer, in höheren Organismen. Selbst tote magnetotaktische Bakterien richten sich noch am Erdmagnetfeld

aus³² (Zfg. Schüler 2008). Die Magnetosomen bestehen aus Ketten von Magnetit, seltener auch Greigit, die von der sogenannten Magnetosomen-Membran umgeben sind³³ (Zfg. Schüler 2008). Es konnten eine Reihe von Genen und Genclustern identifiziert werden, deren Proteine für die Bildung und Anordnung der Magnetitkette mitverantwortlich sind. Die meisten dieser Gene liegen auf der sogenannten magnetischen Magnetosomen-Insel (MAI, genomic magnetosome island), die in mehreren Genclustern mit verschiedenen Operons organisiert ist. Der Verlust der MAI führt zu einem nicht-magnetischen Phänotyp. Da hier nur die für die Bildung und Organisation der Magnetitkette verantwortlichen Proteine relevant sind, soll hier nicht weiter auf deren genetische Organisation eingegangen werden (Zfg. Jogler & Schüler 2009). Durch den Vergleich der Proteine der Magnetosomen-Membran³⁴ von *M. gryphiswaldense* mit den Proteinen der Zytoplasmamembran konnten mehr als 20 Proteine identifiziert werden, die für die Magnetosomen-Membran spezifisch sind. Die Funktion einiger dieser Proteine konnte durch natürlich vorkommende Mutanten untersucht werden (Zfg. Faivre & Schüler 2008).

A.3.2.1.2 Die Proteine der Magnetosomen-Membran

In der Biogenese werden zunächst leere Vesikel aus Magnetosomen-Membran angelegt, in denen dann die Magnetit-Kristalle synthetisiert bzw. mineralisiert werden. An der Aktivierung dieser Vesikel im Sinne einer neuen Bildung ist **MamA** beteiligt. Welche Aufgabe es dabei genau erfüllt, ist unklar, bekannt ist, dass immer am Ende der Kette neue Vesikel angelegt werden. Für die Synthese neuer Magnetit-Partikel in den Vesikeln der Magnetosomen-Membran muss erst Eisen aufgenommen werden³⁵. Dieser Vorgang ist ein streng kontrollierter aktiver Prozess, da freies Eisen in einer Zelle immer toxisch ist. Der Transport in die Magnetosomen hinein wird vermutlich von **MamB** und **MamM** gesteuert. Beide

³² Diese Magnetotaxis in Kombination mit Chemotaxis, Aerotaxis und evtl. auch Phototaxis ermöglichen es ihnen, sich in dem schmalen Bereich im Sediment im Süß- oder Salzwasser an der Grenze zur sauerstofffreien Zone zu bewegen, der ihren Lebensansprüchen genügt.

³³ Die Anzahl und Größe der Magnetit-Kristalle ist artspezifisch und genetisch streng kontrolliert. Die Größe der Einzelkristalle liegt im Bereich von 30-120 nm (und damit in der Mehrzahl außerhalb der SPM-Teilchen), und die Anzahl kann mehr als 100 Stück pro Zelle betragen, im extremen Fall bis zu 1000 Stück.

³⁴ Die für die Magnetosomen-Membran spezifischen Proteine wurden in folgende Gruppen eingeteilt: Mam (magnetosomen membrane), Mms (magnetic particle membrane specific), Mtx (magnetotaxis) und Mme (magnetosomen membrane). Diese lassen sich unterschiedlichen Proteinfamilien zuordnen, wie zum Beispiel: TPR-Proteine, CDF-Transporter, HtrA-like-Serin-Proteasen, Actin-like-Proteine oder Generic-Transporter. Die identifizierten Magnetosomen-Proteine haben Funktionen bei Protein-Protein-Interaktion, magnetosomalem Eisentransport, Magnetit-Kristallisation und Aktivierung der Magnetosomen. PDC- und TRP-Domänen sind durch Protein-Protein-Interaktion Gerüstproteine für Multisubunits. HtrA-ähnliche-Proteine arbeiten als molekulare Chaperone und Hitze-Schock-Proteasen.

³⁵ Laut einem Modell wird Eisen III und Eisen II vom Außenmedium in die Zelle eingeschleust, wonach Eisen III zu Eisen II reduziert wird. Anschließend wird Eisen II durch aktiven Ionentransport spezieller Proteine in die Magnetosomen eingeschleust und teilweise wieder zu Eisen III oxidiert.

Proteine sind Teile der CDF-Familie (cation diffusion facilitator), die in der Funktion eines Efflux-Transporters toxische Kationen wie Zink, Kadmium, Kobalt und andere Metalle transportieren. Die größte Similarität von MamB und MamM besteht zu der CDF3-Superfamilie, die als Eisentransporter diskutiert wird.

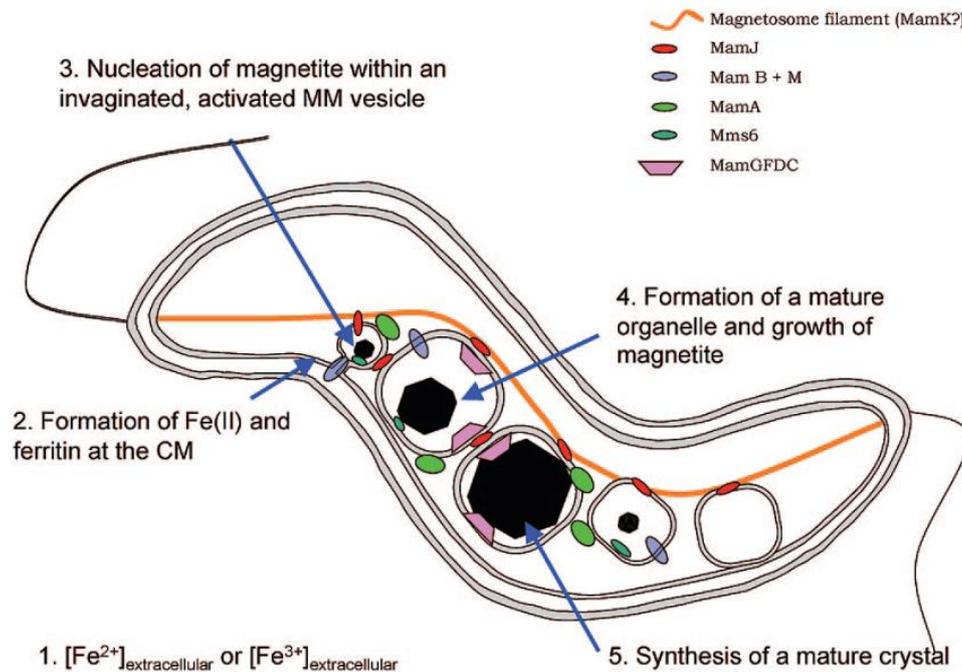


Abb. A 3.6 Schema der Synthese der Magnetitkette und der Funktion der bisher bekannten daran beteiligten Proteine (aus Faivre & Schüler 2008).

Der eigentliche Kristallisationsprozess ist noch nicht vollständig verstanden. Allerdings spielen hier **MamG** und **MamD** eine Rolle. Sie haben beide ein Leu-Gly-reiches Motiv wie Mms6 eines anderen magnetotaktischen Bakteriums (*M. Magneticum*), bei dem ein Effekt auf die Morphologie der wachsenden Eisenkristalle beobachtet wurde. Auch **MamN** und **MamT**³⁶ könnten an der Kristallisation beteiligt sein. Es wurde spekuliert, dass MamN aktiv H^+ -Ionen aus dem Magnetosomen-Kompartiment ausschleust. Damit könnte es den Sauerstoffgehalt innerhalb der Magnetosomen regulieren. Der Gehalt an Sauerstoff³⁷, aber auch der pH-Wert, die vorhandene Eisenmenge und andere chemische Parameter sind ausschlaggebend für die Bildung der Magnetitkristalle bzw. für die Biomineralisation. Die Größe der einzelnen Kristalle wird von **MamG**, **Mam F**, **MamD** und **MamC** kontrolliert. Diese Proteine sind alle auf einem Operon organisiert und deshalb schwer getrennt zu untersuchen. Welche Funktion jedem einzelnen dieser Proteine zukommt ist unklar, fehlt das

³⁶ MamT enthält zwei putative Cytochrom C heme-Bindungsstellen.

³⁷ Zu viel Sauerstoff wirkt als Supressor für die Magnetitbildung.

entsprechende Operon, sind die Kristalle kleiner und unregelmäßig. Als Letztes ist die Anordnung in der Magnetikette wichtig für das magnetische Moment. Allerdings ist sie immer bestrebt zu kollabieren, dies wird durch das Magnetosomen-Filament verhindert, welches an die Zytoplasmamembran gebunden ist und aus dem aktin-ähnlichen Protein **MamK** besteht. MamK bildet ein Netzwerk aus Filamenten (3-4 nm dick) an denen entlang die Magnetosomen organisiert sind. **MamJ**³⁸ bindet die Magnetosomen-Vesikel an das Magnetosomen-Filament (Abb. A 3.6, Zfg. Faivre & Schüler 2008, Zfg. Schüler 2008, Zfg. Jogler & Schüler 2009).

A.3.2.2 Vergleich der Proteinsequenzen (BLAST)

Bei dem Vergleich³⁹ der in der Einleitung beschriebenen Mam-Proteine von *M. gryphiswaldense* mit den gesamten Proteinsequenzen des Huhns wurden folgende Similaritäten erkannt:

- MamE → Serin-Protease HTRA3,
→ Serin-Protease
- MamN → P-Protein
- MamB → Slc30a9-prov-Protein
- MamM → Slc30a9-prov-Protein

Diese Treffer konnten als signifikant eigeordnet werden. Allerdings gab es weitere nicht signifikante Treffer: Es wurden für MamE drei weitere Treffer erzielt. Für MamA wurden 13 und für MamK drei Treffer erzielt. Die drei Proteine, die MamK ähnlich sind, sind alle verwandt mit Aktin.

Keine Treffer gab es bei den Proteinen mamC, mamD, mamF, MamG, mamH, mamI, mamJ, mamL, mamP, mamQ, mamR, mamS, mamT, mamU und Mms6.

A.3.2.2.1 Bewertung der Ergebnisse des Proteinvergleichs

Die Funktion von MamE in den magnetotaktischen Bakterien ist unklar, es wird lediglich beschrieben, dass es sich um eine HtrA-ähnliche Serin-Protease handelt (Zfg. Schüler 2008), wie es auch die Treffer in *Gallus gallus* bestätigen. HtrA-Serin-Proteasen sind aus *E. coli* bekannt. Sie kommen darüber hinaus in verschiedensten Bakterien, in verschiedensten Vielzellern und auch dem Menschen vor. Eine der Hauptdomänen vom

³⁸ MamJ enthält eine CAR (central acidic repetitive) Domäne.

³⁹ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) der Proteine von *Gallus gallus* mit den Proteinen von *M. gryphiswaldense*, die an der Synthese der Magnetosomen beteiligten sind. Hierbei wurde auf die Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) zurückgegriffen.

MamE ist die PDZ-(post-synaptic density protein)-Domäne (Zfg. Pallen & Wren 1997), die im BLAST zwischen *M. gryphiswaldense* und *Gallus gallus* gleich drei Treffer erbrachte. Einen nicht signifikanten Treffer ergab ein glutamin-reiches-Motiv, das ebenfalls eine Hauptdomäne der Htra-Serin-Proteasen ist. Htra-Serin-Proteasen gehören zu den Hitze-Schock-Proteinen und bauen in ihrer enzymatischen Eigenschaft bestimmte geschädigte Proteine im Zytoplasma ab (Zfg. Pallen & Wren 1997).

Über MamN wurde spekuliert, dass es an der Kristallisation beteiligt sein könnte, indem es H⁺-Ionen aus dem Magnetosomen-Kompartiment ausschleust. Die Funktion des P-Proteins, welches Similaritäten zu MamN aufweist, ist bei Hühnern die Decarboxylierung von Glycin zu CO₂ und einer Methylamin-Gruppe. Damit ist es mit dem T-Protein, L-Protein und dem H-Protein Teil der Glycin-Aufspaltung (Fujiwara et al. 1987).

MamB und MamM gehören wie oben beschrieben zur Familie der CDF-Proteine (cation diffusion facilitator). Die Funktion von beiden ist vermutlich, auch in Magnetosomen als Efflux-Transporter Eisen in die Magnetosomen zu transportieren. Hier wurde eine Similarität zu dem Slc30a9-prov-Protein gefunden. Dieses Protein ist in seiner Aminosäuresequenz mit einem Zinktransporter beim großen Krallenfrosch (*X. laevis*) mit einer Identität von 95.7%, aber auch beim Zebrafisch (*D. rerio*), beim Menschen (*H. sapiens*) und der Hausmaus (*M. musculus*) ähnlich, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei dem gefundenen Slc30a9-prov-Protein um einen Zinktransporter handelt. Die Familie der CDF-Proteine enthält verschiedene Metall-Transporter, die eine histidinreiche Region enthalten, die hier vermutlich den Treffer ergab. Der erzielte Treffer gehört wohl in die CDF1- oder CDF2-Familie, die Zink und Kobalt transportieren. MamM und MamB gehören in die CDF3-Familie, die Eisen transportiert (Weltrowski 2006).

Insgesamt sind die erzielten Treffer zwar teilweise als signifikant einzuordnen, es handelt sich aber immer um sehr verbreitete allgemeine Domänen, von denen nicht auf die genaue Funktion des Proteins geschlossen werden kann. Dass die erzielten Treffer allgemeine Ähnlichkeiten aufweisen, zeigt auch ein Vergleich mit den Proteinsequenzen des gesamten Tier- und Bakterienreichs. Dieser Vergleich der als signifikant eingestuften Treffer in *Gallus gallus* mit allen bekannten Proteinsequenzen ergibt sehr viele Treffer in diversen Tieren und Bakterienstämmen. Die Similarität der magnetotaktischen Bakterien zu den untersuchten Proteinen ist durch diesen Vergleich als niedrig einzustufen. Dies bedeutet, dass es sich bei den erzielten Treffern um allgemeine Ähnlichkeiten verschiedener Domänen handelt.

Danksagung

Mein Dank gilt meinen Kollegen und Freunden, die mich während dieser Arbeit all die Jahre unterstützt und begleitet und mich immer motiviert haben, wenn es einmal mühselig war.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Doktoreltern, Herrn Prof. Dr. Günther Fleissner und Frau Dr. Gerta Fleissner so wie Frau Prof. Dr. Roswitha Wiltschko und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiltschko für die Begleitung, immerwährende Unterstützung, aber auch für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die Offenheit für neue Ideen und das Vertrauen in meine Arbeit. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Leo Peichl, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, für die vielen spannenden Diskussionen und das Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten. Auch dafür, dass er mich in seinem Labor aufgenommen hat, und immer ein offenes Ohr hatte.

Frau Prof. Dr. Margaret Ahmad, Universität Paris, und Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Bischoff, Universität Bielefeld, danke ich für die interessanten Gespräche zur Interpretation der biochemischen und neurobiologischen Bedeutung der Cry-Ergebnisse.

Mit Susanne Denzau verbindet mich, nicht zuletzt durch diese Zeit, eine enge Freundschaft. Wir haben uns generell bei der Arbeit und speziell im Projekt zur Entwicklung der eisenhaltigen Strukturen der Hühner immer gut ergänzt. Susanne hat die Aufzucht und die fachgerechte Altersbestimmung der Küken durchgeführt, und des Weiteren hat sie bei der Durchführung und Auswertung der klassisch-histologischen Färbungen in diesem Projektteil mitgewirkt.

Dr. Julia Christina Groß hat die Western und Dot Blots durchgeführt; es war eine angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit. Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz hat uns ihr Labor zur Verfügung gestellt. Vielen Dank dafür!

Dr. Gerald Falkenberg, Dr. Gerd Wellenreuther und allen anderen Kollegen, die bei den Röntgenstrahl-Messungen bei DESY mitgewirkt haben, danke ich dafür herzlich; Gerald Falkenberg hat die Messungen geleitet und die Daten ausgewertet.

Dr. Martin Thomas und PD Dr. Michael Gudo haben es mir ermöglicht, große Teile meiner Arbeit in ihrem Labor bei Morphisto durchzuführen, und standen für histologische und immunhistochemische Fragen immer zur Verfügung.

Andrea Österreicher hat mich bei der Dokumentation der eisenhaltigen Strukturen der 6 juvenilen Hühner, die vollständig dokumentiert wurden, unterstützt.

Danksagung

Dr. Katrin Stapput hat bei den Versuchen der Wellenlängenabhängigkeit von Cry1a bei Hühnern in monochromatischen Lichtern mitgewirkt. Vielen Dank!

Familie Rettig danke ich für die Möglichkeit, meine Proben kurz nach der Schlachtung der Hühner entnehmen zu dürfen.

Prof. Dr. Schüler, Universität München, danke ich für die Bereitstellung der Probe von *M. gryphiswaldense* und für die Diskussion der Ergebnisse des BLAST von Proteinen des Magnetbakteriums mit den bekannten Proteinen des Huhns.

Dr. Eve Picard, Universitätsbibliothek Frankfurt, hat die Recherche der historischen Zitate auf Seite 1 übernommen.

Dr. Petra Bolte, Universität Oldenburg, gab mir Einsicht in die Aminosäuresequenz von Cry1b bei Hühnern, und Prof. Dr. Nathans hat den Antikörper JH492 zur Verfügung gestellt. Vielen Dank!

Für die finanzielle Unterstützung in Form eines Doktorandenstipendiums möchte ich mich bei der Gertrud und Alfons Kassel-Stiftung und der Frankfurt International Graduate School of Science (FIGSS) ganz herzlich bedanken. Die Sachmittel der Arbeit wurden aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Ganz herzlichen Dank für ihre Hilfe an Dr. Eve Picard, meinen Mann Frank Herrmann-Nießner und meine Eltern für die großartige Unterstützung in jeder Hinsicht und an alle, die diese Arbeit immer wieder Korrektur gelesen haben.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung	Abkürzung	Erklärung
A	Akzeptor	CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren
A	Österreich	Cry	Cryptochrom
A	Auge	Cry1	Cryptochrom 1
<i>A. hirtosa</i>	<i>Acanthopleura hirtosa</i>	Cry1a	Cryptochrom 1a
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cry1b	Cryptochrom 1b
AA	Aminosäure	Cry2	Cryptochrom 2
Abb.	Abbildung	C-Terminus	Carboxy-Terminus
Anti-Cry1a	Antikörper gegen einen Teil von Cryptochrom 1a	D	Deutschland
Anti-Cry1b	Antikörper gegen einen Teil von Cryptochrom 1b	D	Donor
Anti-NF	Antikörper gegen einen Teil des Neurofilaments	d	dorsal
Aqua dest.	destilliertes Wasser	D	Dunkelheit
AS	Aminosäure	<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
atCry1	<i>Arabidopsis Thaliana</i> Cryptochrom 1	DAPI	Diamidinphenylindol
ATP	Adenosin-Triphosphat	DAS	DQXVP-acidic-STAESSS
AU	arbitrary units, willkürliche Einheit	DASH	<i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> und <i>Homo</i>
B	Blaues Licht (424 nm)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BB	Berliner Blau	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Bio	Bioscience	EDTA	Edetinsäure-Dinatriumsalz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	eV	Elektronenvolt
BSA	Bovin Serum Albumin	evtl.	eventuell
bzw.	beziehungsweise	f	frontal
c	caudal	FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
CDF	cation diffusion facilitator	FADH-	vollreduziertes FAD
CH	Schweiz	FADH°	Semichinonform des FAD
CLSM	confocal laser scanning microscope	FAD _{ox}	volloxidiertes FAD
cm	Zentimeter	Fe	Ferrum, Eisen
		g	Gravitation
		g	Gramm
		G	Grünes Licht (565 nm)
		GA	Glutardialdehyd
		GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Verzeichnisse

GEN	Genovac	min	Minute(n)
GG	<i>Gallus gallus</i>	ml	Milliliter
H	Magnetfeldvektor	mM	Millimolar
h	Stunde(n)	mm	Millimeter
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	Mme	Magnetosomenmembran
H ⁺ -Ionen	Wasserstoffionen	Mms	magnetic particle
H ₂ O ₂	Wasser		membrane specific
HCl	Salzsäure	mRNA	Messenger-
HDF	8-Hydroxy-7,8-Didemethyl- 5-Deazariboflavin	MTHF	Ribonukleinsäure Methenyltetrahydrofolat
HF	Hochfrequenz-Feld	Mtx	Magnetotaxis
H _h	Horizontalkomponente	mW/m ²	Milliwatt pro Quadratmeter
HRP	Horseradish peroxidase	MWS-Opisin	mittelwellensensitives Opisin
H _v	Vertikalkomponente		
IE	Internationale Einheit	N	Norden
IgG	Immunglobulin G	n. Chr.	nach Christus
Imm	Immersionsfixierung	NaCl	Natriumchlorid
KCF II	Kaliumhexacyanoferrat II	<i>nBOR</i>	nucleus of the basal optic root
Kern	Kernechtrot		
km	Kilometer	NCBI	National Center for Biotechnology Information
L	leichte Ketten eines Antikörpers	NDS	Normal Donkey Serum
L	links	NF	Neurofilament
L	Lichtintensität von 54×10^{15} quanta s ⁻¹ m ⁻²	ng	Nanogramm
		NGS	Normal Goat Serum
I	lateral	NH ₃	Ammoniak
LED	Light Emitting Diode	NHS	Normal Horse Serum
LM	Lichtmikroskop	nm	Nanometer
LUX	Beleuchtungsstärke	nT	Nanoteslar
LWS-Opisin	langwellensensitives Opisin	N-Terminus	NH ₂ -Terminus
M	Lichtintensität von 20×10^{15} quanta s ⁻¹ m ⁻²	O	Osten
		O	Ontogenie
m	medial	PBS	Phosphat Puffer Saline
<i>M. gryphiswaldense</i>	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	PER	period
		Perf	Perfusionsfixierung
<i>M. magneticum</i>	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	Pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
		PFA	Paraformaldehyd
mA	Milliampere	pH	negativer dekadischer
Mam	Magnetosomenmembran		Logarithmus der
MD	Multidomain		Protonenkonzentration
MHz	Megahertz	PHR	photolyase-homologe

Verzeichnisse

	Region		im UV-Bereich
Prä-Serum	Prä-Immunsrum	T	Triplet
Quanta s ⁻¹ m ⁻²	Quanten pro Sekunde pro Quadratmeter	T Tab.	Türkises Licht (502 nm) Tabelle
R	rechts	TEM	Transmissions-Elektronen- mikroskop
r	rostral		
R	Rotes Licht (645 nm)	TIM	timeless
RARalpha	Retinoic acid receptor alpha	TPR	tetratricopeptide repeat
RK	Rotkehlchen (<i>Erithacus rubecula</i>)	Trp u. a.	Tryptophan unter anderem
RNA	Ribonukleinsäure	UV	Ultraviolett
ROM	Ramus ophthalmicus medialis	V v	Violett ventral
RT	Raumtemperatur	v. Chr.	vor Christus
S	Schnabel	W	Westen
S	Singulett	<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
S	Sonnenlicht	XL	Lichtintensität von ≥
S	Süden		200 x 10 ¹⁵ quanta s ⁻¹ m ⁻²
s	Lichtintensität von 8 x 10 ¹⁵ quanta s ⁻¹ m ⁻²	XS	Lichtintensität von 0,8 x 10 ¹⁵ quanta s ⁻¹ m ⁻²
s. o.	siehe oben	Y	Gelbes Licht (590 nm)
s. u.	siehe unten	Z	Zunge
SCN	Suprachiasmatischer Nucleus	z. B. ZENK	zum Beispiel ein bestimmter Zinkfinger- Transkriptionsfaktor
SD	Einbereichsteilchen, Single- Domain	Zfg.	Zusammenfassung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat	μ-XANES	microscopic X-ray
sec	Sekunde(n)		absorption near-edge
SG	Speicheldrüse		structure
SPM	superparamagnetisch	μ-XRF	X-ray fluorescence analysis
ssDNA	single stranded DNA	°	Grad
STAESS	Ser-Thr-Ala-Glu-Ser-Ser- Ser	° °C	Radikal Grad Celsius
SW	Sandwich	μg	Mikrogramm
SWL-Opsin	kurzwellensensitives Opsin	μm	Mikrometer
SWS1	kurzwellensensitives Opsin		

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Das Karte-Kompass-Prinzip	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des Magnetfeldes der Erde	3
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der Funktionsweise des Inklinationskompasses der Vögel	8
Abb. 2.2	Wellenlängenabhängigkeit des Magnetkompasses der Vögel	9
Abb. 2.3	Ergebnisse der Verhaltensversuche bei Rotkehlchen unter monochromatischen Lichtern niedriger Intensitäten	10
Abb. 2.4	Effekte von Hochfrequenz und Betäubung des Schnabels auf Kompassorientierung und sogenannte Fixrichtungen	11
Abb. 2.5	Das Radikalpaar-Modell	14
Abb. 2.6	Hypothetische Empfindlichkeitsmuster, die durch einen Radikalpaar-Mechanismus auf der Retina entstehen könnten	15
Abb. 2.7	Aufbau und Struktur von Cryptochrom	16
Abb. 2.8	Konformationsänderung des <i>Arabidopsis</i> -Cryptochroms (atCry1) nach Lichtaktivierung	17
Abb. 2.9	Versuchsaufbau zur Beleuchtung mit monochromatischen Lichtern	23
Abb. 2.10	Lokalisation von Cry1b in der Retina von Rotkehlchen innerhalb und außerhalb der Zugzeit	30
Abb. 2.11	Lokalisation von Cry1b innerhalb der Zelle	31
Abb. 2.12	Immunmarkierung von Cry1a und UV/V-Zapfen-Opsin und deren Kolokalisation in der Retina von Hühnern	36
Abb. 2.13	Immunmarkierung von Cry1a und UV/V-Zapfen-Opsin und deren Kolokalisation in der Retina von Rotkehlchen	37
Abb. 2.14	Elektronenmikroskopische Immunhistologie und Western Blots	39
Abb. 2.15	Lichtaktivierung von Cry1a	43
Abb. 2.16	Lichtaktivierung von Cry1a nach der Behandlung mit verschiedenen mono- chromatischen Lichtern	45
Abb. 2.17	Redox-Zyklus von Flavin	46
Abb. 2.18	Menge von lichtaktiviertem Cry1a unter monochromatischem Licht hoher Intensität	48
Abb. 3.1	Schema eines Hühnerkopfes mit dem Verlauf des mittleren Astes des ophthalmischen Nervs (ROM, Ramus ophthalmicus medialis), eines der drei Trigemini-nerven	63
Abb. 3.2	Bereiche, in denen die eisenhaltigen Strukturen im Oberschnabel von adulten Hühnern zu finden sind	70
Abb. 3.3	Anordnung der eisenhaltigen Strukturen innerhalb eines Feldes im Oberschnabel von adulten Hühnern	72
Abb. 3.4	Lichtmikroskopischer Aufbau der eisenhaltigen länglichen Strukturen im Hühner- schnabel	73
Abb. 3.5	Immunhistologische Markierung der Nervenfasern und Berliner-Blau-Reaktion des Eisennachweises in der Haut des Oberschnabels eines adulten Huhns	74

Verzeichnisse

Abb. 3.6	Korrelation zwischen der lichtmikroskopischen Berliner-Blau-Reaktion in einem Semidünnschnitt und einem parallelen ungefärbten Ultradünnschnitt aus derselben Region	76
Abb. 3.7	Übersicht über die subzelluläre Struktur der eisenhaltigen Dendriten der Hühner	77
Abb. 3.8	Vesikel der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner im Elektronenmikroskop im Detail	78
Abb. 3.9	Plättchen und Kugeln der eisenhaltigen Dendriten der adulten Hühner im Elektronenmikroskop im Detail	79
Abb. 3.10	Vergleich der Lokalisation und Ausrichtung der eisenhaltigen Dendriten bei Tauben und bei Hühnern	80
Abb. 3.11	Schematisches Modell des Aufbaus eines eisenhaltigen Dendriten	81
Abb. 3.12	Vergleich der Ultrastruktur der eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Tauben mit denen der Hühner	82
Abb. 3.13	Eisennachweis in der Schnabelhaut am Schlupftag	86
Abb. 3.14	Eisennachweis am 5. Tag nach Schlupf	87
Abb. 3.15	Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 5 Tage alten Hühner	88
Abb. 3.16	Eisennachweis in der Schnabelhaut am 12. Tag nach Schlupf	89
Abb. 3.17	Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 12 Tage alten Hühner	90
Abb. 3.18	Eisennachweis am 21. Tag nach Schlupf	91
Abb. 3.19	Mikroröntgenanalyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Makrophagen der 21 Tage alten Hühner	92
Abb. 3.20	Immunhistologische Markierung der Nervenfasern und Berliner-Blau-Reaktion des Eisens im Oberschnabel eines 5 Tage alten Huhns	93
Abb. 3.21	Charakterisierung der Eisenoxid-Zusammensetzung (μ -XANES-Spektren) der Magnetosomen vom Magnetbakterium <i>M. gryphiswaldense</i> im Vergleich zu den eisenhaltigen Magnetrezeptoren der Vögel	94
Abb. 3.22	Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (μ -XANES) der eisenhaltigen Makrophagen und der eisenhaltigen Dendriten der Hühner verschiedenen Alters	95
Abb. 4.1	Stammbaum der rezenten neognathen Vögel	110
Abb. A 1.1	Das Rotkehlchen	IX
Abb. A 1.2	Brutareal des Rotkehlchens	IX
Abb. A 1.3	Das Huhn	X
Abb. A 2.1	Phylogenetischer Stammbaum der Cryptochrome und Photolyasen	XI
Abb. A 2.2	Kontrolle für Anti-Cry1b (GEN) zur Spezifität des sekundären Antikörpers und Kontrolle mit Prä-Immunsereum an einer Rotkehlchenretina	XII
Abb. A 2.3	Kontrollen zur Spezifität von Anti-Cry1b (Bio) an einer Hühnerretina	XIII
Abb. A 2.4	Markierung der Retina eines Rotkehlchens, das ca. 4 Wochen nach der Zugzeit entnommen wurde, mit Anti-Cry1b (GEN)	XIII
Abb. A 2.5	Lokalisation von Cry1b in der Retina von Hühnern	XIV

Verzeichnisse

Abb. A 2.6	Immunhistologische Markierung der Retina vom Huhn (lichtmikroskopisch) und der Retina vom Rotkehlchen (elektronenmikroskopische) mit Anti-Cry1b (Bio). Dot Blots zum Vergleich der Bindungseigenschaften von Anti-Cry1b (Bio) und Anti-Cry1b (GEN)	XV
Abb. A 2.7	Prä-Immuneserum und Peptid-Kontrolle für Cry1a am Beispiel einer Rotkehlchenretina	XVI
Abb. A 2.8	Kontrolle der Spezifität der sekundären Antikörper am Beispiel einer Rotkehlchenretina	XVII
Abb. A 2.9	Kontrolle, dass keine Kreuzreaktionen zwischen den primären Antikörpern und den jeweils anderen sekundären Antikörpern in der Doppelfärbung bestehen, am Beispiel einer Rotkehlchenretina	XVII
Abb. A 2.10	Elektronenoptische Aufnahmen der Immunmarkierung von Cry1a an einer Rotkehlchenretina	XVIII
Abb. A 2.11	Lichtaktivierung von Cry1a nach der Behandlung mit verschiedenen monochromatischen Lichtern, ergänzt durch Bilder der UV-Opisin-Färbung	XIX
Abb. A 3.1	Kontrolle der Spezifität des Neurofilament-Antikörpers im Schnabel eines adulten Huhns	XX
Abb. A 3.2	Eisenhaltige Makrophagen und eisenhaltige Dendriten in direkter Nachbarschaft beim adulten Huhn	XXI
Abb. A 3.3	Immunmarkierung des Neurofilaments in der Schnabelhaut eines adulten Huhns	XXII
Abb. A 3.4	Mikroröntgen-Analyse (μ -XRF) der Menge des vorhandenen Eisens der eisenhaltigen Dendriten eines adulten Huhns	XXII
Abb. A 3.5	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	XXIII
Abb. A 3.6	Schema der Synthese der Magnetitkette und der Funktion der bisher bekannten daran beteiligten Proteine	XXV
Tab. 2.1	Lichtbedingungen, in denen die Hühner adaptiert wurden	24
Tab. 2.2	Vergleich der Aminosäuren des Epitops des Säuger-SWS1-Zapfen-Opisin-Antikörpers (sc-14363) mit den Sequenzen der verschiedenen Zapfen vom Huhn und stellvertretend für das Rotkehlchen denen des Kanarienvogels	26
Tab. 2.3	Intensitäten der Lichter	47
Tab. 3.1	Verwendete Proben, Fixierung und Einbettung	66
Tab. A.1.1	Primäre Antikörper	I
Tab. A.1.2	Sekundäre Antikörper und Normal-Seren	I
Tab. A.1.3	Verwendete Chemikalien und Puffer	II
Tab. A.1.4	Verwendete Geräte und Software	III
Tab. A.1.5	Proben für die Lokalisation von Cry1a und Cry1b	III
Tab. A.1.6	Proben für die Untersuchungen zur Lichtaktivierung von Cry1a	V
Tab. A.1.7	Proben für die Untersuchungen an adulten Schnäbeln	VII
Tab. A.1.8	Proben für die Untersuchungen an juvenilen Schnäbeln	VIII

Lebenslauf

Christine Angela Nießner

Geburtsdatum und -ort: 09.01.1981 in Frankfurt am Main
Familienstand: verheiratet / ein Sohn (7 Jahre alt)

Universitäre Ausbildung

- 2007-2013 Promotion an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main bei Prof. G. Fleissner und Prof. R. Wiltschko
Förderung: Alfons und Gertrud Kassel-Stiftung
- 2007 Diplomarbeit an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main bei Prof. R. Wiltschko
Titel: Ultrastrukturelle Untersuchungen zur immunhistologischen Markierung von Cryptochrom1b in der Vogelretina
- 2000-2007 Studium der Biologie an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
Hauptfächer: Spezielle Zoologie, Neurobiologie und Tierphysiologie

Schulbildung

- 1997-2000 Ernst-Reuter-Schule I, Gymnasiale Oberstufe, Abschluss: Abitur
- 1994-1997 Ernst-Reuter-Schule II, Integrative Gesamtschule
- 1991-1994 IGS Nordend, Integrierte Gesamtschule
- 1987-1991 Comeniuschule, Grundschule

Öffentliche Vorträge

- 4/2013 Vortrag bei der 1th International Conference of the Royal Institute of Navigation of the Serie: Bionav – The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles (Engham, England) über “Light-dependency of activated Cryptochrome in the retina of chicken”.
- 7/2012 Vortrag bei der VI. European Conference on Behavioural Biology (Essen, Deutschland) über „Cryptochrom 1a, the probabale receptor molecules of the magnetic compass in the retina of birds“.
- 09/2011 Vortrag bei der 104. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (Saarbrücken, Deutschland) über „Avian Ultraviolet/Violet Cones Identified as Probable Magnetoreceptors“.

Lebenslauf

- 04/2011 Vorträge bei der 7th International Conference of the Royal Institute of Navigation (Reading, England) über "Ontogeny of the iron-based putative magneto receptor in the upper beak of chicken (*Gallus gallus*)" und „Localization of a candidate receptor molecule for the magnetic compass in the retina of birds“.
- 08/2010 Vortrag beim 25th International Ornithological Congress (Campos de Jordão, Brasilien) über „Localization of Cryptochrome 1 in the retina of birds“.

Poster

- 4/2013 Denzau S., Nießner C., Wiltschko R., Wiltschko W.: Ontogenetic development of magnetic orientation and cryptochrome-expression in chickens. Royal Institute of Navigation: 1st Conference: Bionav – The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles.
- 7/2012 Denzau S., Nießner C., Fleissner Ge., Wiltschko R., Wiltschko W.: Conditioning domestic chicken to a magnetic anomaly. VI. European Conference on Behavioural Biology, Essen.

Publikationen

Originalarbeiten

- Nießner C., Denzau S., Stapput K., Ahmad M., Peichl L., Wiltschko W., Wiltschko R. (2013): Magnetoreception: Activated Cryptochrome 1a concurs with magnetic orientation in birds. J R Soc Interface, DOI 10.1098/rsif.2013.0638.
- Denzau S., Nießner C., Rogers L., Wiltschko W. (2013): Ontogenetic Development of Magnetic Compass Orientation in Domestic Chickens (*Gallus gallus*). J Exp Biol 216, 3143-3147.
- Denzau S., Nießner C., Wiltschko R., Wiltschko W. (2012): Different responses of two strains of chickens to different training procedures for magnetic directions. Anim Cogn 16, 395-403.
- Bischof H. J., Nießner C., Peichl L., Wiltschko R., Wiltschko W. (2011): Avian ultraviolet/violet cones as magnetoreceptors: the problem of separating visual and magnetic information. Communicative & Integrative Biology 4, 713-716.
- Nießner C., Denzau S., Gross J. C., Peichl L., Bischof H. J., Fleissner Ge., Wiltschko W., Wiltschko R. (2011) Avian ultraviolet/violet cones identified as probable magnetoreceptors. PLoS One 6, e20091.

Abstracts

- Nießner C., Denzau S., Wiltschko W., Wiltschko R. (2013): Light-dependency of activated cryptochrome in the retina of chicken. International Conference of the Royal Institute of Navigation. Bionav – The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles. 1st Conference in this Series (Engham, England).

Lebenslauf

- Denzau S., Nießner C., Wiltshko R., Wiltshko W. (2013): Ontogenetic development of magnetic orientation and cryptochrome-expression in chickens. Royal Institute of Navigation: 1st Conference: Bionav – The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles.
- Nießner C. Wiltshko R. (2012): Cryptochrom 1a, the probable receptor molecules of the magnetic compass in the retina of birds. VI. European Conference on Behavioural Biology, Essen.
- Denzau S., Nießner C., Fleissner Ge., Wiltshko R., Wiltshko W. (2012): Conditioning domestic chicken to a magnetic anomaly. VI. European Conference on Behavioural Biology, Essen.
- Nießner C., Wiltshko R. (2011): Avian ultraviolet/violet cones identified as probable magneto-receptors 104. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft.
- Nießner C., Denzau S., Österreicher A., Fleissner Gu., Fleissner Ge., Falkenberg G., Wellenreuther G. (2011): Ontogeny of the iron-based putative magneto receptor in the upper beak of chicken (*Gallus gallus*). 7th International Conference of the Royal Institute of Navigation (Reading, England).
- Nießner C., Wiltshko R. (2011): Localization of a candidate receptor molecule for the magnetic compass in the retina of birds. 7th International Conference of the Royal Institute of Navigation (Reading, England).
- Nießner C., Wiltshko R. (2010): Localization of Cryptochrome 1 in the retina of birds. 25th International Ornithological Congress (Campos de Jordão, Brasilien) S. 195.
- Falkenberg G., Fleissner Ge., Wellenreuther G., Nießner C., Oesterreicher A., Kuehbacher M., Schuchardt K., Fleissner Gu. (2010): XANES spectroscopy confirms magnetite inside bacterial magnetosomes. Annual Report.
- Nießner C., Fleissner Ge., Falkenberg G., Denzau S., Wellenreuther G., Kuehbacher M., Schuchardt K., Fleissner Gu. (2009): Pilot μ -XANES Studies on the Iron-Containing Dendrites in the Beak of Chicken. Annual Report.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Feinstrukturelle und immunhistologische Charakterisierung potenzieller Rezeptoren
der Magnetsinnesorgane von Vögeln“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Unterschrift)

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Unterschrift)