

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Wissenschaftliche Hausarbeit, die an der Universität Kassel angefertigt wurde. Die hier veröffentlichte Version kann von der als Prüfungsleistung eingereichten Version geringfügig abweichen. Weitere Wissenschaftliche Hausarbeiten finden Sie hier:

<https://kobra.uni-kassel.de/handle/123456789/2011040837235>

Diese Arbeit wurde mit organisatorischer Unterstützung des Zentrums für Lehrerbildung der Universität Kassel veröffentlicht. Informationen zum ZLB finden Sie unter folgendem Link:

www.uni-kassel.de/zlb

Wissenschaftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien im
Fach Biologie, eingereicht der Hessischen Lehrkräfteakademie

– Prüfungsstelle Kassel –

**Die Rolle des Neuropeptids *myoinhibitory peptide* (MIP) in der
Verhaltenssteuerung der Madeira Schabe
*Rhyparobia maderae***

Verfasserin:

Selina Weinand

Gutachterin:

Prof. Dr. Monika Stengl

“The only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work. And the only way to do great work is to love what you do.”

– Steve Jobs (2005)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
I. Fachlicher Teil.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1 Endogene Rhythmen	2
1.2 Das circadiane System der Madeira Schabe.....	3
1.3 Die Lokalisation des Schrittmacherzentrums.....	4
1.4 Licht steuert das circadiane Schrittmacherzentrum abhängig von der Tageszeit.....	5
1.5 Molekulare Grundlagen des circadianen Rhythmus bei <i>D. melanogaster</i>	8
1.6 Neuropeptide steuern Prozesse der Physiologie und des Verhaltens.....	10
1.6.1 PDF steuert und koppelt die Lokomotionsrhythmen	11
1.6.2 MIP steuert physiologische Prozesse	11
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Die Aufzucht der Madeira Schabe	16
2.2 Der Laufradassay.....	16
2.2.1 Der Aufbau des Laufrads	16
2.2.2 Das Programm ActogramJ	18
2.2.3 Die Injektionen.....	18
2.2.4 Statistische Auswertung	19
2.3 Die Arena – Schlafentzug.....	19
2.3.1 Gen <i>Silencing</i> durch RNA Interferenz	19
2.3.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	21
2.3.3 Der Aufbau der Arenen	23

2.3.4	Das Tracking der Madeira Schabe mit EthoVision XT	25
2.3.5	Statistische Auswertung	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Injektionen von <i>Rhm</i> -MIP-4 induzierten keine Phasenverschiebung und Änderung der Periodenlänge	28
3.2	Der <i>mip-pre/mip-r knock down</i> führte nicht zu einer Differenz im Aktivitätslevel	32
3.3	Der Schlafentzug verteilte die lokomotorische Aktivität neu auf die Licht- und Dunkelphase	34
3.4	Schlafentzug verschiebt die beiden Aktivitätsmaxima auf einen späteren Zeitpunkt	38
4.	Diskussion.....	39
4.1	Beteiligung von <i>Rhm</i> -MIP-4 am <i>light entrainment</i> von <i>R. maderae</i>	39
4.2	Schlafentzug wirkt sich auf das Verhalten von <i>R. maderae</i> aus	42
4.3	Ausblick und Fazit	46
II.	Didaktischer Teil.....	47
1.	Wertschätzung von Lebewesen: Die Madeira Schabe im Biologieunterricht.....	47
1.1	Kind und Tier	47
1.2	Der Begriff des Tieres für Kinder	48
1.3	Angst und Ekel vor Tieren	49
1.4	Angst und Ekel im Biologieunterricht	50
1.5	Anforderungen an Insekten im Biologieunterricht.....	52
1.6	Den Biologieunterricht mit Insekten umsetzbar machen	52
2.	Die Unterrichtseinheit „Die Madeira Schabe“.....	54
2.1	Begründung der entwickelten Unterrichtseinheit.....	54
2.2	Das Forschertagebuch „Die Madeira Schabe“	57
	Danksagung.....	VII

Literaturverzeichnis	VIII
Anhang.....	XVII
Eidesstattliche Erklärung.....	XXX

Abkürzungsverzeichnis

AME	Akzessorische Medulla
AOC	anteriore optische Kommissur
cDNA	komplementäre DNA
CLK	Clock
CRY	Cryptochrome
CT	circadiane Zeit
CYC	Cycle
DD	Dauerdunkel
$\Delta\Phi$	Phasenverschiebung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
E Oszillator	<i>evening</i> (Abend) Oszillator
E-Box	Enhancer-Element
GFP	grünfluoreszierendes Protein
LD	Licht-Dunkel-Bedingungen
I-LNv	große, laterale, ventrale Neurone
LNv	laterale, ventrale Neurone
M Oszillator	<i>morning</i> (Morgen) Oszillator
MIP	myoinhibitorisches Peptid
<i>mip-pre/mip-r knock down</i>	<i>mip</i> -Präkursor und putativer <i>mip</i> -Rezeptor <i>knock down</i>
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PDF	pigmentdispersing Faktor
PDFME	PDF-immunreaktive Neurone
pdpl ϵ	<i>par domaine Protein I epsilon</i>
PER	Period
POC	posteriore optische Kommissur
POTu	posterioren optischen Tuberkeln
PRC	<i>phase respond curve</i> (Phasenantwortkurve)

qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<i>Rhm</i> -MIP	<i>Rhyparobia</i> -Myoinhibitorische Peptide
RISC	RNA-aktivierter <i>Silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNA _i	RNA-Interferenz
SCN	suprachiasmatischer Nucleus
SE	Schlafentzug
siRNA	<i>short interfering</i> RNA
s-LNV	Kleine, laterale, ventrale Neurone
SPR	Sexpeptidrezeptor
τ	Periodenlänge
TIM	Timeless
TTL-feedback loops	Transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleifen
VRI	Vrille
ZT	Zeitgeberzeit

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Effekte einer Injektion von Ringer- oder <i>Rhm</i> -MIP-4-Lösung im Zeitfenster der circadianen Zeit (CT) von 9-12 h und 21-24 h.....	29
Tab. 2:	Effekte eines mechanischen Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von <i>mip</i> -precursor und putativem <i>mip</i> -Rezeptor (<i>mip</i> -pre/ <i>mip</i> -r) knock down Tieren sowie <i>gfp</i> knock down Tieren (24 Stunden Intervalle).....	33
Tab. 3:	Effekte eines Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von <i>mip</i> -precursor und <i>mip</i> -Rezeptor (<i>mip</i> -pre/ <i>mip</i> -r) knock down und <i>gfp</i> knock down Tieren (12 Stunden Intervalle).....	35
Tab. 4:	Effekte eines mechanischen Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von <i>mip</i> -precursor und <i>mip</i> -Rezeptor (<i>mip</i> -pre/ <i>mip</i> -r) knock down und <i>gfp</i> knock down Tieren (30 Minuten Intervalle).....	XXVII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der wesentlichen Elemente einer circadianen Uhr.....	4
Abb. 2:	3D Konstruktion des akzessorischen Medulla (AME).....	5
Abb. 3:	Effekte von Licht auf das Aktivitätsmuster eines nachtaktiven Tieres.....	6
Abb. 4:	Modell der Rückkopplungsschleifen in <i>D. melanogaster</i>	10
Abb. 5:	Schema des experimentellen Aufbaus zur Aufnahme und Analyse der circadianen Lokomotion der Schabe <i>R. maderae</i>	17
Abb. 6:	Injektionstechnik.....	18
Abb. 7:	Mechanismus der RNA-Interferenz (RNA _i).....	20
Abb. 8:	Mechanismus der reversen Transkription zur Umwandlung von einzelsträngiger mRNA in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA).....	22
Abb. 9:	Molekulare Arbeitsschritte der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	23
Abb. 10:	Vier Arenen wurden gleichzeitig mit einer Kamera im Arena-Assay gefilmt.....	24
Abb. 11:	Mechanischer Schlafentzug (SE) durch Falcon-Rotator.....	25
Abb. 12:	Zeitlicher Verlauf des Arenaassays vor und nach dem Schlafentzug (SE).....	25
Abb. 13:	Kameraansicht auf die vier verwendeten Arenen.....	26
Abb. 14:	Laufspur eines Versuchstiers.....	26
Abb. 15:	Kameraansicht auf die vier verwendeten Arenen mit Gitternetz zur händischen Auswertung der Videos.....	27
Abb. 16:	Die Injektionen von <i>Rhm</i> -MIP-4 führten nicht zu einer dosisabhängigen Phasenverschiebung.....	30
Abb. 17:	Die Injektion von <i>Rhm</i> -MIP-4 zur circadianen Zeit CT 11.83 mit der Konzentration $2 \cdot 10^{-9}$ mol führte zu einer nicht signifikanten Phasenverzögerung ($\Delta\Phi$) von $\Delta\Phi = -0.65$ h.....	31
Abb. 18:	Periodenlängen der Versuchsgruppen vor und nach der Injektion von Ringerlösung oder <i>Rhm</i> -MIP-4-Lösung veränderten sich nicht.....	32
Abb. 19:	Der <i>mip-precursor</i> und putative <i>mip</i> -Rezeptor (<i>mip-pre/mip-r</i>) <i>knock down</i> veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 24 Stunden Intervall nicht.....	33
Abb. 20:	Der Schlafentzug (SE) hob die Unterschiede der durchschnittlich zurückgelegten Strecke der Schaben im Vergleich von Tag und Nacht auf.....	36
Abb. 21:	Der <i>mip-precursor</i> und putative <i>mip</i> -Rezeptor (<i>mip-pre/mip-r</i>) <i>knock down</i> veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 30 min Intervall nicht.....	37
Abb. 22:	Der Schlafentzug (SE) veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 0,5 h Intervall nicht.....	38

I. Fachlicher Teil

Fest verankerte circadiane Rhythmen haben sich in den meisten Organismen der Welt entwickelt. Sie sind an externe Zeitgeber, wie den Licht-Dunkel-Wechsel (**LD**) gekoppelt und steuern die Ausgangssignale (*outputs*) der Organismen (Hildebrandt et al., 2015). Die akzessorische Medulla (**AME**) ist der circadiane Schrittmacher der Madeira Schabe *Rhyparobia maderae* und befindet sich in den optischen Loben. Von dort aus steuert sie das Verhalten der Madeira Schaben, angepasst an die Umgebungsbedingungen wie den Licht-Dunkel-Wechsel (Reischig & Stengl, 2003b; Stengl & Homberg, 1994). Das Vorkommen von myoinhibitorischen Peptiden (**MIPs**) in der AME kann vermuten lassen, dass diese in der Madeira Schabe an circadianen Vergängen beteiligt sind. Es wurden bereits MIPs (MIP-1 und MIP-2) getestet, welche einen Einfluss auf die Verarbeitung des Lichteingangs und somit auf den circadianen Rhythmus zeigen (Schendzielorz & Stengl, 2013; Schulze et al., 2012; Schulze et al., 2013). In dieser Arbeit wurde der Einfluss des MIP-4 auf das circadiane System der Madeira Schabe durch Injektionsexperimente untersucht, wobei für bestimmte circadiane Zeiten (**CT**; CT 9-12 und CT 21-24) kein Einfluss gezeigt werden konnte. Um herauszufinden, ob MIPs einen Einfluss auf das circadiane System von *R. maderae* und einen Einfluss auf deren Schlafverhalten haben, wurde ein Arenaassay durchgeführt, bei welchem den Madeira Schaben Schlaf verweigert wurde. Als Versuchsgruppen wurden dabei sowohl Tiere mit *gfp knock down* als auch Tiere mit *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* untersucht. Es konnte eine Tendenz gezeigt werden, welche eine Teilhabe von MIPs an der Steuerung des Schlafes vermuten lässt. MIPs scheinen demnach die Schlafhomöostase aufrecht zu erhalten.

1. Einleitung

1.1 Endogene Rhythmen

Die innere Uhr steuert lebensnotwendige endogene Rhythmen und koppelt diese an externe Zeitgeber, wie den täglichen Hell-Dunkel-Wechsel. Er wird durch die Rotation der Erde um ihre eigene Achse bestimmt. In der Chronobiologie wird der endogene Rhythmus eines Organismus, der eine Periodenlänge (τ) von etwa 24 Stunden aufweist, als circadianer Rhythmus bezeichnet. Endogene Rhythmen wurden nicht nur in Tieren wie *R. maderae* (Stengl et al., 2015) gefunden, sondern auch in Pflanzen, wie zum Beispiel in *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand; Dodd et al., 2005). Der circadiane Rhythmus zeigt unter konstanten Umweltbedingungen (beispielsweise Dauerdunkel, **DD**) eine endogene Periodenlänge von circa 24 Stunden, nicht aber von genau 24 Stunden. Das Wort „circa“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet „ungefähr“, das Wort „diem“ bedeutet „Tag“. Daraus resultiert die Bezeichnung „circadian“ also „ungefähr ein Tag“ (Hildebrandt et al., 2015).

Je nach Periodenlänge werden verschiedene Rhythmen unterschieden. Der diurnale Rhythmus (lat. „diurnus“ = täglich) weist demnach eine Periodenlänge von genau 24 Stunden auf, da dieser an den Tag-Nacht-Rhythmus gekoppelt ist. Neben dem diurnalen Tag-Nacht-Rhythmus gibt es noch viele weitere Biorhythmen: ultradiane (<24 h) und infradiane, wie z.B. circalunare oder circannuale (>24 h) Rhythmen (Hildebrandt et al., 2015). Der ultradiane Rhythmus weist eine Periodenlänge auf, die kleiner als 24 Stunden ist. Ein Beispiel für diesen ist die spontane Aktionspotential-Oszillation eines Herzschrittmachenneurons der Wirbeltiere, das den Herzschlag treibt. Die Periodenlänge, die dem Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen beträgt, ist etwa eine Sekunde. Ein infradianer Rhythmus hat eine Periodenlänge von mehr als 24 Stunden. Dazu zählt beispielsweise der saisonale, circannuale Wechsel des Haar- oder Federkleides von Tieren oder der Vogelzug (Hildebrandt et al., 2015).

Der evolutive Nutzen der inneren Uhren liegt in der Erhöhung der biologischen Fitness. Aus diesem Grund wurden sie im Laufe der Evolution selektiert. Die zeitliche Regulation von physiologischen Prozessen erhöht sowohl die Fertilität wie auch die Überlebenschancen der Organismen. Der Grund dafür liegt darin,

dass die Organismen mit inneren Uhren sparsamer mit ihrer Energie haushalten, da ihre Körpervorgänge zeitlich, durch spontane Mechanismen der Selbstorganisation, abgestimmt werden können (Hildebrandt et al., 2015). Diese spontane Selbstorganisation geschieht durch Kopplung von Oszillatoren/Uhren. Normalerweise besitzt ein Organismus mehrere circadiane Uhren, welche sich durch gegenseitige Interaktionen (Kopplung) synchronisieren, beziehungsweise von einer dominanten Hauptuhr (englisch: *master clock*) synchronisiert (*entrained*) werden. Durch jede Kopplung von Oszillatoren/Uhren mit bereits ähnlichen endogenen Periodenlängen wird eine gemeinsame Periodenlänge erzeugt. Das gilt für biologische, wie für mechanische Oszillatoren/Uhren gleichermaßen und ist ein dominanter Mechanismus der Selbstorganisation. Endogene (innere) Uhren sind genetisch determiniert, was bedeutet, dass die Periodenlänge und die Phasenlage innerhalb einer Art ungefähr gleich sind, solange ähnliche Umweltbedingungen vorliegen. Darüber hinaus sind circadiane Rhythmen temperaturkompensiert. Das bedeutet, dass sich die Periodenlänge im physiologischen Temperaturbereich des Individuums nicht ändern (Hildebrandt et al., 2015).

1.2 Das circadiane System der Madeira Schabe

Das circadiane System der Madeira Schabe setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen (Abb. 1; Homberg et al., 2003). So wird beispielsweise das rhythmisch zu- und abnehmende Sonnenlicht als externer geophysikalischer Rhythmus (externer Zeitgeber) von spezifischen Rezeptoren detektiert (Hildebrandt et al., 2015). Im besonderen Falle des Licht-Dunkel (LD) Rhythmus als Zeitgeber ist der Rezeptor das Photopigment (Opsine wie z.B. Rhodopsin, Cryptochrome) im Auge, welcher das einfallende Licht detektiert (Hildebrandt et al., 2015). Die Rezeptorzellen des Säuger-Auges sind Melanopsin-enthaltende Ganglienzellen im Auge, die direkt mit dem endogenen circadianen Schrittmacherzentrum, dem Suprachiasmatischen Nukleus (SCN), im Hypothalamus verbunden sind (Meijer & Schwartz, 2003). Der Schrittmacher wird dadurch mit dem externen Zeitgeber synchronisiert (Abb. 3E) und steuert zeitspezifisch verschiedene physiologische Prozesse, wie beispielsweise die Lokomotion und die Ausschüttung von Hormonen (Abb. 1).

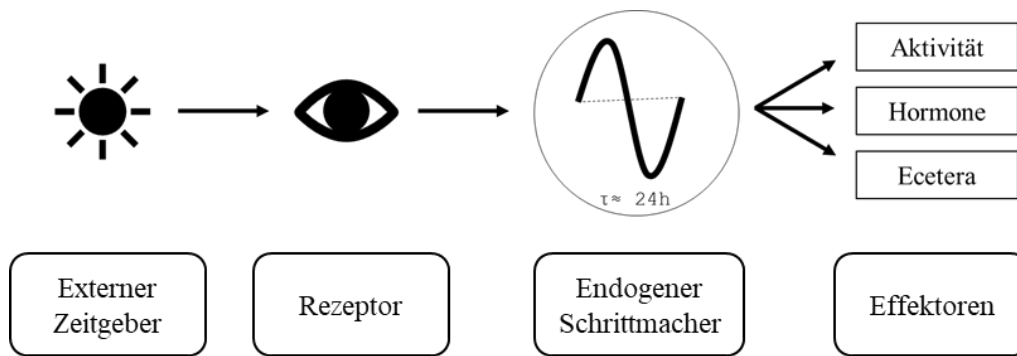


Abb. 1. Schematische Darstellung der wesentlichen Elemente einer circadianen Uhr. Externe Zeitgeber, wie der Hell-Dunkel-Wechsel (**LD**), werden von Photorezeptoren, wie z.B. Melanopsinen im Auge detektiert. Durch diesen Input werden endogene Schrittmacher synchronisiert und steuern die Rhythmik verschiedener Effektoren, die Rhythmen in Verhalten und Physiologie generieren (verändert nach Hildebrandt et al., 2015).

Ein etablierter Modellorganismus der circadianen Rhythmik ist die Madeira Schabe (Nishiitsutsuji-Uwo & Pittendrigh, 1968). Das circadiane Schrittmacherzentrum der Madeira Schabe wurde durch Läsions- und Transplantationsexperimente im optischen Lobus lokalisiert (Nishiitsutsuji-Uwo & Pittendrigh, 1968; Page, 1983). Das circadiane Schrittmacherzentrum ist ein zellulärer Oszillator, welcher im Gehirn der Schabe durch neuronale Verschaltungen in einem definierten Neuropil im optischen Lobus generiert wird. Dabei handelt es sich um selbsterregende neuronale Oszillatoren, die auch als isolierte Einzelzellen unter konstanten Umweltbedingungen eine Periodenlänge von etwa 24 Stunden in der Frequenz ihrer spontanen Aktionspotentiale aufweisen. Durch Kopplung an exogene, rhythmische Zeitgeber (via *photic entrainment pathways*) synchronisiert sich das circadiane Schrittmacherzentrum der Schabe durch Licht-abhängige Phasenverschiebung mit dem externen LD-Rhythmus als Zeitgeber (Hildebrandt et al., 2015).

1.3 Die Lokalisation des Schrittmacherzentrums

Ein optischer Lobus, in welchem das circadiane Schrittmacherzentrum sitzt, ist aus drei Neuropilen aufgebaut: Lamina, Medulla und Lobula. Diese erzeugen das von den Photorezeptorzellen detektierte Abbild der Umgebung retinotop (Nishiitsutsuji-Uwo & Pittendrigh, 1968). Später konnte die genaue Lokalisation des circadianen Schrittmacherzentrums in der Region zwischen der Lobula und der Medulla bestimmt werden (Sokolove & Loher, 1975). Durch die Kombination von immunocytochemischen Experimenten und Läsions- und

Transplantationsexperimenten konnte das circadiane Schrittmacherzentrum in der akzessorischen Medulla (AME, plural: AMEs) lokalisiert werden (Reischig & Stengl, 2003b; Stengl & Homberg, 1994).

Die AME sitzt im anterioren Bereich der Medulla und kann untergliedert werden in die Hüllregion, die Glomeruli und den interglomerulären Bereich. Sie wird von circa 240 Neuronen aus sieben Somagruppen innerviert (Abb. 2). Die AME ist birnenförmig und erstreckt sich distal entlang der benannten sieben Somagruppen (Reischig & Stengl, 2003a).

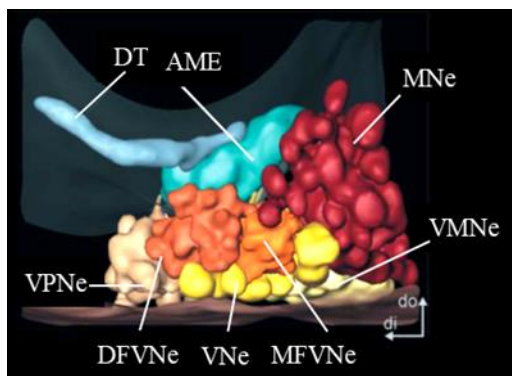


Abb. 2 3D Konstruktion der akzessorischen Medulla (AME). Es werden sechs Somagruppen gezeigt, die die AME innervieren. DT: distaler Trakt, MNe: mediale Neurone, VPNe: ventroposteriore Neurone, DFVNe: distale frontoventrale Neurone, VNe: ventrale Neurone, MFVNe: mediale frontoventrale Neurone, VMNe: ventromediale Neurone. Nicht gezeigt werden die anterioren Neurone (ANes). Maßstab: 50 µm (verändert nach Reischig & Stengl, 2003a).

Ein besonderes Merkmal der AME Uhrneurone ist ihre hohe Konzentration an Neuropeptiden und Neurotransmittern, die auf die Wichtigkeit dieser Substanzen für das circadiane System der Madeira Schabe hinweist. Durch immunocytochemische Färbungen und massenspektrometrische Bestimmungen konnten einige Neuropeptide in Uhrneuronen identifiziert werden, unter anderem auch das *myoinhibitory peptide* (MIP; Schulze et al., 2012; Stengl & Arendt, 2016).

1.4 Licht steuert das circadiane Schrittmacherzentrum abhängig von der Tageszeit

Die Madeira Schabe ist ein nachtaktives Tier, welches eine Periodenlänge <24 h in konstanter Dunkelheit aufweist. Der LD-Wechsel des Tages verläuft jedoch genau im 24-Stunden-Rhythmus, mit 12:12 h LD Bedingungen. An diesen externen Rhythmus passt sich die Madeira Schabe an, mit ihrem Aktivitätsbeginn zu Beginn der Dunkelphase (Aschoff, 1958). Da die Lokomotion maßgeblich vom endogenen Schrittmacherzentrum gesteuert wird, sind der endogene Rhythmus und die Synchronisation mit externen Zeitgebern im Laufrad-Assay messbar. Die Laufaktivität wird dabei graphisch in

Aktogrammen aufgetragen (Abb. 3A; Loesel & Homberg, 2001; Nishiitsutsuji-Uwo & Pittendrigh, 1968; Page, 1978; Stengl & Homberg, 1994). Der zeitliche Verlauf des Experiments wird von einem externen Zeitgeber bestimmt, weshalb die Zeitachse die Zeitgeberzeit (ZT) in Stunden (ZT/h) angibt.

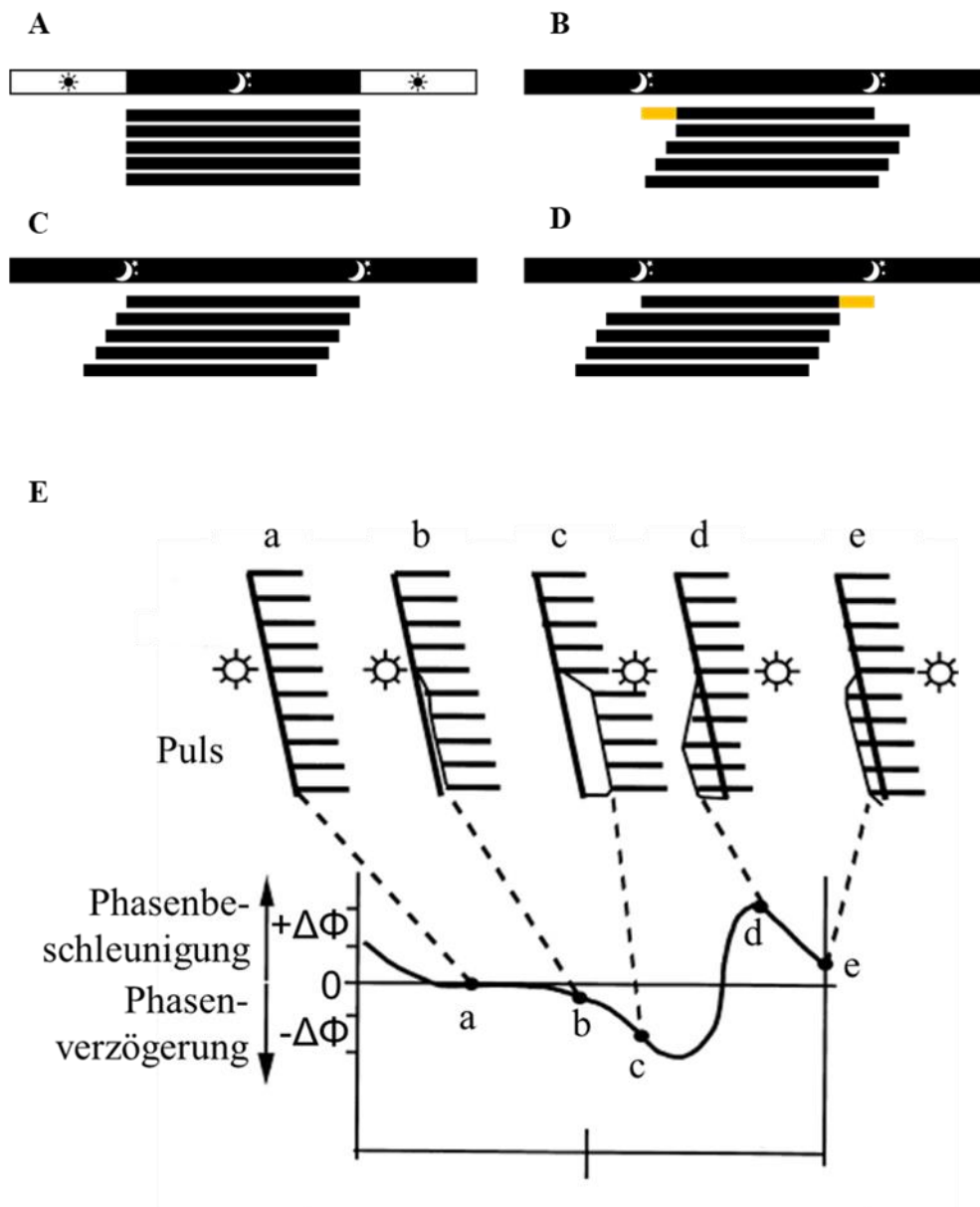


Abb. 3 Effekte von Licht auf das Aktivitätsmuster eines nachtaktiven Tieres. **A-D:** Aktogramme zeigen die Laufaktivitätsrhythmen eines nachtaktiven Tieres unter verschiedenen Bedingungen, im angekoppelten Zustand, oder im Freilauf. **A:** Obwohl das Tier eine Periodenlänge von $< 24\text{ h}$ aufweist (**C**), koppelt es sich durch Licht-abhängige Phasenverschiebungen (*entrainment*) an den externen Zeitgeber (Licht-Dunkel-Wechsel = LD; 12:12 h) an und weist somit die gleiche Periodenlänge wie der Zeitgeber von genau 24 h auf. **B:** Ein Lichtpuls zu Beginn der subjektiven Nacht führt zu einer Phasenverzögerung. **C:** Das Tier besitzt bei konstanten Umweltbedingungen (Dauerdunkel = DD) im Freilauf eine endogene Periodenlänge von $< 24\text{ h}$. **D:** Ein Lichtpuls am Ende der subjektiven Nacht führt zu einer Phasenbeschleunigung. **E:** Biphasische Phasen-Antwort-Kurve (phase respond curve, PRC) der Laufaktivität eines nachtaktiven Tieres. Ein Lichtpuls wird zu verschiedenen Zeitpunkten der circadianen Zeit gegeben. Am subjektiven Tag hat der Lichtpuls keinen Effekt (**a**). Zu Beginn der subjektiven Nacht hat der Lichtpuls eine Phasenverzögerung zur Folge (**b**, **c**). Gegen Ende der subjektiven Nacht hat der Lichtpuls eine phasenbeschleunigende Auswirkung auf das Tier (**d**, **e**; verändert nach Touitou et al., 2017).

Werden die Tiere unter konstanten Bedingungen gehalten, so können diese nicht mehr an einen externen Zeitgeber ankoppeln und zeigen Laufaktivität im Freilauf, entsprechend ihres endogenen circadianen Rhythmus (englisch: *free-running period*; Abb. 3B). Die Zeitachse gibt die circadiane Zeit (CT) in Stunden (CT/h) an, also die subjektive Zeit des Tagesverlaufs eines individuellen Tieres. Untersuchungen von nachtaktiven Tieren unter DD Bedingungen zeigten, dass Lichtpulse zu Beginn der subjektiven Nacht eine Phasenverzögerung (*delay*) mit sich bringen (Abb. 3C). Lichtpulse, die am Ende der subjektiven Nacht, also der aktiven Phase der Tiere, gegeben werden, führen zu einer Phasenbeschleunigung (*advance*; Abb. 3D; Golombek & Rosenstein, 2010).

Werden die gewonnenen Daten in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen, so ist das Resultat eine biphasische Phasenantwortkurve (*phase respond curve*, **PRC**; Abb. 3E). Dafür wird die Phasenverschiebung ($\pm\Delta\Phi$) in Abhängigkeit von der circadianen Zeit der gemessenen Tiere zum Applikationszeitpunkt aufgetragen (Barrett & Page, 1989; Golombek & Rosenstein, 2010).

R. maderae zeigt unter gewissen Bedingungen, wie Dauerweißlicht oder Dauerrotlicht, ein biphasisches Aktivitätsmuster. Das heißt, dass während der Aktivitätsphase zwei Aktivitätsmaxima auftreten können und keine gleichmäßig andauernde Aktivität vorliegt (Roberts, 1960; Wiedenmann, 1977). Zur Erklärung der biphasischen Aktivitätsmuster ist das Ein-Oszillator-Modell nicht ausreichend, weil sich unter Langtagbedingungen die Phasenlage der beiden Peaks und damit die Periodenlänge verlängert. Jedoch kann das spätere Erwachen und frühere Schlafen ein Steuerelement nicht gleichzeitig leisten. Pittendrigh und Daan (1976) postulierten aus diesem Grund das Zwei-Oszillator-Modell. Dieses beschreibt zwei Oszillatoren, die zwar voneinander unabhängig funktionsfähig, aber miteinander gekoppelt sind. Da die beiden Oszillatoren verschieden auf Licht reagieren, wurden sie *morning* (**M**) Oszillator und *evening* (**E**) Oszillator genannt. Das bedeutet, dass der M Oszillator an den Sonnenaufgang gekoppelt ist und durch Licht beschleunigt wird, wodurch sich seine Periodenlänge verkürzt. Der E-Oszillator ist an den Sonnenuntergang gekoppelt und wird durch Licht verzögert, wodurch sich seine Periodenlänge verlängert (Helfrich-Förster, 2009). Da die langlebige Madeira Schabe sowohl

am Äquator als auch in moderaten Zonen beheimatet ist, muss sie aufgrund des Jahreszeitenwechsels an lange und kurze Tage angepasst sein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es mehrere *light entrainment pathways* gibt, die Phasenverzögerungen oder Phasenbeschleunigen durch Licht ins Schrittmacherzentrum melden und somit immer den Beginn von Tag und Nacht signalisieren. Die zelluläre Grundlage dieser Licht-abhängigen *entrainment pathways* ist in *R. maderae* bisher nicht bekannt (Arnold et al., 2019).

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass das *pigment dispersing factor* (**PDF**)-Level am Tag erhöht ist (Arendt, 2016). Weiterhin inhibiert PDF die kontralateralen PDF-Zellen und aktiviert die ipsilateralen PDF-Zellen (Gestrich et al., 2018). Daraus kann geschlossen werden, dass ein erhöhtes PDF-Level am Tag zu aktivierten ipsilateralen Zellen führt. Das wiederum lässt darauf schließen, dass sie die Inaktivität des Tieres am Tag steuern. In der Nacht ist das PDF Level gering, die kontralateralen PDF-Zellen werden nicht mehr inhibiert. Somit lässt darauf schließen, dass diese die Aktivität in der Nacht steuern. Es wurde dementsprechend die These aufgestellt, dass unter 12:12 h LD die ipsilateralen PDF-immunreaktiven (**PDF-ir**) Neurone (**PDFME**, plural: **PDFMEs**) die schlaffördernden M-Oszillator Zellen und die kontralateralen PDFMEs die aktivitätsfördernden E-Oszillator Zellen sind. Diese Oszillator Zellen bilden gemeinsam das M Oszillator Netzwerk und das E Oszillator Netzwerk (Arnold et al., 2019; Gestrich et al., 2018; Page, 1978; Stengl & Arendt, 2016). Wenn nun davon ausgegangen wird, dass PDF und MIP in zwei PDF Zellen colokalisieren (Schulze et al., 2012), kann vermutet werden, dass MIP eine Funktion im Netzwerk der Oszillatoren einnimmt.

1.5 Molekulare Grundlagen des circadianen Rhythmus bei *D. melanogaster*

Der circadiane Rhythmus der Laufaktivität von *D. melanogaster* wird durch eine molekulare Uhr gesteuert (Hardin, 2004). Dieser molekularen Uhr liegen verschiedene, miteinander gekoppelte transkriptionale / translationale Rückkopplungsschleifen (**TTL-feedback loops**) zugrunde. Die wichtigsten Komponenten sind die Proteine PERIOD (**PER**) und TIMELESS (**TIM**; Abb. 4). Abhängig vom Grad ihrer Phosphorylierung können sie ein Heterodimer bilden, welches im Nucleus eine Änderung der Affinität der

Transkriptionsfaktoren CLOCK (**CLK**) und CYCLE (**CYC**) zu dem Enhancer-Element (**E-box**) hervorruft. Dadurch wird die Transkription der *per/tim* Gene inhibiert, wodurch die PER und TIM Proteinlevel im Cytoplasma sinken. Durch das Sinken der Proteinlevel diffundieren weniger PER/TIM Heterodimere in den Nucleus hinein, wo sie inhibierend auf die Transkription des *per/tim* Gens wirken. Dieses negative Feedback führt zu einer Oszillation des PER/TIM Levels (Lee et al., 1999; Menet et al., 2010).

Die Transkription von *vri* (**vri**) und *par domaine protein 1 epsilon* (**pdplε**) ist ebenfalls an das Binden von CLK/CYC an die Enhancer-Komponente gekoppelt. Es kommt zu einer negativen oder positiven Rückkopplung bezüglich der Transkription des *clk* Gens (Hardin, 2004). Außerdem wurde ein Protein gefunden, welches für den Lichteingang verantwortlich ist, CRYPTOCHROME (**CRY**). Dieses ermöglicht die Degradation von TIM in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Es kontrolliert lichtabhängige Phasenverschiebungen der Genexpression von Uhrgenen (Emery et al., 2000; Helfrich-Förster et al., 2001; Ivanchenko et al., 2001; Stanewsky et al., 1998).

D. melanogaster ist ein vielgenutzter Modellorganismus. Und dennoch unterscheidet dieser sich in Hinblick auf nicht drosophiloide Insektenarten, wie *R. maderae*. Während die molekularen Grundlagen der inneren Uhren viele Homologien aufweisen, gibt es dennoch einige Unterschiede. So unterscheidet sich das *cry* Gen von *D. melanogaster* (**cryI**) von dem *cry* Gen in *R. maderae* (**cry2**; Rubin et al., 2006). Es wurde weiterhin gezeigt, dass CRY1, im Gegensatz zu CRY2, als Repressor der CLK-CYC-kontrollierten Aktivierung der Transkription der Uhrgene fungiert. Außerdem ist CRY2 nicht lichtsensitiv (Werckenthin et al., 2012; Yuan et al., 2007). Es liegt nicht nur ein Unterschied im *cry* Gen, sondern auch im *tim* Gen vor. Insekten wie *A. mellifera* besitzen kein *tim*, aber die Funktion von TIM in der molekularen Rückkopplungsschleife wird von CRY2 übernommen (Benna et al., 2000). Inwieweit die Funktion von TIM in *R. maderae* dem einen oder anderen Mechanismus entspricht bleibt noch zu klären. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die molekulare Uhr der Schabe große Ähnlichkeit mit der circadianen Uhr der Vertebraten aufweist.

R. maderae besitzt sowohl CRY1 wie auch CRY2, wobei beide als nicht lichtsensitiv nachgewiesen wurden (Koziarek, 2016).

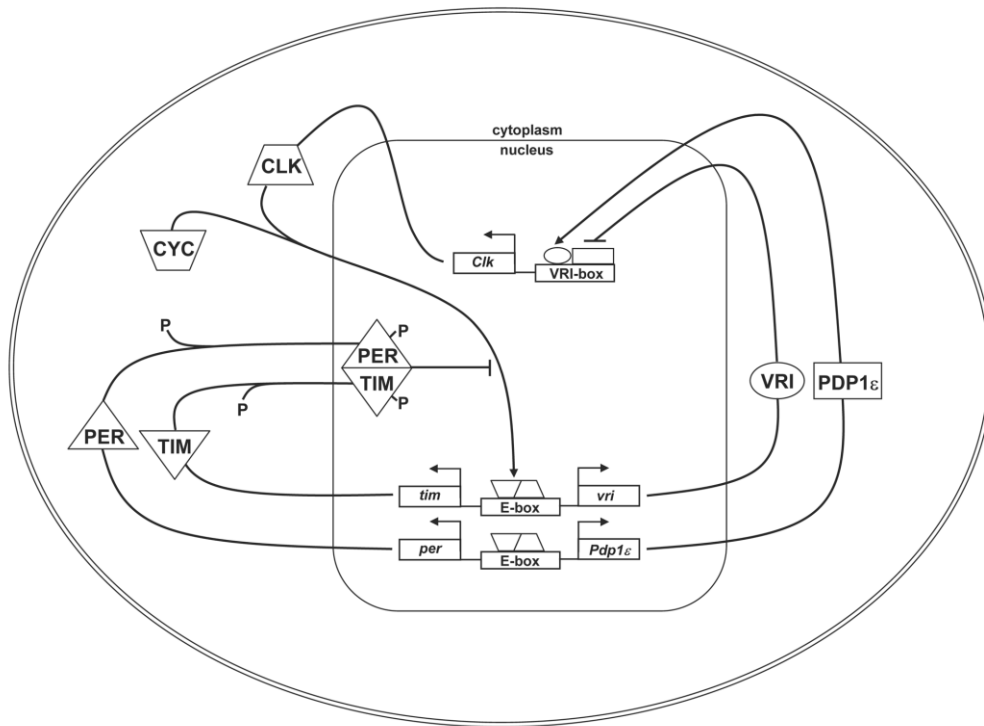


Abb. 4 Modell der Rückkopplungsschleifen in *D. melanogaster*. CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC) bilden ein Heterodimer, das an die Enhancer-Komponente (E-Box) bindet und somit die Transkription von *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *vrille* (*vri*) und *par domain protein 1 epsilon* (*pdple*) initiiert. Sammeln sich PERIOD (PER) und TIMELESS (TIM) im Cytoplasma an, so werden diese phosphoryliert. Sie bilden den PER/TIM Komplex. Im phosphorylierten Zustand gelangen diese Heterodimere in den Zellkern, wo sie inhibierend mit dem CLK/CYC Heterodimer interagieren und die Transkription von *per*, *tim*, *vri* und *pdple* gesenkt wird. Ein steigendes Level von VRILLE (VRI) während des Abends führt zu einer Senkung der Transkription des *clock* (*clk*) Gens. Ein steigendes Level von PDP1ε während des Abends führt zur Aktivierung der Transkription des *clk* Gens (Hardin, 2004).

1.6 Neuropeptide steuern Prozesse der Physiologie und des Verhaltens

Neuropeptide sind allgegenwärtig und an einer Vielzahl von Prozessen der Physiologie und des Verhaltens beteiligt. Sie wurden im gesamten Nervensystem gefunden, wo sie viele Aufgaben erfüllen, wie beispielsweise als Transmitter oder Modulator.

Die Neuropeptide stellen, zusammen mit den Neurotransmittern, die zwei Hauptklassen der Überträgersubstanzen im Nervensystem dar. Die niedermolekularen klassischen Neurotransmitter sind zum Beispiel Acetylcholin und Catecholamin. Zu der weitaus größeren Gruppe neuroaktiver Peptide zählen PDF und die MIPs (Hildebrandt et al., 2015; Schoofs et al., 1991; Veenstra, 1989). Neuropeptide wie PDF und MIP sind beispielsweise an Vorgängen in

dem circadianen System der Madeira Schabe beteiligt (Homberg et al., 2003; Schendzielorz et al., 2014; Schulze et al., 2012).

1.6.1 PDF steuert und koppelt die Lokomotionsrhythmen

PDF ist ein Neuropeptid, welches sowohl im Nervensystem vieler Insekten vorkommt wie auch in einigen Familien der Crustacea, Insekten, Nematoden und Mollusken. Nach der ersten Entdeckung des Neuropeptids in *Romalea microptera* wurde das Peptid auch in einigen anderen Insekten untersucht (Rao et al., 1987). Injektionen von PDF führten zu einer Phasenantwortkurve, welche biphasisch ist. Dieses Verhalten wird ebenso bei der Gabe von Lichtpulsen beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass PDF lichtabhängig ausgeschüttet wird und im nachgeschalteten Mechanismus des Uhrnetzwerkes wirkt (Schendzielorz et al., 2014).

In *R. maderae* konnten PDF-ir Neurone durch Immunfärbung identifiziert werden, die beide AMEs innervieren (Reischig & Stengl, 2002). Aufgrund des Vorkommens von PDF sowohl in der posterioren als auch in der anterioren optischen Kommissur (**AOC**; **POC**), gilt PDF als Kopplungsfaktor zwischen den Schrittmacherzentren (Reischig & Stengl, 2002; Söhler et al., 2011; Stengl et al., 2015; Stengl & Arendt, 2016). Zusätzlich zu der Rolle als Kopplungsfaktor, spielt PDF eine entscheidende Rolle als *Output*-Faktor. Eine ektopische Transplantation der AME in Schaben, welche keinen optischen Lobus aufweisen, führt bei jenen zum Wiedereinsetzen von rhythmischer Lokomotion. Dieses geht einher mit der Regeneration von PDF-ir-Fasern im superior medianen und superior lateralen Protocerebrum (Reischig & Stengl, 2003a). Es wird daher angenommen, dass PDF-Neurone in diesen Bereichen auf lokomotionssteuernde prämotorische Zentren verschalten.

1.6.2 MIP steuert physiologische Prozesse

Das erste MIP wurde in der Heuschrecke *Locusta migratoria* entdeckt. Es unterdrückt nicht nur die spontane Kontraktion des Enddarms von *Locusta migratoria*, sondern auch von *R. maderae*. MIP zeigt also einen inhibierenden Effekt auf viszerale Muskelkontraktionen, wodurch es seinen Namen erhielt. Seitdem wurde eine Vielzahl von Peptiden entdeckt, die zu der Familie der MIPs zählen (Schoofs et al., 1991). In der Madeira Schabe wurden bislang neun

verschiedene MIPs (*Rhm*-MIPs) mit Hilfe von Massenspektrometrischen Untersuchungen und Transkriptomanalysen identifiziert und sequenziert (Susanne Neupert, *unpublished*; Schulze et al., 2012).

Die Aminosäuresequenz von MIP wird von zwei Tryptophanen am amidierten C-Terminus eingerahmt und besteht aus fünf bis acht Aminosäuren. Daher werden sie als W(X₅₋₈)W amide bezeichnet (Conzelmann et al., 2013). MIP zeigt einen allatostatischen Effekt in der Juvenilhormonsynthese. Dieses ist ein wichtiger Regulator für die Entwicklung und Reproduktion von Insekten. Deshalb werden MIPs den Allatostatinen Typ B zugeordnet (M. W. Lorenz et al., 1995; Stay & Tobe, 2007).

MIPs sind allgegenwärtig in den Neuropilen des Gehirns der Insekten, was darauf schließen lässt, dass sie an verschiedensten physiologischen Prozessen beteiligt sind. Sie wirken also pleiotrop. In diesen Neuropilen wurden verschiedene Colokalisationen von Neuropeptiden und Neurotransmittern, wie MIP und PDF, gefunden. MIPs kommen außerdem in ungefähr 30 Neuronen aus sechs der sieben Somagruppen vor, die mit der AME verbunden sind (Arendt, 2016). Nur in den ANes gibt es keine MIP Immunreaktivität. Da in den Zellen der AME auffällig viele Peptide prozessiert werden, weist dies darauf hin, dass sie die innere Uhr der Insekten steuern könnten (Schendzielorz & Stengl, 2013; Schulze et al., 2012).

PDF und MIP agieren gemeinsam im Nervensystem

Aufgrund der zuvor beschriebenen Funktionen von PDF als Eingangs- und Ausgangssignal und als Kopplungsfaktor (Reischig & Stengl, 2002, 2003a; Schendzielorz et al., 2014), könnte eine Colokalisation mit MIP bedeuten, dass dieses ebenfalls an diesen Prozessen beteiligt ist. PDF und MIP sind in zwei anterioren PDFME Neuronen der AME colokalisiert. Diese Colokalisation scheint auf den Einfluss von MIP sowohl auf das circadiane System wie auch auf die Lokomotion hinzuweisen. Außerdem scheinen sie als Neurohormone zu fungieren oder tragen zur Freisetzung solcher bei (Schulze et al., 2012).

Da eine Colokalisation der beiden Proteine sowohl in einem großen anterioren PDFME, den posterioren optischen Tuberkeln (**POTus**) und der POC vorliegt, wird eine Verbindung der anterioren PDFMEs mit den POTus über die POC

vermutet. Da bekannt ist, dass Neurone die POTus mit der protocerebralen Brücke des Zentralkomplexes, welcher als Zentrum für die Lokomotionssteuerung bekannt ist, verbinden, scheint diese Erregungsleitung ein circadianer Output der Lokomotion zu sein (Homborg, 1991; Schulze et al., 2012).

MIP ist an der Anpassung des circadianen Rhythmus an den Lichteingang beteiligt

Das Vorkommen der MIPs in der AME kann vermuten lassen, dass dieses Neuropeptid einen Einfluss bei der Verarbeitung des Lichteingangs und somit auf den circadianen Rhythmus ausübt und mit der Kopplung der beiden Schrittmacher zusammenhängt. Die Injektion von MIP 1 hat bei *R. maderae* zu Beginn der subjektiven Nacht, genau wie die Gabe von Lichtreizen, eine Phasenverzögerung zur Folge. Zum Ende der subjektiven Nacht zeigt sich weder eine Beschleunigung noch eine Verzögerung der Phase. Die Injektion von MIP 2 am Ende der subjektiven Nacht führt, wie auch die Gabe von Lichtreizen zu diesem Zeitpunkt, zu einer Phasenbeschleunigung. Daraus lässt sich schließen, dass MIP 1 und MIP 2 an der Anpassung des circadianen Rhythmus an den Lichteingang beteiligt sind, aber tageszeitabhängig jeweils nur eine Phase der Antwort auf Lichtpulse vermitteln (Schendzielorz & Stengl, 2013; Schulze et al., 2012; Schulze et al., 2013).

MIP-Mangel führt zu erhöhtem Fressverhalten

Untersuchungen in *D. melanogaster* zeigten, dass die Ausschüttung von MIPs die Nahrungsaufnahme reduziert. Bei einem *silencing* der MIP-Expression, zeigen die Fliegen auch nach Nahrungsaufnahme weiterhin gesteigerten Hunger und damit einhergehende Nahrungsaufnahme. Daraus resultiert ein erhöhtes Körpergewicht (Min et al., 2016).

Besonders MIP, das in Grillen zu finden ist, weist am N-Terminus Ähnlichkeiten zu Galanin auf, welches in Vertebraten zu finden ist. Bei ihnen sorgt das Neuropeptid ebenfalls für das Inhibieren von viszerale Kontraktionen (Aguilar et al., 2006).

MIP steuert den Schlaf-Wach-Rhythmus

Der Schlaf wird von zwei regulatorischen Systemen gesteuert, dem circadianen und dem homöostatischen. Sie regulieren den Zeitpunkt und die Dauer des Schlafes (Beersma, 1998). In *R. maderae* sind PDF-Level am Tag erhöht, sodass es als wachfördernder Faktor vermutet wird (Arendt, 2016). Schlaffördernde Faktoren in *R. maderae* sind bislang nicht bekannt. Ein schlaffördernder Faktor in *Drosophila* ist die Ausschüttung von MIP, das dem wachfördernden PDF entgegensteht. Als ein solcher Schlafregulator wird MIP kurz vor oder während der Schlafphasen ausgeschüttet. Im Laufe eines Tages oszilliert das MIP Level im Gehirn von *D. melanogaster*: Während der Schlafphase ist das MIP Level erhöht, während der Wachphase hingegen vermindert (Oh et al., 2014).

Das erhöhte MIP Level in der Schlafphase nimmt im Verlauf dieser Phase ab. Da MIP somit in *Drosophila* als schlaffördernder Faktor gilt, sollte Schlafentzug (SE) zu einer dauerhaften MIP Ausschüttung führen. Tatsächlich konnte mit Antikörperfärbungen gezeigt werden, dass die anti-MIP-Färbung nach einem zwölfstündigen mechanischen SE im optischen Lobus sehr viel geringer ausfiel. Eine starke Reduktion der anti-MIP-Färbung bedeutet eine massive Sekretion von MIP während des SE (Oh et al., 2014). Zudem zeigte sich in anderen MIP Neuronen kaum ein Unterschied, sodass die Region zur Steuerung des Schlafverhaltens auf den optischen Lobus eingegrenzt werden konnte. Weitere Versuche demonstrierten, dass bestimmte Zellen des circadianen Systems tageszeitabhängig die Schlafhäufigkeit beeinflussen. Der einzige derzeit identifizierte Rezeptor für MIPs ist der Sexpeptidrezeptor (SPR). Durch Transkriptomanalysen wurde vor Kurzem ein weiterer potenzieller MIP-Rezeptor in *R. maderae* identifiziert, welcher in seiner Sequenz starke Homologien zu SPR aufweist (Achim Werckenthin, *unpublished*).

SPR ist für die Aufrechterhaltung der Schlafhomöostase verantwortlich, denn nach einem zwölfstündigen SE holte *D. melanogaster* etwa 20 % des verpassten Schlafes nach, während es bei Fruchtfliegen mit SPR-Mangel nicht zu einem Erholungsschlaf kam (Oh et al., 2014). Ein *knock down* von SPR in den kleinen, lateralen, ventralen Neuronen (**s-LNvs**) reduziert die Schlafhäufigkeit und -dauer am subjektiven Tag der Tiere, wohingegen ein *knock down* in den großen LNvs (**l-LNvs**) die Schlafmenge und -dauer in der subjektiven Nacht der Tiere reduziert. Es kann also zusammengefasst werden, dass die Ausschüttung von

MIP und Bindung an den SPR in den LNvs die Schlafhomöostase und die Schlafphase konsolidieren (Oh et al., 2014).

1.7 Ziel dieser Arbeit

In dieser wissenschaftlichen Hausarbeit soll untersucht werden, ob das MIP-4 an der circadianen Verarbeitung von Signalen beteiligt und damit ein Modulator des circadianen Systems der Madeira Schabe ist. Außerdem soll überprüft werden, ob sich die Beeinflussung des MIP-Signalweges auf das Schlafverhalten der Tiere auswirkt und ob dieses sich nach einem mechanischen SE MIP-abhängig verändert.

Diesbezüglich ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- Führt die Injektion von MIP-4 zu einer Phasenverschiebung, wie sie bei der Gabe von Lichtpulsen zu beobachten ist?
- Führt ein *knock down* des *mip*-Präkursors (*mip-precursor*) und des putativen *mip*-Rezeptors (*mip-pre/mip-r knock down*) zu einem veränderten Schlafverhalten und wirkt sich ein mechanischer SE auf mögliche Unterschiede aus?

2. Material und Methoden

Zur Ermittlung von Effekten des Neuropeptids Myoinhibitorisches Peptid (MIP)-4 auf die circadiane Laufaktivität der Schabe wurden Laufradassays in Kombination mit Injektionen von Neuropeptidlösungen durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob Tiere mit einem *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* ein anderes Verhalten zeigen als Kontrolltiere ohne diesen *knock down*, wenn ihnen Schlaf verwehrt wurde.

2.1 Die Aufzucht der Madeira Schabe

Rhyparobia maderae (*Leucophaea madera*), auch Madeira Schabe genannt, wird der Ordnung der Blattodea zugeordnet (Beccaloni, 2014). Vorzugsweise leben sie gesellig in warmen und feuchten Regionen (Bell, 1990).

Aus diesem Grund werden die Madeira Schaben in der Tierzucht der Abteilung bei einer Temperatur von 21 °C bis 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 % bis 60 % gehalten. Der Lebensraum einer Kolonie von etwa 800 Tieren ist eine große Polyethylenbox, die von Juvenilen aller Stadien und adulten weiblichen und männlichen Schaben zusammen bewohnt wird. Zu jeder Zeit haben sie Zugang zu Nahrung in Form von Trockenfutter und Trinkwasser.

Der Boden dieser Boxen ist mit Sägespänen ausgelegt und mit Eierkartons bestückt, welche den Tieren als Unterschlupf und Versteckmöglichkeit dienen. Außerdem gibt es zwei voneinander getrennte Bestände in inversen 12:12 LD Rhythmen. Im Zeitraum von acht bis 20 Uhr (Winterzeit) sind die Tiere Weißlicht, von 20 bis acht Uhr der Dunkelheit ausgesetzt. Bei der inversen Zucht sind die Licht- und Dunkelphase genau entgegengesetzt.

2.2 Der Laufadassay

Um den Einfluss von bestimmten Substanzen auf den circadianen Rhythmus der Madeira Schabe zu bestimmen, wurde die Laufaktivität als Indiz der Aktivität der Madeira Schabe gemessen (Gwinner, 1974).

2.2.1 Der Aufbau des Laufrads

Adulte männliche Tiere wurden zu verschiedenen Zeitgeber (ZT) Zeiten den oben genannten Kolonien entnommen und im, für die Tiere nicht sichtbaren,

Rotlicht in Laufräder eingesetzt. Dann wurde das Rotlicht ausgeschaltet und die nachtaktiven Tiere verblieben in konstanter Dunkelheit (**DD**).

Jeweils sechzehn Laufräder befanden sich in einer lichtundurchlässigen Box und waren über Verbindungskabel mit einem Logger verbunden. Die Laufräder wurden jeweils mit zwei Magneten versehen (Abb. 5). Nach jeder 180° Drehung des Rades schloss ein Magnet über einen Magnetfeldsensor einen Stromkreis und der entstandene elektrische Impuls wurde von einem Logger als halbe Laufradumdrehung im Textformat auf einer SD-Karte aufgezeichnet. Der Logger wurde über eine haus eigene Software angesteuert (C. Lohrey, Universität Kassel).

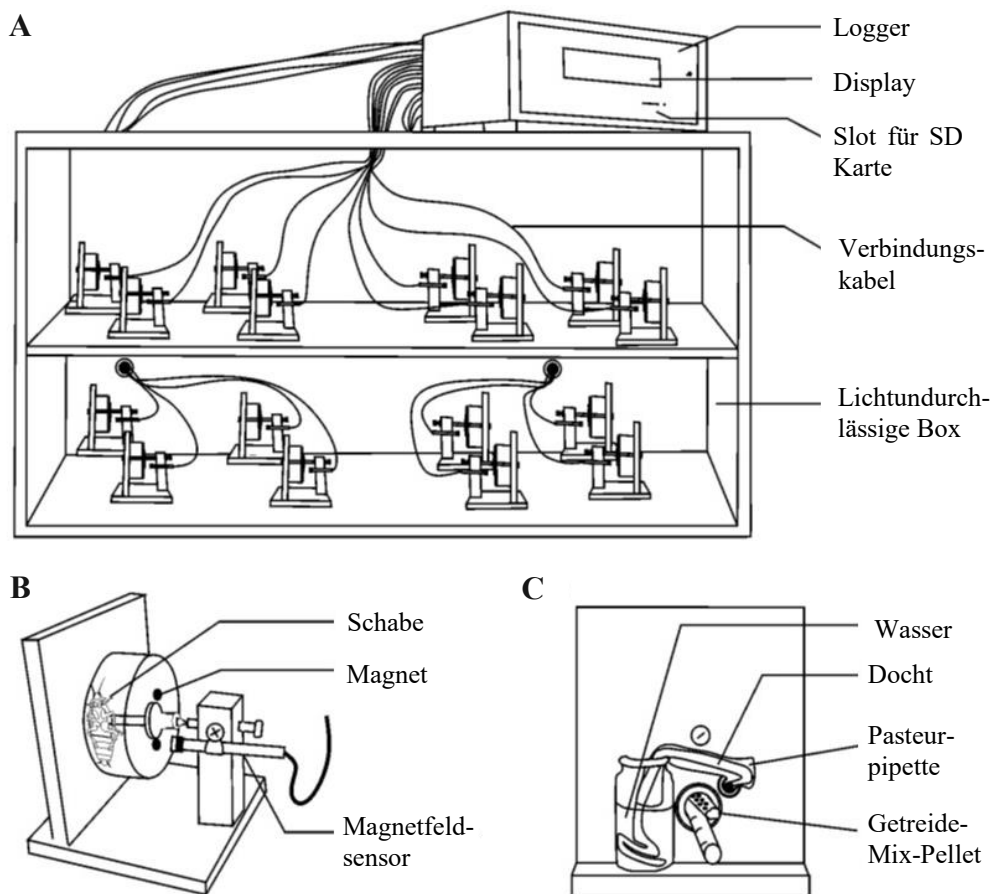


Abb. 5 Schema des experimentellen Aufbaus zur Aufnahme und Analyse der circadianen Lokomotion der Schabe *R. maderae*. **A:** Insgesamt sechzehn Schaben fanden in der lichtundurchlässigen Box Platz. Die circadianen Aktivitätsmuster wurden als Anzahl der Laufradumdrehungen von einem Logger aufgezeichnet. **B:** Individuen wurden in Laufräder gesetzt, welche mit zwei Magneten ausgestattet sind. Magnetfeldsensoren wurden zur Detektion der Laufraddrehungen genutzt. **C:** Während des Experiments haben die Schaben dauerhaften Zugang zu Futter und Wasser. Die Nahrungsversorgung erfolgt von der Rückseite des Rades aus (Quelle: verändert nach Arendt, 2016).

2.2.2 Das Programm ActogramJ

ActogramJ (Schmid et al., 2011) wurde genutzt, um die Aktivitätsmuster der einzelnen Schaben zu analysieren. Dieses Programm ist ein *Software Plug-in* für das Programm ImageJ (*National Institut of Health, Bethesda, USA*). Mithilfe von ActogramJ war es möglich, sowohl den Beginn der Aktivität wie auch die Periodenlänge der Individuen zu bestimmen. Dafür wurde die *Chi-Square-Periodogram-Analyse* genutzt. Die Tiere wurden für mindestens zehn Tage vor und nach einer Injektion in den Laufrädern gelassen und deren rhythmische lokomotorische Aktivität gemessen.

Neben der Periodenlänge wurde auch der Aktivitätsbeginn der Tiere ermittelt, was die Berechnung einer möglichen Phasenverschiebung nach einer Injektion möglich machte. Für die Berechnung der Phasenverschiebung wurde jeweils eine Regressionsgerade durch die Punkte der Aktivitätsbeginne vor und nach der Injektion gelegt. Die Differenz zwischen den Regressionsgeraden am Tag der Injektion ist der hervorgerufene Shift.

2.2.3 Die Injektionen

Um das Tier für eine Injektion vorzubereiten, wurde es aus dem Laufrad herausgenommen und mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) betäubt. Im betäubten Zustand wurde es dann in einen Halter aus Plexiglas und Metall eingespannt, sodass das Tier, im Besonderen der Kopf, fixiert und stabilisiert war. Unter Rotlicht wurden entweder $2 \mu\text{L}$ *Rhm-MIP-4* in verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} M, 10^{-6} M, 10^{-9} M) oder einfachkonzentrierte Ringer-Lösung durch das Komplexauge in die Hämolymphe der Kopfkapsel injiziert. Für die Injektion wurde eine Kolbenhubpipette (*HandyStep*, Brand, Wertheim, Deutschland) verwendet, auf die eine Kanüle gesetzt wurde (Abb. 6; Schulze et al., 2013). Die Kontroll-Injektionen enthielten ausschließlich eine einfach konzentrierte

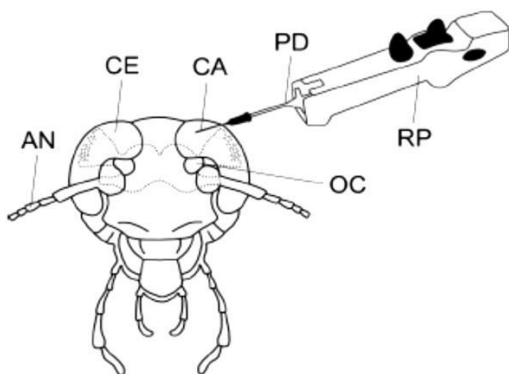


Abb. 6 Injektionstechnik. Substanzen werden mithilfe der Pipette (RP) durch das Komplexauge (CE) in die Hämolymphe nahe dem Gehirn der Madeira Schabe (gepunktete Linie) injiziert. Auf die Präzisionsspitze (PD) wird eine Kanüle (CA) aufgesetzt. AN: Antenne; OC: Ocelle (Schulze et al., 2013).

Ringerlösung. Danach wurde das Tier in das Laufrad zurückgesetzt. Nach einer kurzen Erholung von etwa zwei Tagen begannen die Schaben in der Regel wieder zu laufen.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Phasenverschiebungen der Versuchstiere wurden, wie zuvor beschrieben, berechnet ($\pm\Delta\Phi \pm$ Standardabweichung in Stunden). Nachdem der Shapiro-Wilk Test eine Normalverteilung des Datensatzes nicht feststellen konnte, wurde ein nicht parametrischer Test genutzt. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt, gefolgt vom Dunn's Post-hoc-Test. Die Periodenlängen vor und nach den Injektionen wurden mit einem gepaarten t-Test verglichen, da hier eine Normalverteilung der Daten vorlag.

2.3 Die Arena – Schlafentzug

Die nachtaktiven Schaben ruhen (schlafen) am subjektiven Tag (im DD) im Laufrad, während sie in der subjektiven Nacht wie kleine Hamster im Laufrad rennen. Die freilaufende, endogene Periodenlänge ihres Aktivitätsrhythmus beträgt etwa 23,4 h (Abb. 3C). Es sollte untersucht werden, ob MIP ein Eingangssignal in den Schaltkreis der circadianen Uhr der Madeira Schabe darstellt, welcher den Schlaf steuert. Deshalb wurden zwei Versuchstiergruppen im Laufradassay mit Kontrolltieren verglichen. In der ersten Versuchsgruppe wurde die mRNA des *mip-precursor* Gens und des putativen *mip*-Rezeptor Gens durch RNA-Interferenz (RNA_i) Experimente herunterreguliert (Doppel- *knock down*). Die zweite Versuchsgruppe besitzt einen *gfp knock down* (Oh et al., 2014). Die zweite Versuchsgruppe dient als Kontrollgruppe, da die Madeira Schabe kein *gfp* Gen besitzt.

2.3.1 Gen *Silencing* durch RNA Interferenz

Der *knock down* eines Gens (*Silencing*) beschreibt die drastische Reduktion des Genproduktes. Dabei werden weder das Gen noch seine Transkription beeinträchtigt, sondern die Translationsrate der mRNA wird herunterreguliert, indem durch eine RNA_i die respektive mRNA abgebaut wird. In eukaryotischen Zellen kommt normalerweise nie doppelsträngige RNA (**dsRNA**) vor, außer die

Zelle wird von einem doppelsträngigen Virus befallen. Eine Maschinerie des Immunsystems der Zelle, der Dicer, erkennt die virale dsRNA und zerlegt sie in kleine Fragmente. Diese Fragmente werden dann vom Slicer dazu genutzt, komplementäre *Messenger* RNA (**mRNA**) zu finden und zu degradieren. Dies ist ein post-translationaler Prozess der Genregulierung und dient der Abwehr von Viren. Die dsRNA aktiviert also einen Prozess, der zum Herabsetzen der Translation eines Gens führt (Abb. 7). Dafür ist antisense RNA von einer Länge zwischen 20 und 30 Nukleotiden nötig, die komplementär zu der Zielsequenz der mRNA ist (Tabara et al., 1998).

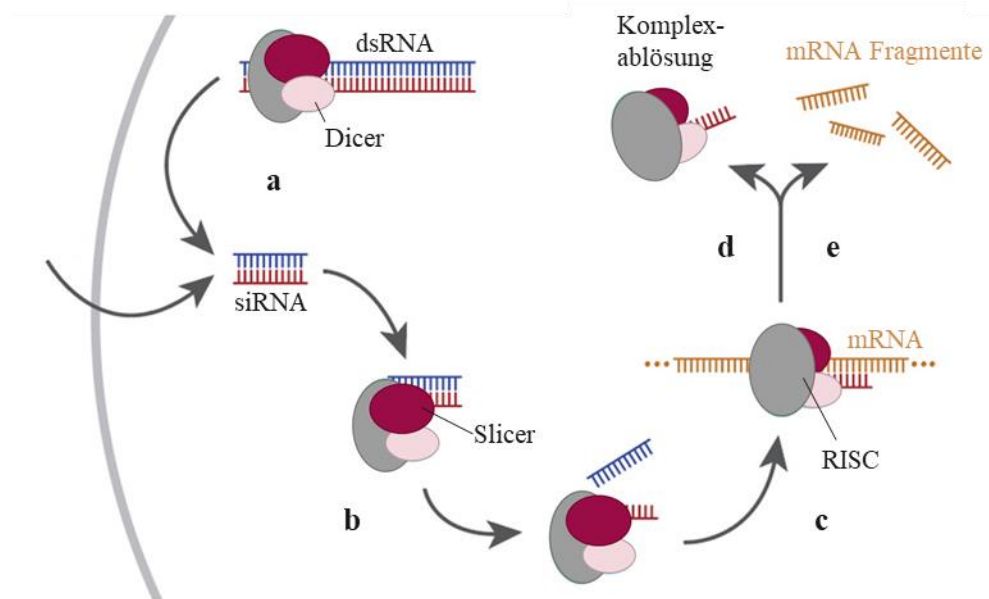


Abb. 7 Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi). **a:** *short-interfering* RNA (siRNA) wird entweder exogen eingebracht oder endogen von *Dicer* (rosa) erzeugt. **b:** Die siRNA wird von *Slicer* (violett) in einzelsträngige RNA gespalten. **c:** Durch die einzelsträngige RNA wird RISC aktiviert, an komplementäre *messenger* RNA (mRNA) zu binden. **d:** Der RISC-siRNA-Komplex dissoziiert nach Spaltung der komplementären mRNA. **e:** Die fragmentierte mRNA kann nun abgebaut werden. Durch den Abbau kann die Sequenz nicht für die Proteinbiosynthese verwendet werden (verändert nach B. Kim et al., 2019).

Es wurden verschiedene Komponenten beschrieben, die eine wichtige Rolle in diesem Prozess einnehmen. Dazu gehören vor allem die Enzyme *Dicer* und *Slicer*. Das Enzym *Dicer* ist eine Ribonuklease, welche die dsRNA in kürzere dsRNA Fragmente degradiert. Die kürzeren Fragmente können in zwei Kategorien unterteilt werden, die *micro* RNA (**miRNA**) und die *short-interfering* RNA (**siRNA**). Diese aktivieren den RNA-aktivierten *Silencing* Komplex (**RISC**). Das Enzym *Slicer* ist an RISC gebunden und kann *Precursor* miRNA und siRNA binden. Anschließend wird einer der Stränge (*passenger strand*)

durch RISC dissoziiert. Der verbleibende Strang (*leading strand*) kann nun durch Baseninteraktionen an dem Zielgen binden. Das führt zum Herabsetzen beziehungsweise Unterdrücken der Translation des Zielgens durch *Slicer* (Hutvagner & Simard, 2008).

Um die benötigte dsRNA für den RNA_i *knock down* in *R. maderae* zu produzieren, musste zunächst komplementäre DNA des MIP-Rezeptors und des MIP-*precursors* und außerdem des Grünfluoreszierenden Proteins (**GFP**) für die Kontrollgruppe synthetisiert werden. Anschließend wurden die Zielfragmente jeweils in ein Plasmid kloniert und von dort amplifiziert. Durch eine daran anknüpfende *in vitro* Transkription wurde dies dann abgelesen und als RNA transkribiert. Zwei RNA Einzelstränge wurden durch Komplementierung zu einem RNA Doppelstrang (**dsRNA**) zusammengefügt.

2.3.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR dient nach den Verhaltensexperimenten zur Quantifizierung der Ziel-RNA im Gewebe. Es kann damit also überprüft werden, ob der *knock down* in den Tieren erfolgreich war. Dafür wird dem Versuchstier einzelsträngige mRNA entnommen, welche durch das Enzym reverse Transkriptase die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA transkribiert (Abb. 8; Reineke, 2004).

Genau wie bei einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), verändert der *Thermocycler* die benötigte Temperatur sehr schnell und präzise während der einzelnen Zyklen. Jeder Zyklus kann in drei Schritte unterteilt werden, die Denaturierung, die Hybridisierung und die Elongation. Bei Raumtemperatur liegt die Desoxyribonukleinsäure (**DNA**) als Doppelstrang vor. Zudem werden Primer, Nukleotide und Polymerase benötigt. Während der Denaturierung wird die Doppelstrangstruktur der DNA zerstört. In der Elongationsphase lagern sich Primer an die einzelsträngige DNA an, an welchen in der Elongationsphase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden aufgefüllt werden (Abb. 8; Müller & Prange, 2016).

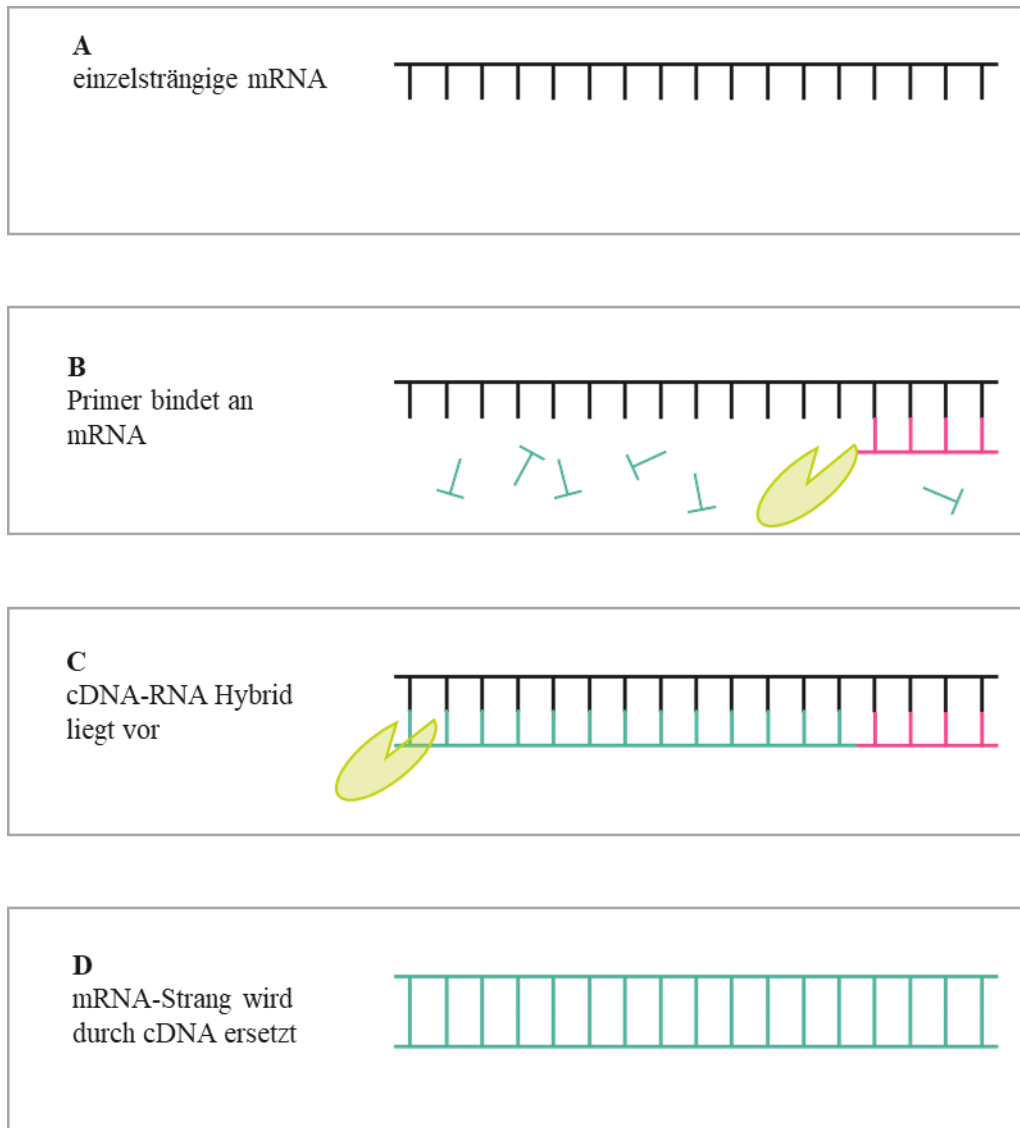


Abb. 8 Mechanismus der reversen Transkription zur Umwandlung von einzelsträngiger mRNA in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA). **A:** Einzelsträngige mRNA (schwarzer Balken mit schwarzen Linien) wurde aus dem Versuchstier extrahiert. **B:** Die reverse Transkriptase (grüne aufgeschnittene Ovale) ist ein Enzym, das einen DNA-Primer (rosa Balken mit rosa Linien) benötigt. **C:** Die reverse Transkriptase katalysiert nun die Synthese der cDNA. Es liegt ein Hybridstrang aus cDNA und RNA vor. **D:** Durch RNase, ein Enzym, das RNA abbaut, wird der RNA Strang abgebaut und durch DNA-Polymerase zu einem DNA Doppelstrang ergänzt. Es liegt doppelsträngige cDNA vor (verändert nach Reineke, 2004).

Bei der qPCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, welcher sich während des Zyklus in die DNA einlagern kann. Dafür wird SYBR Green genutzt. Durch die DNA-Produktion wird dieser Farbstoff aktiv und die Fluoreszenz kann in Echtzeit gemessen werden (Abb. 9). Je nach Anzahl der Kopien, die in der Probe vorhanden sind, wird ein Schwellenwert des Fluoreszenzsignals überschritten oder eben nicht. Diese Angaben erlauben eine absolute Quantifizierung (Müller & Prange, 2016).

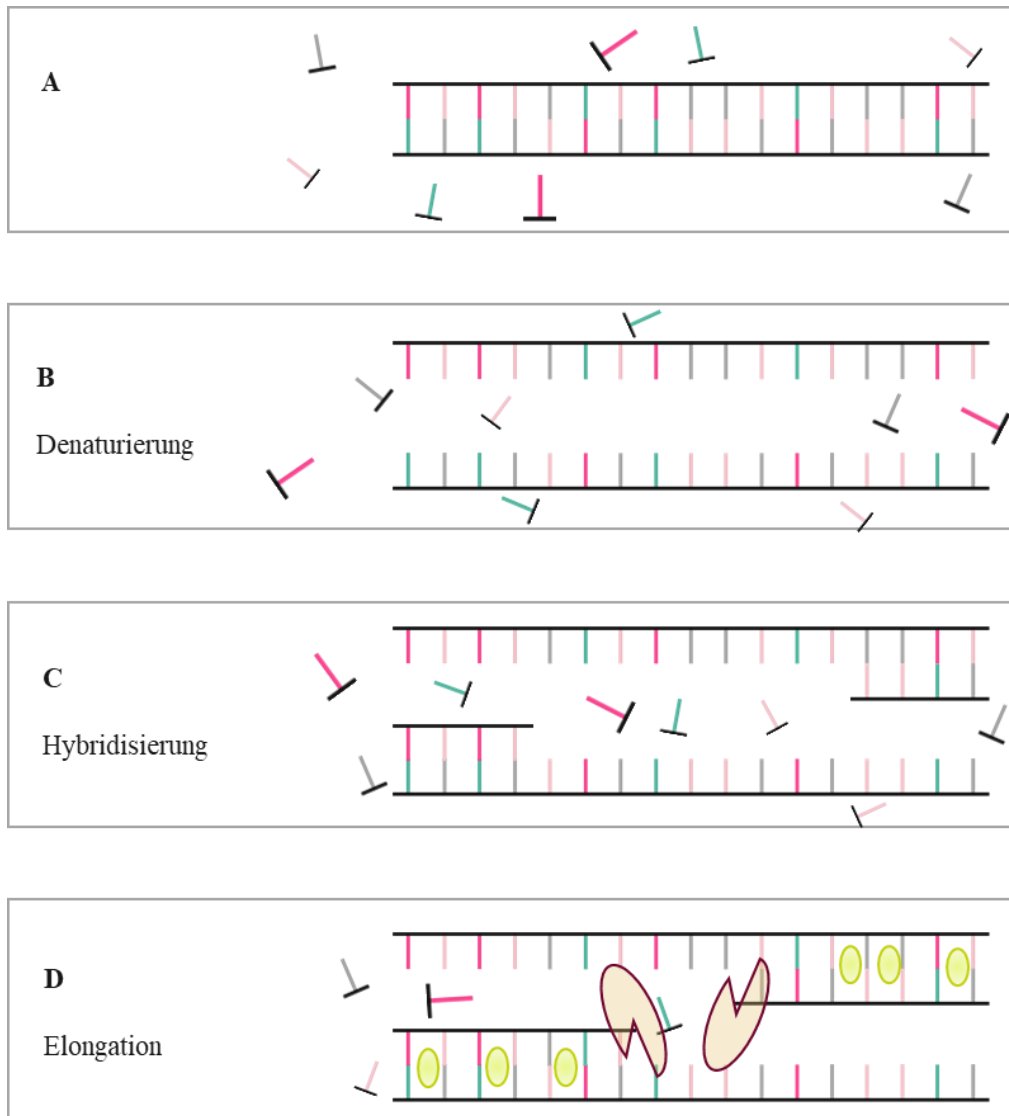


Abb. 9 Molekulare Arbeitsschritte der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Die Probe für die qPCR muss doppelsträngige DNA enthalten (zwei schwarze Balken verbunden mit bunten Linien), Polymerase (goldgelbe aufgeschnittene Kreise), Primer (kurze schwarze Balken mit bunten Linien) und die Nucleotide: Guanin (violette Linie), Cytosin (grüne Linie), Adenin (graue Linie) und Thymin (rosa Linie). **A:** Die DNA liegt in dem Probengemisch als Doppelstrang vor. **B:** Bei einer Temperatur von etwa 90 °C denaturiert die DNA in Einzelstränge. **C:** Sinkt die Temperatur auf etwa 70-55 °C, lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNA an. Dieser Vorgang wird Hybridisierung genannt. **D:** Die Polymerase ist ein Enzym, das in der Elongationsphase die Verknüpfung der Nucleotide an die einzelsträngige DNA und somit die Synthese von doppelsträngiger DNA katalysiert. Der Farbstoff SYBR Green (neongrüne Ovale) wird in die DNA eingelagert (eigene Darstellung).

2.3.3 Der Aufbau der Arenen

Es wurden vier runde, weiße Arenen verwendet, welche einen Bodendurchmesser von 19 cm besitzen (Abb. 10). In Höhe von 5 cm über dem Grund wurde eine durchsichtige Plexiglasscheibe angebracht.

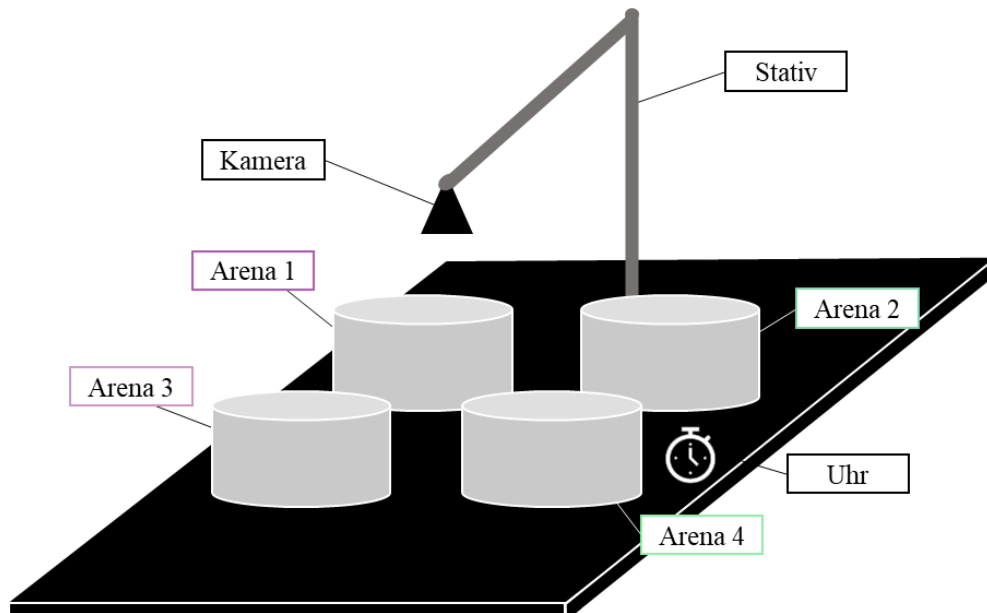


Abb. 10 Vier Arenen wurden gleichzeitig mit einer Kamera im Arena-Assay gefilmt. Die Madeira Schaben wurden einzeln in den Arenen gehalten. Die Besetzung mit MIP *knock down* Tieren und GFP *knock down* Tieren variierte dabei je Versuchsdurchlauf (eigene Darstellung).

Die Wände der Arenen wurden mit mehreren Löchern versehen, kleinere für die Wasserversorgung und größere für die Anbringung von Getreidemix-Pellets, um die Tiere ausreichend mit Wasser und Futter versorgen zu können. Gleichzeitig dienten die ungenutzten Löcher der Luftzufuhr.

Über diesen Arenen wurde eine Videokamera angebracht, welche mithilfe eines Stativs dauerhaft befestigt wurde. Die Videokamera filmte dauerhaft mit dem Programm *Webcam/Screen Video Capture (SoftPerk)*, welches über einen MJPEG Compressor verfügte, sodass sehr große Dateimengen vermieden werden konnten. Da die Kamera über Infrarotlicht verfügte, musste zum Filmen in der Dunkelheit kein Rotlicht verwendet werden. Es konnte so in absoluter Dunkelheit gefilmt werden.

Der Raum, der für die Aufnahmen genutzt wurde, war isoliert von Tageslicht. Dies ermöglichte das Arbeiten unter einem selbstgewählten LD-Rhythmus. Das Tageslicht wurde durch eine Stehlampe mit weißer, schwacher Glühbirne simuliert und der 12:12 h Rhythmus durch eine Zeitschaltuhr vorgegeben.

Je eine Arena wurde mit einem adulten, männlichen Tier, einem Wasserdocht und einem Getreidemix-Pellet bestückt.

Zunächst wurden die Tiere fünf Tage in der Arena gefilmt. Es wurden zwei Tiere mit *gfp knock down* und zwei Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* gewählt. Anschließend wurden sie für 12 h während der Lichtphase in einen langsam drehenden Rotator für 50 mL-Zentrifugenröhrchen gesetzt (Abb. 11), sodass sie kontinuierlich parallel zur Körperachse im Röhrchen mitlaufen mussten und



Abb. 11 Mechanischer Schlafentzug (SE) durch Falcon-Rotator. Je eine Schabe wurde in ein Zentrifugenröhrchen gesetzt. Dieses drehte sich im Falcon-Rotator parallel zu deren Körpermitte, sodass sie während der Rotation seitlich mitlaufen mussten (eigene Aufnahme)

keine Möglichkeit zum Schlafen bekamen (Abb. 12). Die Röhrchen wurden von innen mit Vaseline beschichtet, damit sich die Tiere nicht festhalten konnten. Nach zwölf Stunden SE wurden sie wieder in die Arenen gesetzt. Es wurde für weitere fünf Tage gefilmt.

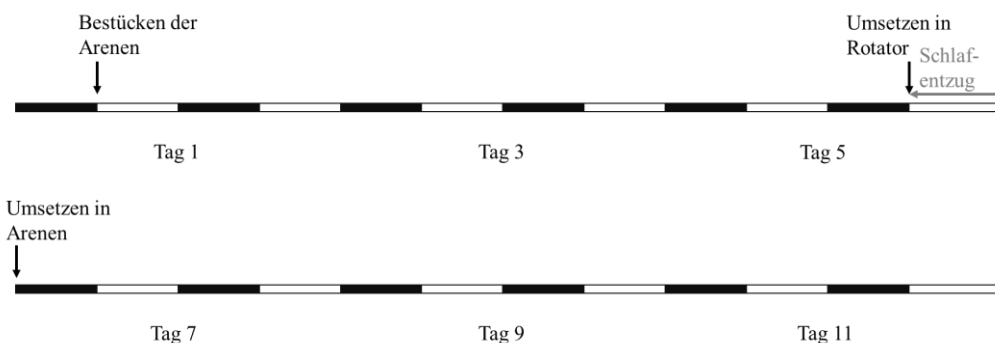


Abb. 12 Zeitlicher Verlauf des Arenaassays vor und nach dem Schlafentzug (SE). Die Tiere wurden fünf Tage ohne Unterbrechung in den Arenen gefilmt. Dabei wurde ein Licht-Dunkel (LD)-Rhythmus von 12:12 h vorgegeben. Anschließend wurde ihnen über einen Zeitraum von zwölf Stunden der Schlaf verweigert. Daraufhin wurden sie wieder in den Arenen gefilmt. Wasser und Futter stand ihnen dauerhaft zur Verfügung (eigene Darstellung).

2.3.4 Das Tracking der Madeira Schabe mit EthoVision XT

Die Laufaktivität der Madeira Schabe in einer runden Arena wurde mithilfe des Programms EthoVision XT (8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) ermittelt. Es diente der computergestützten Verhaltensbeobachtung von verschiedenen Versuchstieren. EthoVision XT wird auch bei Labyrinth-Experimenten, wie zum Beispiel dem Morris Water Maze angewendet (Morris, 1981).

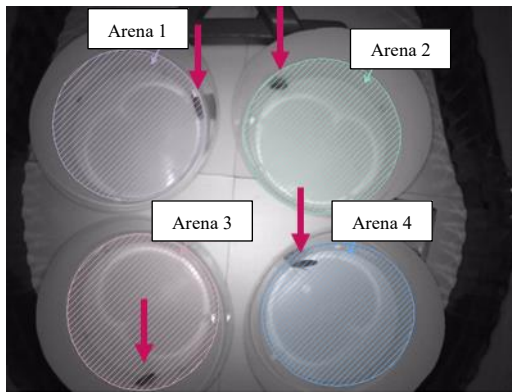


Abb. 13 Kameraansicht auf die vier verwendeten Arenen. Der Bereich, der mithilfe des Programms EthoVision XT analysiert wurde, ist farbig nach Arenen eingezeichnet. Arena 1: violett; Arena 2: grün; Arena 3: rosa; Arena 4: blau. In jeder Arena befindet sich ein dunkles Tier (Pfeile), das sich vom hellen Hintergrund abhebt (eigene Aufnahme).

Dieses Programm ermöglichte das Auswählen und Justieren bestimmter Parameter, wie beispielsweise die Anzahl und Form der Arenen. Explizit konnten die Größe und die genaue Passung des zu untersuchenden Bereiches auf die Arenen angepasst werden (Abb. 13).

Anschließend konnten Einstellungen zur Detektion der Tiere festgelegt werden. Diese waren wichtig für die

Vermeidung von falsch positiven oder falsch negativen Lokalisationen der Versuchstiere. Es wurden sowohl die minimale und maximale Größe der Madeira Schaben festgelegt wie auch der Kontrast derer zum Hintergrund. Während der Nachverfolgung der Versuchstiere durch das Computerprogramm,



wurde das Video abgespielt und der zurückgelegte Weg der Madeira Schaben aufgezeichnet (Abb. 14).

Abb. 14 Laufspur eines Versuchstiers. Das Versuchstier wurde erkannt (gelb) und dessen Bewegung anhand des Körpermittelpunktes (roter Punkt) verfolgt. Der zurückgelegte Weg wird zeichnerisch durch das Programm für einige Sekunden sichtbar gemacht (roter Strich; eigene Aufnahme).

Aufgrund technischer Probleme konnte das Tracking Programm Noldus nicht verwendet werden, sodass auf eine händische Auswertung der Videos zurückgegriffen wurde. Dafür wurde ein Gitternetz über das laufende Video mit den Arenen gelegt. Mithilfe dieses Gitternetzes konnte die zurückgelegte Strecke der Madeira Schaben gemessen werden. Das Gitternetz teilte die Arenen in 1 x 1 cm Quadrate ein (Abb. 15).

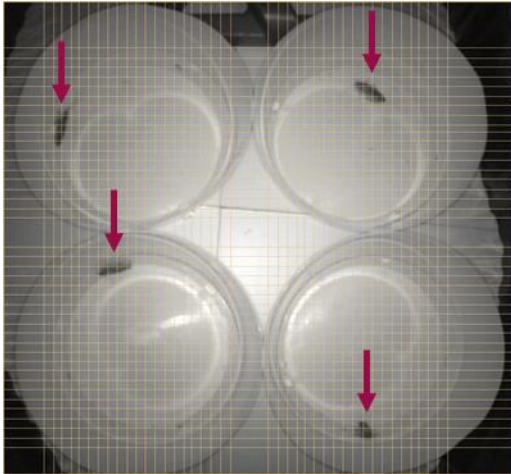


Abb. 15 Kameraansicht auf die vier verwendeten Arenen mit Gitternetz zur händischen Auswertung der Videos. Das Gitternetz (gelb) unterteilt jede Arena in 1 cm² große Quadrate, sodass die zurückgelegte Strecke der Schaben gemessen werden konnte. In jeder Arena befand sich ein dunkles Tier (Pfeile; eigene Aufnahme).

2.3.5 Statistische Auswertung

Da der Shapiro-Wilk Test keine Normalverteilung des Datensatzes feststellen konnte, wurden ausschließlich nicht parametrische Tests durchgeführt. Es wurden die Versuchsgruppen untereinander und innerhalb verglichen. Vor und nach dem SE wurden jeweils die Versuchsgruppen untereinander mit dem ungepaarten Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test getestet. Innerhalb der Gruppen wurde auf einen signifikanten Unterschied der Aktivität mit dem gepaarten Friedman Test mit anschließendem Dunn's *Multiple Comparison* Test getestet. Diese Analysen wurden mit 30 Minuten-, 12 Stunden- und 24 Stunden-Intervallen durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Zeitraum von drei Tagen vor und nach dem SE betrachtet.

3. Ergebnisse

Um herauszufinden, ob *Rhyarobia* myoinhibitorisches Peptid (*Rhm-MIP*)-4 in *R. maderae* an der Vermittlung der Lichtinformation an die innere Uhr beteiligt ist, wurden Injektionen des Neuropeptids in verschiedenen Konzentrationen am Ende des subjektiven Tages und der subjektiven Nacht durchgeführt.

Um die Frage zu beantworten, ob ein Schlafentzug (SE) eine Veränderung des Schlafverhaltens hervorruft und ob MIPs an diesem Prozess beteiligt ist, wurde ein Arenaassay mit *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* Tieren und *gfp knock down* Tieren als Kontrollgruppe durchgeführt. Mittels Videokamera wurde die Aktivität der isolierten Männchen der Madeira Schabe bei 12:12 h Licht-Dunkel-Wechsel (LD) gefilmt und anschließend in unterschiedlichen Intervallen (24 h, 12 h und 0,5 h) vor und nach dem SE ausgewertet. Dabei wurden zwischen den Versuchsgruppen mit *gfp knock down* und *mip-pre/mip-r knock down* vor und nach dem SE keine signifikanten Unterschiede gemessen.

3.1 Injektionen von *Rhm-MIP-4* induzierten keine Phasenverschiebung und Änderung der Periodenlänge

Die Injektion von *Rhm-MIP-4* in die Hämolymphe in unterschiedlichen Konzentrationen induzierte im Vergleich zur Kontrollinjektion von einfach konzentrierter Ringerlösung keine Phasenverschiebung in den Zeiträumen CT 9-12 und CT 21-24 (Tab. 1; Abb. 16). Zwar konnte eine geringe Tendenz der Phasenbeschleunigung bei der Injektion einer Peptidmenge von $2 \cdot 10^{-12}$ mol und eine Tendenz der Phasenverzögerung mit der Peptidmenge von $2 \cdot 10^{-9}$ mol beobachtet werden, doch wiesen die Individuen eine sehr große Streuung auf (Tab. 1; Abb. 17).

Die durchschnittliche Periodenlänge der Tiere (n=22) betrug durchschnittlich 23.55 ± 0.27 h. Nach einer Injektion von Ringerlösung oder Peptidlösung *Rhm-MIP-4* in verschiedenen Konzentrationen änderten sich diese nicht (Tab. 1; Abb. 18).

Tab. 1: Effekte einer Injektion von Ringer- oder *Rhm*-MIP-4-Lösung im Zeitfenster der circadianen Zeit (CT) von 9-12 h und 21-24 h

	Ringer		MIP-4			
	Einfach konzentriert		$2 \cdot 10^{-12}$ mol		$2 \cdot 10^{-9}$ mol	
CT	9-12	21-24	9-12	21-24	9-12	21-24
Anzahl der Tiere	2	3	4	5	6	2
$\Delta\Phi$	0.07 ± 0.18	0.46 ± 0.71	0.27 ± 1.40	0.81 ± 0.99	-0.47 ± 0.45	-1.05 ± 0.66
τ	23.62 ± 0.18	23.42 ± 0.17	23.62 ± 0.23	23.72 ± 0.18	23.41 ± 0.26	23.38 ± 0.25

$\Delta\Phi$: Phasenverschiebung; τ : Periodenlänge

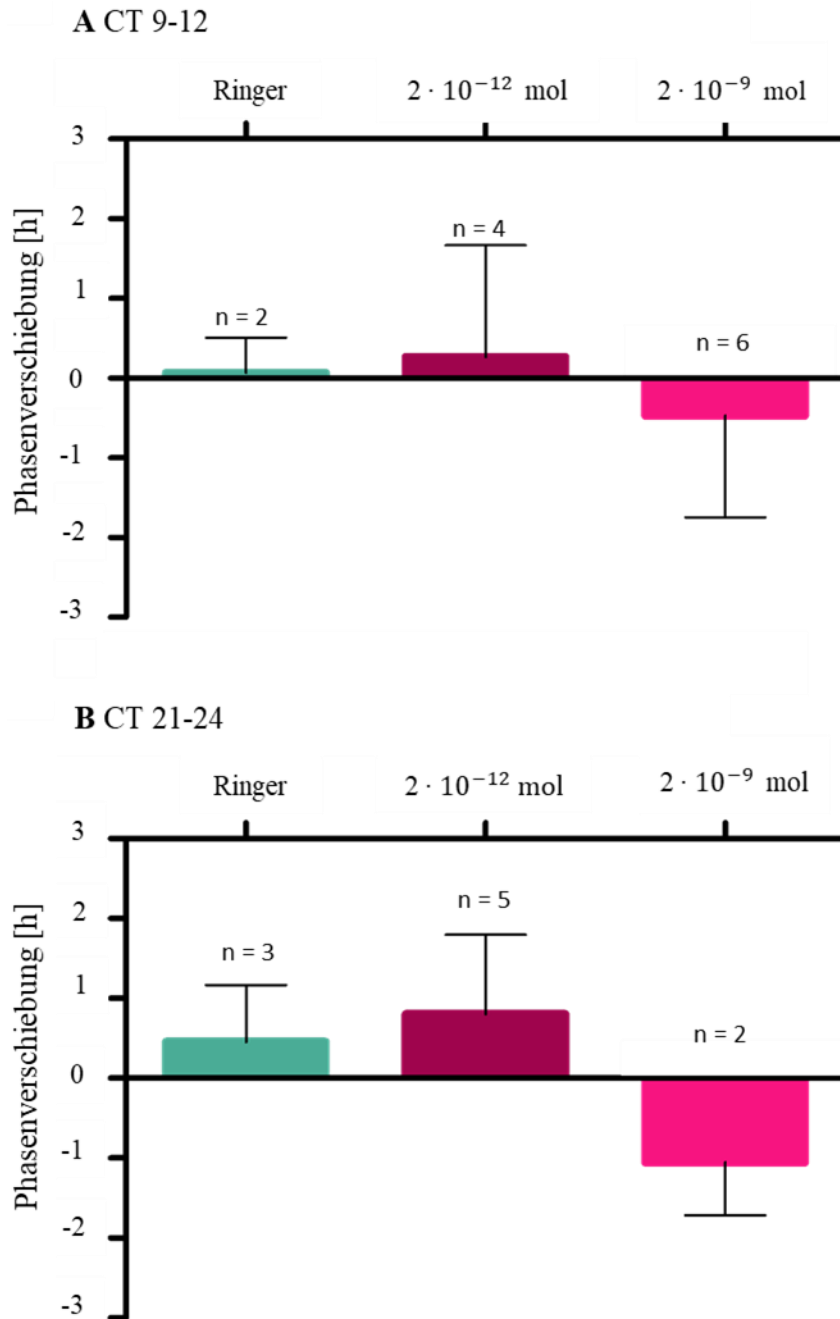


Abb. 16: Die Injektionen von *Rhm*-MIP-4 führten nicht zu einer dosisabhängigen Phasenverschiebung. In **A** wird der Effekt der Phasenverschiebung der Injektion zur circadianen Zeit (CT) 9-12 h gezeigt, in **B** zu CT 21-24. **A:** Der Kontrollgruppe (n = 2) wurde Ringerlösung injiziert, die nicht zu einer signifikanten Phasenverschiebung führte (Friedmann-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, $\alpha = 0.05$). Die Injektion von *Rhm*-MIP-4 in der Konzentration $2 \cdot 10^{-12}$ mol (n=4) führte durchschnittlich zu einer Phasenbeschleunigung, die Injektion der Konzentration $2 \cdot 10^{-9}$ mol (n=6) zu einer Phasenverzögerung, welche jeweils nicht signifikant getestet wurden (Friedmann-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, $\alpha = 0.05$). **B:** Die Kontrollinjektion von Ringerlösung (n = 3) führte nicht zu einer signifikanten Phasenverschiebung. Die Peptidinjektion mit der Konzentration $2 \cdot 10^{-12}$ mol (n=5) führte im Vergleich zur Kontrollinjektion zu einer durchschnittlichen Phasenbeschleunigung, welche jedoch nicht signifikant war. Die Peptidinjektion des *Rhm*-MIP-4 mit der Konzentration von $2 \cdot 10^{-9}$ mol (n=2) führte durchschnittlich zu einer Phasenverzögerung, welche im Vergleich zur Kontrollinjektion ebenfalls nicht signifikant war (Friedmann-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, $\alpha = 0.05$).

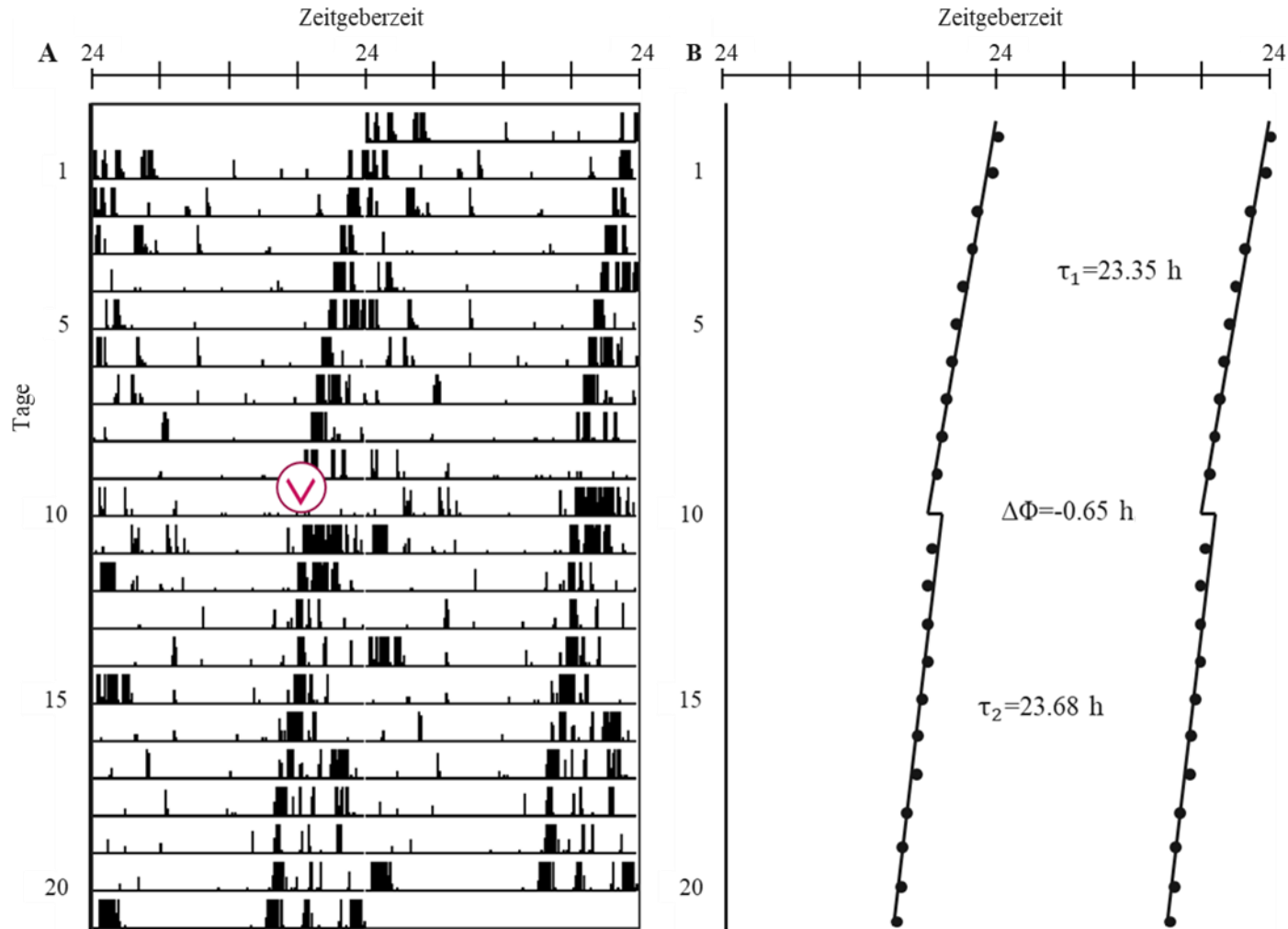


Abb. 17: Die Injektion von *Rhm*-MIP-4 zur circadianen Zeit CT 11.83 mit der Konzentration $2 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ führte zu einer nicht signifikanten Phasenverzögerung ($\Delta\Phi$) von $\Delta\Phi = -0.65 \text{ h}$. **A:** Aktogramm eines *R. maderae* Männchens. Die Injektion erfolgte am Ende des subjektiven Tages des Tieres (Pfeilspitze). **B:** Die Periode des Tieres wird bestimmt vom Aktivitätsbeginn des ersten Tages bis zum Aktivitätsbeginn des darauffolgenden Tages. Der Aktivitätsbeginn wird durch eine Regressionsgerade beschrieben (schwarze Linie). Durch die Injektion tritt eine geringe Phasenverzögerung auf.

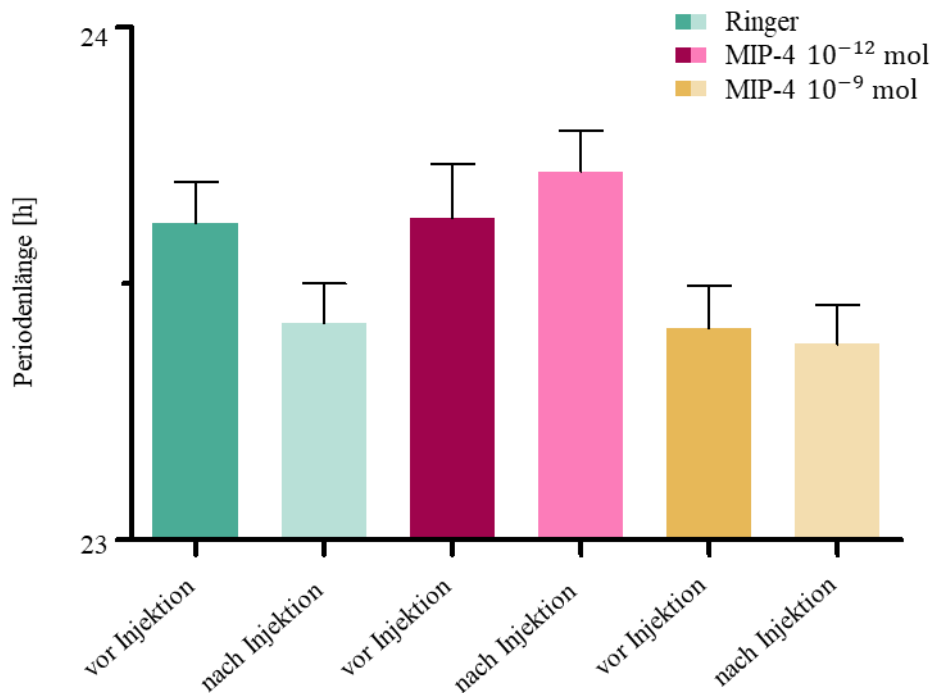


Abb. 18: Periodenlängen der Versuchsgruppen vor und nach der Injektion von Ringerlösung oder *Rhm*-MIP-4-Lösung veränderten sich nicht. Die Kontrollgruppe (n=5), der Ringerlösung injiziert wurde, wies vor (dunkel grüner Balken) und nach der Injektion (hell grüner Balken) keine signifikant unterschiedliche Periodenlänge auf. Auch die Versuchsgruppen, der die Peptidlösung mit der Konzentration 10⁻¹² mol (n=9; violette Balken) und von 10⁻⁹ mol (n=8; gelbe Balken) injiziert wurden, wiesen vor (dunklere Balken) und nach (hellere Balken) der Injektion keine signifikant unterschiedlichen Periodenlängen auf.

3.2 Der *mip-pre/mip-r knock down* führte nicht zu einer Differenz im Aktivitätslevel

Wird die durchschnittliche Aktivität der Tiere pro 24 h-, 12 h-, oder 0,5 h-Intervall betrachtet, kann kein signifikanter Unterschied des Aktivitätslevels zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden (Tab. 2; Tab. 3; Tab. 4; Abb. 19; Abb. 20; Abb. 21). Auch innerhalb der Versuchsgruppen ist der Unterschied der Gesamtaktivität pro Tag (24 h Intervall) zwischen nicht beeinflusster Ruhephase und den Folgen eines Schlafentzugs nicht signifikant (Tab. 2). Der SE veränderte das Aktivitätslevel der Versuchsgruppen im Mittel also nicht. Allerdings traten deutliche individuelle Unterschiede auf.

Obwohl keine signifikanten Unterschiede zu messen sind, ist zu erkennen, dass das Gesamtaktivitätslevel (24 h Intervall) der Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* im Vergleich zu den Tieren mit *gfp knock down* bei nicht beeinflusster Ruhephase verringert wurde. Außerdem wiesen die Versuchstiere mit *gfp knock*

down nach dem SE ein verringertes Aktivitätslevel auf, während das Aktivitätslevel der *mip-pre/mip-r knock down* Tiere unverändert blieb. Zusammenfassend reduzierte der *mip-pre/mip-r knock down* also tendenziell das tägliche Aktivitätslevel, während nach einem SE keine Reduktion zu messen war. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tab. 2; Abb. 19).

Tab. 2: Effekte eines mechanischen Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* Tieren sowie *gfp knock down* Tieren (24 Stunden Intervalle)

	<i>gfp knock down</i>		<i>mip-pre/mip-r knock down</i>	
	Vor SE	Nach SE	Vor SE	Nach SE
Anzahl Tiere	6	6	6	6
Mittlere Strecke ±SEM [cm]	35.49±17.49	10.72±1.70	15.01±3.49	12.23±4.81
Signifikanz	ns		ns	

SEM: Standardfehler; ns: nicht signifikant $P \geq 0.05$

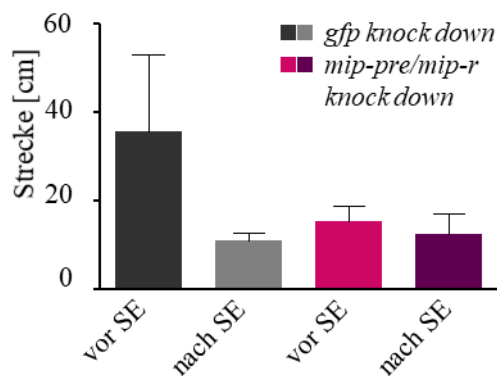


Abb. 19: Der *mip-precursor* und putative *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 24 Stunden Intervall nicht. Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* (violette Balken) wiesen weder vor (hell violette Balken) noch nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug (SE) einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (*gfp knock down*; graue Balken) auf (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; $\alpha = 0.05$). Vor dem SE zeigten die *gfp knock down* Tiere (dunkel graue Balken) ein höheres Aktivitätslevel als nach dem SE (hell graue Balken). Die Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* zeigten ein ähnliches Aktivitätslevel vor und nach dem SE. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant (Friedmann-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, $\alpha = 0.05$). Pro Tier wurde jeweils die mittlere Aktivität aus drei Tagen vor und nach dem SE gewertet.

3.3 Der Schlafentzug verteilte die lokomotorische Aktivität neu auf die Licht- und Dunkelphase

Wird die Aktivität in der Licht- und Dunkelphase getrennt betrachtet (12 h Intervall), so ist innerhalb der Versuchsgruppen eine signifikante Differenz zwischen den Aktivitätslevels der Phasen erkennbar. Während der Lichtphase (ZT 0-12) zeigten die als nachtaktiv bekannten Tiere keine bis sehr wenig Aktivität. In der Dunkelphase (ZT 12-24) stieg die Aktivität signifikant an (Tab. 3; Abb. 20). Nach dem SE ging diese Signifikanz jedoch verloren, was einerseits auf eine Neuverteilung des Aktivitätslevels auf die beiden Phasen (n = 8 von 12) und andererseits auf ein deutlich reduziertes Aktivitätslevel (n = 6 von 12) bei einigen Tieren zurückzuführen ist (Tab. 3; Anhang 1 – C; 1 – G; 2 – C; 2 – G). Eine genaue Aufschlüsselung in 30 min Intervalle sollte eine Information über genaue Zeitpunkte geben, die zu diesem Verlust führen. Jedoch konnte die Aufschlüsselung in 30 min Intervalle keine signifikanten Differenzen innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen nachweisen (Tab. 4; Abb. 21; Abb. 22). Die Neuverteilung der Aktivität betrifft also die gesamte Licht- und Dunkelphase und nicht bestimmte Zeitpunkte. Dabei unterscheidet sich das Verhalten der Kontrolltiere nicht von Tieren mit *mip-pre/mip-r knock down*.

Tab. 3: Effekte eines Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von *mip-precursor* und *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* und *gfp knock down* Tieren (12 Stunden Intervalle)

	<i>gfp knock down</i>				<i>mip-pre/mip-r knock down</i>			
	Vor SE		Nach SE		Vor SE		Nach SE	
Anzahl der Tiere	6		6		6		6	
Zeitgeberzeit	0-12	12-24	0-12	12-24	0-12	12-24	0-12	12-24
Mittlere Strecke ±SEM [cm]	13.70±11.48	57.27±23.71	2.90±0.5164	20.09±4.438	0.59±0.2236	29.43±6.917	1.95±0.4472	22.50±9.319
Signifikanz	*		ns	ns	***		ns	ns

SEM: Standardfehler; ns: nicht signifikant $P \geq 0.05$; *: signifikant $P < 0.05$; ***: signifikant $P < 0.001$

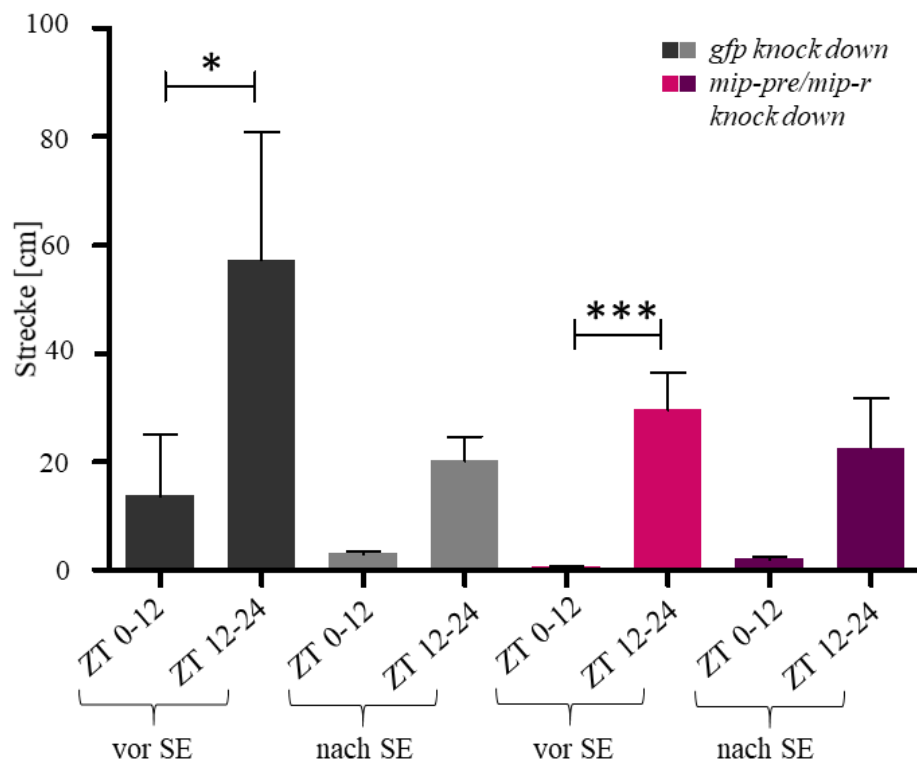


Abb. 20: Der Schlafentzug (SE) hob die Unterschiede der durchschnittlich zurückgelegten Strecke der Schaben im Vergleich von Tag und Nacht auf. Die Tiere mit *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* (violette Balken) wiesen zur Kontrollgruppe (*gfp knock down*; graue Balken) weder vor (hell violette Balken) noch nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug einen signifikanten Unterschied des Aktivitätslevels am Tag oder in der Nacht auf. Vor dem SE wiesen sowohl *mip-pre/mip-r knock down* Tiere ($P < 0.001$; hell violette Balken) wie auch *gfp knock down* Tiere ($P < 0.05$; dunkel graue Balken) einen signifikanten Unterschied zwischen Hell- und Dunkelphase auf. Nach dem SE ging diese Signifikanz verloren ($P \geq 0.05$). Vor dem SE zeigten die *gfp knock down* Tiere in der Licht- und Dunkelphase ein höheres Aktivitätslevel als nach dem SE (hell graue Balken). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($P \geq 0.05$). Pro Tier wurde jeweils die mittlere Aktivität aus drei Tagen vor und nach dem SE gewertet. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test ($\alpha = 0.05$) und Vergleiche innerhalb der Gruppen mit dem Friedman-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, ($\alpha = 0.05$) berechnet.

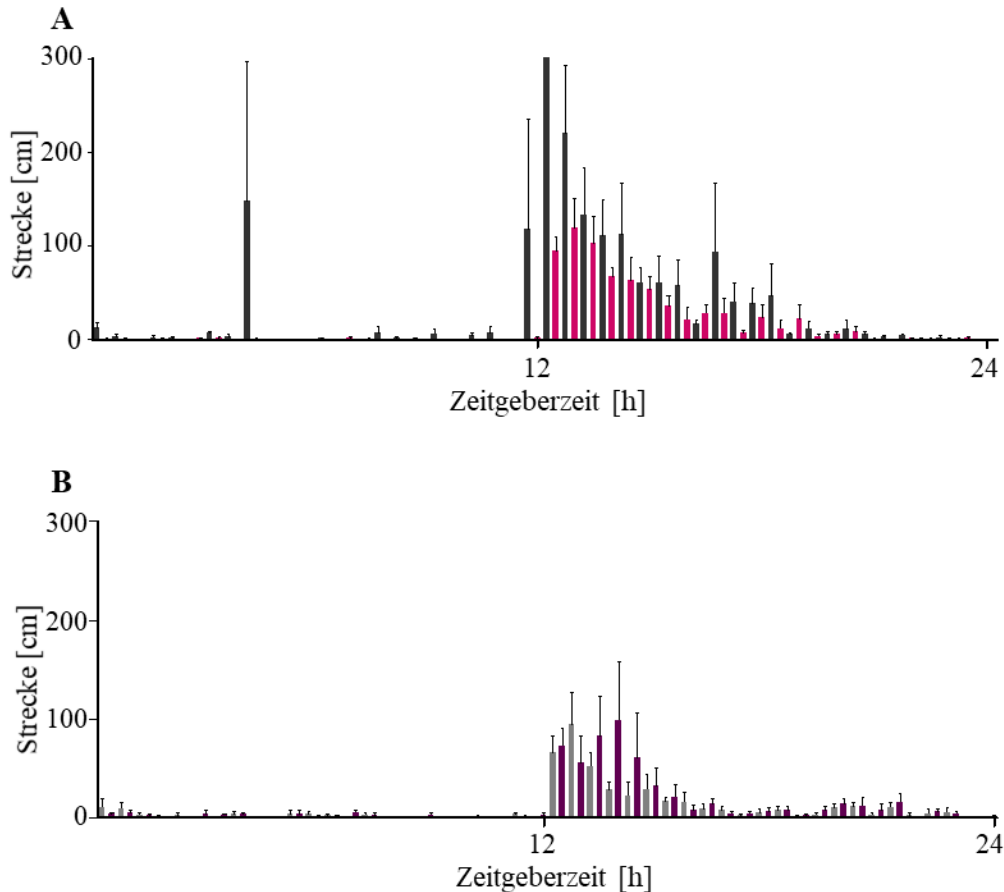


Abb. 21: Der *mip-precursor* und putative *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 30 min Intervall nicht. A+B: Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* (violette Balken) wiesen weder vor (hell violette Balken) noch nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug (SE) einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (*gfp knock down*; graue Balken) auf (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; $\alpha = 0.05$). Der Vergleich der Aktivität innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe zeigte für den *gfp knock down* eine Verringerung der Aktivität nach dem SE, die nicht signifikant war. Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* veränderten das Aktivitätslevel nicht (Friedmann-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, $\alpha = 0.05$). Pro Tier wurde jeweils die mittlere Aktivität aus drei Tagen vor und nach dem SE gewertet. **A:** Die durchschnittliche lokomotorische Aktivität der Kontrollgruppe vor dem SE (dunkel graue Balken) ist höher als die der Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down*. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant. Die durchschnittlichen Aktivitätsmaxima der Versuchstiere mit *gfp knock down* liegen bei 12.5 h und 17.0 h, die Aktivitätsmaxima der Versuchstiere mit *mip-pre/mip-r knock down* bei 13.0 h und 17.0 h. **B:** Die durchschnittliche lokomotorische Aktivität der Kontrollgruppe nach dem SE (hell graue Balken) ist niedriger als die der *mip-pre/mip-r knock down* Tiere. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant. Die Aktivitätsmaxima der Versuchsgruppe mit *gfp knock down* liegen nach dem SE bei 13.0 h und 19.5 h, die der Versuchsgruppe mit *mip-pre/mip-r knock down* bei 14.0 h und 20.0 h.

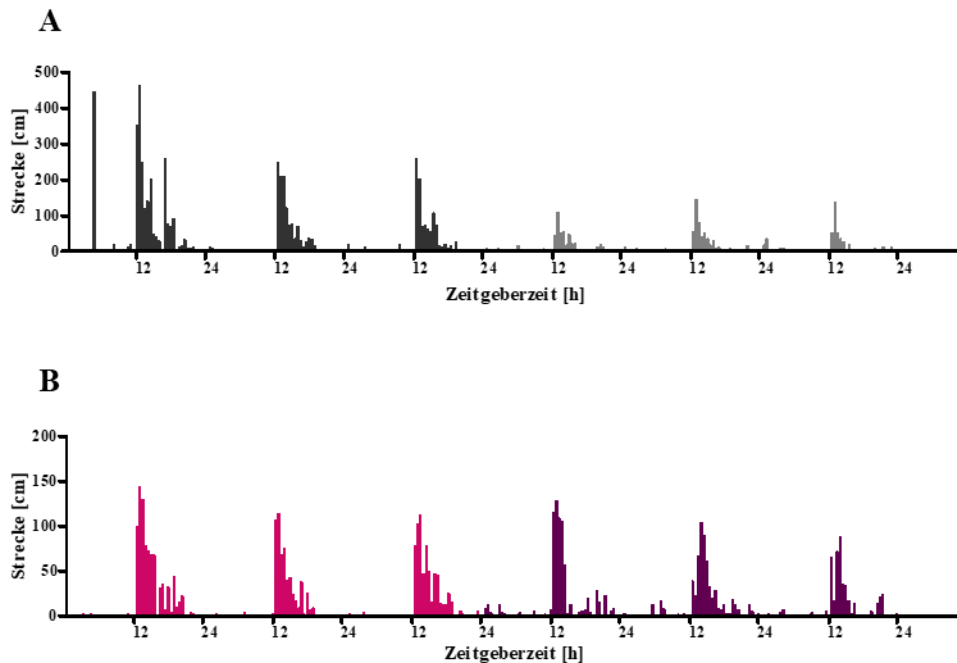


Abb. 22: Der Schlafentzug (SE) veränderte die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Schaben pro 0,5 h Intervall nicht. **A:** Die lokomotorische Aktivität der Tiere mit *gfp knock down* (graue Balken) in den drei Tagen vor dem SE (dunkel graue Balken) ist höher als in den drei Tagen nach dem SE (hell graue Balken). **B:** Die lokomotorische Aktivität der Tiere mit *mip-precursor* und putativem *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* ist in den drei Tagen vor dem SE (hell violette Balken) ähnlich wie in den drei Tagen nach dem SE (dunkel violette Balken). Die Hauptaktivitätsphase befindet sich jeweils in der Nacht. Pro Zeitintervall wurde die mittlere Aktivität aus allen Tieren der Gruppe ermittelt.

3.4 Schlafentzug verschiebt die beiden Aktivitätsmaxima auf einen späteren Zeitpunkt

Sowohl bei nicht beeinflusster Ruhephase wie auch nach dem mechanischen SE weisen beide Versuchsgruppen zwei Aktivitätsmaxima während der Dunkelphase auf (Abb. 21). Die Aktivitätsmaxima bei nicht beeinflusster Ruhephase der *gfp knock down* Tiere (ZT 12.5 und 17.0) unterscheiden sich dabei kaum von denen der *mip-pre/mip-r knock down* Tiere (ZT 13.0 und 17.0). Der SE verzögert die Aktivitätsmaxima jedoch, sodass das zweite Aktivitätsmaximum der Versuchsgruppen um 2.5 h (*gfp knock down*) beziehungsweise 3.0 h (*mip-pre/mip-r knock down*) nach hinten verschoben wurde. Das erste Aktivitätsmaximum verzögert sich nur leicht (*gfp knock down*: ZT 13.0; *mip-pre/mip-r knock down*: ZT 14.0; Abb. 21).

4. Diskussion

Neuropeptiden, wie beispielsweise myoinhibitorischen Peptiden (**MIPs**), werden eine zentrale Rolle als Neuromodulator in circadianen Prozessen zugesprochen. Um weiter herauszufinden, welche MIPs an der Übertragung der Lichtinformation an das circadiane System der Madeira Schabe beteiligt sind, wurden Peptidinjektionen von *Rhyarobia* (**Rhm**)-MIP-4 durchgeführt und im Laufradassay der Effekt auf circadian modulierte Lokomotionsverhalten gemessen. Des Weiteren wurde in einem Arenaassay die Beeinflussung der Quantität lokomotorischer Aktivität der Madeira Schabe durch MIPs untersucht, um Rückschlüsse auf die Funktion der Peptidfamilie in Bezug auf Schlafverhalten zu ziehen. Dafür wurde ein Doppel-*knock down* des *mip*-Peptide-codierenden Gens (*mip-precursor*) und des putativen *mip*-Rezeptor Gens durch RNA_i Experimente durchgeführt. Dieser doppelte *knock down* reguliert sowohl die *mip-precursor* mRNA als auch die mRNA des putativen MIP-Rezeptors herunter. Dadurch soll die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen MIPs und ihrem putativen Rezeptor deutlich verringert werden.

4.1 Beteiligung von *Rhm*-MIP-4 am *light entrainment* von *R. maderae*

Spielt *Rhm*-MIP-4 eine Rolle beim *light entrainment* der Madeira Schabe?

Licht ist der prominenteste Zeitgeber, an den sich circadiane Aktivitäts-Rhythmen verschiedenster Lebewesen ankoppeln. Es wurde in immunocytochemischen und physiologischen Experimenten gezeigt, dass MIP-1 und MIP-2 offensichtlich eine wichtige Rolle im Licht-Eingang (*light entrainment pathway*) der circadianen Uhr der Madeira Schabe, der akzessorischen Medulla (AME), spielen. MIP-1 und MIP-2 vermitteln tageszeitabhängig je eine Phase der Antwort auf Lichtreize in *R. maderae*. Während es bei der Injektion von MIP-1 zu Beginn der subjektiven Nacht zu einer Phasenverzögerung kommt, kommt es bei der Injektion von MIP-2 am Ende der subjektiven Nacht zu einer Phasenbeschleunigung (Schendzielorz & Stengl, 2013; Schulze et al., 2013). Gemeinsam bilden sie somit die Wirkung von Licht auf das circadiane System der Madeira Schabe ab. Licht verzögert die

circadiane Phase (den Beginn) der Laufaktivitäts-Rhythmen zum Beginn der subjektiven Nacht und beschleunigt sie am Ende der subjektiven Nacht. Aus diesem Grund wurden im DD subjektive *dusk* (CT 9-12) und *dawn* (CT 21-24) Zeitfenster für die Injektionen gewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Madeira Schabe zum ersten Mal *Rhm*-MIP-4 injiziert, um zu untersuchen, ob es ein Eingangssignal in die circadiane Uhr sein könnte, das Laufaktivitätsrhythmen steuert.

Die verschiedenen Effekte und Wirkzeitpunkte von MIP-1 und MIP-2 verweisen bereits auf eine Vielseitigkeit der Funktionen der MIPs im circadianen System der Madeira Schaben. Injektionen von *Rhm*-MIP-4 am subjektiven Ende der Nacht deuteten an, dass eventuell zu dieser Zeit dosisabhängige Phasen-Verzögerungen/Beschleunigungen hervorgerufen werden könnten. Da jedoch die Anzahl der durchgeführten Experimente nicht ausreichen, um eine klare Aussage zu treffen, müssten noch mehr Experimente mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden. Bisher sind bereits drei verschiedene Wirkweisen von MIPs bekannt: Zum einen eben die Phasenverzögerung (MIP-1; *dusk*) und -beschleunigung (MIP-2; *dawn*) und zum anderen vielleicht auch eine Funktion von MIP-4 als Eingangssignal in die AME, da sich auch bei diesem Peptid tageszeitabhängige Wirkungen auf die Laufaktivitätsrhythmen in *R. maderae* andeuten.

Da insgesamt neun MIPs auf dem *mip-precursor* kodiert sind, haben offensichtlich die verschiedenen MIPs alle unterschiedliche, vielleicht synergistische oder komplementäre Aufgaben und Funktionen nicht nur in der AME der Madeira Schabe. Dafür spricht auch, dass MIPs in verschiedenen Teilen des Gehirns lokalisiert sind, was für eine Teilhabe an verschiedenen Schaltkreisen spricht. Es wurden bereits vielseitige Funktionen der MIPs in verschiedenen Insektenarten entdeckt, wie beispielsweise die Juvenilhormonsynthese, die Steuerung des Fressverhalten und des Schlaf-Wach-Rhythmus (Nässel, 2002; Nässel & Winther, 2010). *Rhm*-MIP-4 könnte auch in diesen Netzwerken eine entscheidende Rolle spielen.

Methoden- und Fehlerdiskussion

Die Laufräder, die mit einzelnen Tieren bestückt waren, wurden in großen Holzboxen an die Logger angeschlossen. Diese Holzboxen wiesen zumeist

genügend Platz für 16 solcher Laufräder auf. Eine verwendete Box (C) war kleiner als die anderen. Zu Beginn waren in dieser Box dennoch 16 Laufräder untergebracht. Da diese jedoch sehr dicht beieinander standen, haben sich die Madeira Schaben teilweise in ihrem Aktivitätsrhythmus aneinander angekoppelt. Aus diesem Grund wurden nach einiger Zeit zwei Laufräder entfernt, wodurch nun genügend Platz in der Box vorhanden war und es nicht mehr zum Ankoppeln zwischen den Schaben kam. Auch die Pflege der Boxen, sowie das Auswechseln von Wasser und Futter könnte die Tiere in ihrem Laufverhalten beeinflusst haben. Diese Fehler könnten zu den großen Standardabweichungen pro Messzeit geführt haben.

Um eine hohe Genauigkeit der Periodenlänge und infolgedessen der Phasenverschiebung zu ermöglichen, wurden Kalkulationen mittels Chi-Square Test von zehn Tagen vor und zehn Tagen nach einer Injektion durchgeführt. In einigen Ausnahmefällen war dies jedoch nicht möglich, sodass auch einige Tiere mit kürzerer Analysezeit gewertet wurden. Dies könnte zu geringfügigen Ungenauigkeiten in den Ergebnissen führen. Von einem manuellen Berechnen der Periodenlängen und -shifts wurde abgesehen, um subjektive Messfehler gering zu halten. Durch eine Erhöhung der Anzahl der Versuchstiere pro Neuropeptid-Dosis könnten präzisere, verlässlichere Daten mit weniger Standardabweichungen erzielt werden.

Die Injektionen der Tiere sind eine schonende, minimal-invasive Methode, nach welcher die Tiere lediglich eine kurze Erholungspause benötigen (Schulze et al., 2013). Die Kontrollinjektionen bestätigen dies. Der Eingriff benötigt dennoch einige Übung. Durch ein vorangegangenes Großpraktikum konnte jedoch bereits einige Erfahrungen mit dieser Methode gesammelt und das Handwerk verfeinert werden, weshalb hier kaum Probleme aufgetreten sind.

4.2 Schlafentzug wirkt sich auf das Verhalten von *R. maderae* aus

Führt der *mip-pre/mip-r knock down* zu einem veränderter Schlafverhalten?

In *Drosophila* hält MIP den Schlaf aufrecht, während es nicht für den Beginn des Schlafes verantwortlich ist (Oh et al., 2014). Außerdem fördert MIP den *rebound sleep* nach Schlafentzug. Ein erhöhtes MIP-Level während der Schlafphase und ein gesenktes MIP-Level während der Wachphase wiesen darauf hin (Oh et al., 2014). So könnte ein erhöhtes MIP-Level in *R. maderae* analog zu weniger Aktivität führen. Oder, da *Drosophila* tagaktiv, die Schaben aber nachtaktiv sind, könnte MIP in der Madeira Schabe die gegenteilige Wirkung haben, als in der Fruchtfliege. Für Madeira Schaben mit MIP *knock down* würde dies bedeuten, dass diese weniger Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Die Aktivitätslevel der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit *mip-pre/mip-r knock down* zeigten zwar keinen signifikanten Unterschied, aber es deutete sich an, dass die *knock down* Tiere im Schnitt weniger aktiv waren als die Kontrolltiere. Weitere Versuchsreihen müssen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die Tendenz signifikant wird, MIPs also doch maßgeblich an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus der Madeira Schabe beteiligt sind.

Eine mögliche Erklärung der beobachteten Tendenz zur Abnahme der Aktivität der Versuchstiere könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass MIPs noch an anderen Schaltkreisen im Gehirn wirken, oder auch direkt die Muskulatur beeinflussen. So wurde gezeigt, dass MIPs die Muskulatur des Verdauungssystems inhibieren (Nässel, 2002; Nässel & Winther, 2010). Entsprechend zeigen Fruchtfliegen ohne MIPs (*mip knock out*) ein erhöhtes Fressverhalten und somit eine Zunahme ihres Körpergewichtes (Min et al., 2016). Das erhöhte Körpergewicht könnte sich folglich negativ auf das Aktivitätslevel auswirken, allerdings spricht die potenziell verstärkte Futtersuche *per se* eher für einen positiven Einfluss auf das Aktivitätslevel.

Das Sexpeptid und MIPs sind in *Drosophila* Liganden desselben Rezeptors (Kim et al., 2010). In *Drosophila* Weibchen erhöht das Sexpeptid die Aktivität und reguliert den Schlaf herunter (Isaac et al., 2010). MIPs können also durchaus sex-spezifische Funktionsunterschiede aufweisen. Im hier durchgeführten Experiment wurde der putative MIP-Rezeptor herunterreguliert, welcher große

Homologien zum Sexpeptidrezeptor aufweist (Achim Werckenthin, unveröffentlicht). Der herunterregulierte putative MIP-Rezeptor verhindert somit möglicherweise die Steigerung der Aktivität und könnte das geringere Aktivitätslevel in diesem Experiment erklären. Weibliche Schaben wurden nicht untersucht.

Schlafentzug führt zu Erholungsschlaf und somit zur Veränderung des Schlafverhaltens

Auch Insekten schlafen, wobei ein Ausbleiben von Aktivität von mehr als 5 min als Schlaf definiert wurde (Tobler, 1983). Also wird das Ausbleiben von Aktivität als Ruhephase oder Schlaf betrachtet und Aktivität als Wachphase. Tobler (1983) zeigte in ihren Experimenten zum Schlafentzug (SE) bei *R. maderae*, dass diese den entgangenen Schlaf zu Beginn ihrer Aktivität in der Dunkelphase nachholen. Jenes Verhalten zeigte sich tendenziell auch in dem hier durchgeführten Experiment. Nach dem Schlafentzug zeigten die Schaben der Kontrollgruppe ein verringertes Aktivitätslevel, welches auf das Nachholen des benötigten Schlafes hindeutet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich der Unterschied zwischen einer Kontrollgruppe und einer Versuchsgruppe mit *mip-pre/mip-r knock down* untersucht. In *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass der SPR, welcher starke Homologien zum putativen MIP-Rezeptor in *R. maderae* aufweist, für die Aufrechterhaltung der Schlafhomöostase verantwortlich ist (Oh et al., 2014). Fliegen mit einem gewöhnlichen SPR-Level zeigten nach einem SE das Nachholen von etwa 20 % des entgangenen Schlafes. Fliegen mit *spr knock out* hingegen zeigten dieses Nachholen von Schlaf nicht. Der *spr knock out* führte demnach zu einer reduzierten Schlafhäufigkeit und -dauer in *Drosophila*, was zu einer erhöhten Aktivität führte (Oh et al., 2014). Da die Madeira Schaben einen *knock down* des *mip*-Rezeptors aufwiesen, konnte in Analogie zu *Drosophila* angenommen werden, dass diese Versuchstiere nach dem SE den entgangenen Schlaf nicht nachholen und somit eine erhöhte Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein signifikant unterschiedliches Verhalten in *R. maderae* zwischen Kontrollgruppe (*gfp knock down*) und Versuchsgruppe (*mip-pre/mip-r knock down*) bestätigt werden. Es zeichnet sich jedoch die Tendenz ab, dass das Aktivitätslevel der Tiere mit *gfp*

knock down ein verringertes Aktivitätslevel nach dem SE aufweisen. Die Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* weisen jedoch eher ein ähnliches Aktivitätslevel auf. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die Tiere der Kontrollgruppe (*gfp knock down*) den entgangenen Schlaf nachholen, wohingegen die Tiere mit *mip-pre/mip-r knock down* Tiere dies nicht tun. Wenn MIPs also vor einem SE die Aktivität der Madeira Schaben erhöhen und nach einem solchen SE die Aktivität verringern, könnte dies dafür sprechen, dass MIPs eine Rolle in der Schlafhomöostase spielen könnten. Das bedeutet, dass MIPs den Schlaf abhängig vom aktuell benötigten Schlaf regulieren könnten.

Innerhalb der Gruppen (*gfp knock down* und *mip-pre/mip-r knock down*) zeigte sich vor dem SE ein signifikanter Unterschied des Aktivitätslevels zwischen Licht- und Dunkelphase, wobei in der Dunkelphase erhöhte Aktivität zu beobachten war. Nach dem SE war aber kein signifikanter Unterschied des Aktivitätslevels zwischen den beiden Phasen zu erkennen. Die verlorengangene Signifikanz des Aktivitätslevels in beiden Gruppen lässt auf eine Neuverteilung des Schlafes schließen. Dies kann so erklärt werden, dass der entgangene Schlaf während der Dunkelphase, also der Aktivitätsphase, nachgeholt wurde und die Tiere außerdem in der Ruhephase aktiver wurden. Dies war in den Aktivitätsaufzeichnungen einiger Tiere deutlich zu erkennen, zeigte sich jedoch nicht eindeutig im durchschnittlichen Aktivitätsmuster der Gruppe, was auf verschiedene Verhaltensmechanismen als Reaktion auf SE hindeutet. Das Nachholen des Schlafes ist ebenso an der Verschiebung der Aktivitätsmaxima vor und nach dem SE zu erkennen. Die durchschnittlichen Aktivitätsmaxima wurden verzögert, sodass ein Nachholschlaf zu Beginn der Dunkelphase vermutet werden kann.

Für *Drosophila* wurde bereits gezeigt, dass es mehrere Rezeptoren geben muss (Min et al., 2016). Es ist möglich, dass es in *R. maderae* mehrere MIP-Rezeptoren gibt. In dem hier durchgeführten Experiment wurde jedoch ausschließlich ein putativer MIP-Rezeptor herunterreguliert. Das Auftreten mehrerer MIP-Rezeptoren in *R. maderae* könnte bei nicht ausreichendem *knock down* des *mip-precursor* Gens bedeuten, dass die MIPs dennoch an der Aufrechterhaltung der Schlafhomöostase beteiligt waren. Somit käme es nicht zu einem unterschiedlichen Verhalten zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

Methoden- und Fehlerdiskussion

Da Madeira Schaben wenig aktiv Tiere sind, kann Information verloren gehen, wenn die lokomotorische Aktivität als Synonym für Wachheit gewertet wird. Außerdem sollte eine höhere Anzahl an Tieren untersucht werden, sodass ein valides Ergebnis resultiert.

Das Computerprogramm EthoVision XT wies während der anfänglichen Messungen der zurückgelegten Strecke der Madeira Schaben in den Arenen eine große Fehlerbelastung auf. Diese kam daher, dass die dunklen Tiere vor dem hellen Hintergrund nicht durchgehend detektiert werden konnten. Außerdem legten die Schaben auch laut Programm eine große Strecke zurück, obwohl diese Tiere augenscheinlich auf einem Fleck verharrten. Daher wurde schnell klar, dass dieses Computerprogramm nicht weiter genutzt werden konnte. Als Alternative wurden ebenso andere Computerprogramme getestet, welche nicht kompatibel mit dem Videoformat, der Dateigröße oder den Kontrasten waren. Aus diesem Grund wurde eine händische Auswertung durchgeführt. Die getesteten Computerprogramme waren C-TRAX (Charlotte, NC), ToxTrack (Thomas Luechtefeld, Baltimore, Maryland) und ein Plug-in für ImageJ (*National Institut of Health, Bethesda, USA*), welches Manual Tracking (Orsay, Frankreich) genannt wird. Die Auswertung der zurückgelegten Strecke wurde daraufhin durch ein Gitternetz ausgeführt, welches in 1 x 1 cm große Quadrate unterteilt war. Dadurch war eine Auswertung auf ± 0.5 cm genau. Der menschliche Fehler sei hier auch zu nennen, da dieser natürlich höher ist als bei einer automatisierten und reliablen Software.

Der letztendliche Versuchsaufbau der Arena-Fläche war das Resultat eines Entwicklungsprozesses. Zunächst wurde mit Webcam Screen Video Capture Free (SoftPerk, Inc) ein geeignetes Computerprogramm gefunden, welches für die Videos keine überaus große Datenmengen produziert. Herkömmliche Programme konnten dafür nicht genutzt werden, da diese nicht über Kompressoren verfügen, wie sich während der Testphase herausstellte. Auch die genutzte Infrarotkamera stellte sich als besonders geeignet heraus, da so in absoluter Dunkelheit, also auch ohne Rotlicht, gefilmt werden konnte. Mögliches Wahrnehmen des Lichts durch die Schaben konnte so verhindert werden. Madeira Schaben nehmen bereits sehr geringe Mengen Licht wahr, wodurch sich ihr lokomotorisches Aktivitätsprofil ändert.

Zusätzlich zu den technischen Entwicklungen, wurde ebenso die Arenafläche an sich entwickelt. So wurden die Arenen mit einem Windschutz versehen, sodass die Lüftungsanlage keinen Windzug in den Arenen verursachte und die Schaben dadurch beeinflusst würden. Auch der Boden unter den Arenen wurde hell gewählt sowie mit Luftpolsterfolie begradigt und isoliert, um kalten Temperaturen während der Wintermonate vorzubeugen.

4.3 Ausblick und Fazit

Rhm-MIP-4 zeigte in dieser experimentellen Arbeit keinen Einfluss auf die circadiane Phasenlage innerhalb der Zeiträume CT 9-12 und CT 21-24. Eine Funktion bei der Übertragung der Lichtinformation an das circadiane System ist daher unwahrscheinlich. Dies bedeutet jedoch nicht, dass *Rhm-MIP-4* generell keinen Einfluss auf das circadiane System der Madeira Schabe hat. Es könnte zu anderen Zeiten oder in anderen circadian gesteuerten Verhaltenskontexten als Ein- oder Ausgangssignal wirken. Deshalb sollten weitere Injektionen zu anderen Tageszeiten durchgeführt werden. Außerdem kann eine in der Literatur vermutete Rolle bei der (tageszeitabhängigen) Steuerung des Fress- oder Paarungsverhaltens, durch dieses Experiment nicht ausgeschlossen werden. Der Einfluss auf das Fressverhalten könnte ebenfalls durch ein Arenaassay ermittelt werden. Es könnte eine abgewogene Menge an Futter in der Arena platziert werden. In den Arenen könnten einzelne Tiere einer Kontrollgruppe (*gfp knock down*) und einer Versuchsgruppe (*mip-pre/mip-r knock down*) videographiert werden. Nach einer festgelegten Anzahl an Tagen kann die Differenz des Gewichtes des Futters ermittelt und verglichen werden.

Die Tendenz, dass ein *mip-pre/mip-r* Doppel-*knock down* im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Aktivität zeigt, könnte darauf schließen lassen, dass MIPs aktivitätsfördernd sind. Nach einem SE wirken MIPs jedoch tendenziell schlaffördernd. Dieses kontroverse Verhalten könnte darauf hinweisen, dass MIPs die Schlafhomöostase, je nach Bedarf, steuern. Um dies genauer überprüfen zu können, müssten mehr Versuchstiere getestet werden. Außerdem wäre es ratsam, ein Computerprogramm zum Tracking zu nutzen. Dadurch resultieren exakte Werte für die zurückgelegte Strecke.

II. Didaktischer Teil

1. Wertschätzung von Lebewesen: Die Madeira Schabe im Biologieunterricht

Im folgenden Kapitel dieser wissenschaftlichen Hausarbeit geht es darum, die Madeira Schabe als lebendes Tier in den Biologieunterricht einzubringen und mögliche Angst- oder Ekelgefühle der Lernenden aushaltbar zu machen. Um dies zu veranschaulichen wurde eine Unterrichtseinheit entwickelt, durch welche ein Forschertagebuch leitet. Ziel dieses Forschertagebuches ist es, das Interesse der Lernenden an *R. maderae* zu wecken und diese besser kennenzulernen.

1.1 Kind und Tier

Die Beschäftigung mit Tieren ist für junge Menschen besonders für ihre Entwicklung und Interessensbildung wichtig (Gebhard, 2013). Aber auch die Entwicklung der sozialen Empathie ist bei Kindern mit einem Heimtier stärker ausgeprägt und ermöglicht den Kindern somit eine intensivere kognitive und affektive Perspektivenübernahme, auch gegenüber anderen Kindern (Poresky, 1990). Diese Studien wurden mit Wirbeltieren durchgeführt. Wirbellose Tiere haben oft andere Reaktionen in Alltag und Unterricht zur Folge.

Gegenüber einem wirbellosen Tier ist mehr Empathie nötig, um die Bedürfnisse dessen zu erkennen. Wirbeltiere, wie Hund und Katze, werden aufgrund ihrer Mimik und ihrer Beherrschbarkeit vermenschlicht. Dieses Anthropomorphisieren ist bei Wirbellosen jedoch nicht möglich. Sie sind oft bestachelt oder glatt und haben einen skurril geformten Körper (K. Lorenz, 1998). Außerdem sind sie hauptsächlich instinktgesteuert, wodurch das Verhalten der Wirbellosen von den Lernenden nicht beherrscht werden kann (Schneider & Huttenlau, 1986).

Laut Mitscherlich (1965) ist es genau das, was Kinder benötigen: Tiere und Natur. Umso mehr spielt die Entfremdung der Natur durch Städte für die Forschung eine Rolle. Im Laufe der Zeit ist dieses Problem wohl noch verschärft worden.

Der Biologieunterricht muss daher die Aufgabe der Zusammenführung von Kind und Natur erfüllen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Umgang mit und das Lernen an Mäusen zu einem erhöhten Flow-Erleben führt. Das Flow-Erleben beschreibt das völlige Aufgehen in einer Tätigkeit, also das Verschmelzen des eigenen Bewusstseins mit der auszuführenden Handlung und zu intrinsischer Motivation führt (Csikszentmihalyi, 1990; Deci & Ryan, 1985). Der Einsatz von Fauchschaaben führt zunächst zu einem niedrigeren Flow-Erleben. Die Aussage von Schneider & Huttenlau (1986) wird mit diesen Ergebnissen insofern bestätigt, als dass die Lernenden eine tiefere emotionale Bindung zu Wirbeltieren aufbauen können. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Lernenden wegen der skurrilen Erscheinungsform der Tiere eine Abneigung gegenüber dem Tier empfinden, was ebenso zu einer Verringerung des Flow-Erlebens führen kann (Polte & Wilde, 2018). Diese Tiere sollten deswegen aber nicht aus dem Biologieunterricht verbannt werden, sondern gerade deshalb ihre Wichtigkeit für die Natur betont werden.

1.2 Der Begriff des Tieres für Kinder

Für Kinder ändert sich der Begriff des Tieres im Laufe ihrer Entwicklung. Vorschulkinder zum Beispiel klassifizieren unbelebte Gegenstände häufig als lebendig. Dass diese von ihnen aber nicht als Tiere klassifiziert werden liegt daran, dass die Kinder sich unter Tieren nur Wirbeltiere vorstellen. Insekten und Menschen sind für sie keine Tiere. Die Begriffe ‚Tier‘ und ‚lebendig‘ stellen demnach keine Synonyme für sie dar (Gelman et al., 1983). Kinder konsolidieren oft früh das kognitive Konzept des ‚Tieres‘, weil sie mit ihnen bereits konkrete Erfahrungen gemacht haben, wie beispielsweise mit einem Haustier. Dieses Konzept wird jedoch nicht unbedingt auf andere Tiere übertragen (Carey, 1985). Allerdings gibt es auch Tiere, gegenüber denen Kinder Angst verspüren. Im Vor- und Grundschulalter sind das zum Beispiel Löwen. Mit zunehmendem Alter verschieben sich die tierischen Angstobjekte zu einheimischen Tieren und Spinnen. Es gibt wohl kaum ein Tier, vor dem sich nicht irgendein Individuum ängstigt (Koch, 1968).

Nicht nur Angst, sondern auch Ekel führt zur Abneigung von bestimmten Tieren. Dieser Ekel wird häufig durch eine, bereits erwähnte, skurrile Erscheinungsform von Wirbellosen hervorgerufen. Dazu zählen beispielsweise die langen, haarigen

Insektenbeine, aber auch der Chitinpanzer (Gahl, 1973). Angst und Ekel vor bestimmten Tiergruppen scheinen erlernt und gesellschaftlich abhängig zu sein. Vor allem kleine Kinder zeigen wenig Angst vor Tieren und keine Ekelreaktionen gegenüber beispielsweise Mäusen und betrachten diese häufig als Spielzeug. Die Angst der Kinder etabliert sich erst ab dem dritten Lebensjahr und zeigt sich durch die Mimik oder Flucht. Die Angst vor größeren Tieren wie beispielsweise Hunden etabliert sich sogar noch später (King et al., 1997; Muris et al., 1997).

1.3 Angst und Ekel vor Tieren

Angst ist ein adaptiver Mechanismus, der genetisch verwurzelt ist. Die somatischen Begleiterscheinungen der Angst sind ein beschleunigter Puls, erhöhter Blutdruck, Gesichtsrötung, beschleunigte Atmung und der Ausbruch von Schweiß. Sie dient dazu, auf Gefahren aufmerksam zu machen und auf die Bewältigung dieser vorzubereiten. Im Evolutionsgeschehen hat sich diese Verhaltensweise etabliert, da sie die Überlebenschancen erhöht (Gebhard, 2013). Angst kann durch viele Objekte oder Situationen ausgelöst werden, darunter zum Beispiel Objekte, die schnell und direkt auf das Individuum zukommen. Davey et al (1998) zeigten, dass kulturunabhängig manche Tiergruppen häufiger als ekel- oder angsterregend eingestuft werden. Das sind zum Beispiel Schlangen und Spinnen. Zu betonen ist an dieser Stelle, dass dadurch keine genetische Verankerung von Angst gegenüber diesen Tiergruppen bewiesen ist. Vielmehr wird daraus geschlossen, dass die schnelle Bewegung dieser Tiergruppen die Angst hervorruft (Spindler, 1959). Der Mensch empfindet Angst aber nicht immer ablehnend. Im Gegenteil, er kann sogar eine sogenannte Angstlust entwickeln. Dies zeigt beispielsweise der Hang zu gefährlichen Sportarten (Leyhausen, 1976; K. Lorenz, 1965).

Tiere, vor denen sich Lernende ekeln, ähneln den Tieren, vor denen sie Angst haben. Die Reaktion auf sie ist jedoch eine andere. Zu den Begleiterscheinungen von Ekel gehören nämlich Naserümpfen, Übelkeit, Würgereiz und Erbrechen (Wagner, 2015). Den Grund für Ekel stellte Davey (1993; 1994) im „Disease-Avoidance-Modell“ dar. Dieses besagt, dass Ekel hauptsächlich durch Tiere hervorgerufen wird, welche als Überträger von Krankheiten bekannt sind. Um dieser Krankheitsübertragung entgegenzuwirken werden diese Tiergruppen

phobisch besetzt und somit vermieden. Dabei reicht schon allein die Vorstellung des Ekelobjekts aus, um die Begleiterscheinungen hervorzurufen (Zlotowicz & Redie, 1983). Als besonders ekelerregende Tiere gelten Tiere, die klein sind und mit großer Häufigkeit an einem Ort vorkommen (Wimmeln von Insekten; Kolnai, 1929).

Die Gefühle Ekel und Angst sind eng miteinander verwandt. Dem Ekel liegt häufig eine ambivalente Gefühlseinstellung zugrunde, wie auch bei der Angst. Die Quelle des Ekels kann ebenso die Quelle von Lust sein, es kann also eine Lust nach Ekelobjekten entstehen (Kolnai, 1929).

1.4 Angst und Ekel im Biologieunterricht

Die Gefühle Angst und Ekel sind alltägliche Erscheinungen, die gegenüber Tieren empfunden werden und deren Ursprung in individuellen Erfahrungen oder der Gesellschaftszugehörigkeit liegt. Es kann versucht werden, mögliche Angst- oder Ekeltiere aus dem Biologieunterricht zu verbannen, jedoch ist dies keine adäquate Lösung, da dann nahezu alle Tiere gemieden werden müssten. Aber gerade für den Biologieunterricht ist die originale Begegnung mit der Natur unersetzbar (Gebhard, 2013). Werden die Lernenden nicht mit ihren Angst- oder Ekeltieren konfrontiert, kann dies dazu führen, dass sie die Tiere bedenkenlos ausrotten, da sie keine emotionale Bindung zu diesen verspüren.

Das Ziel des Biologieunterrichts sollte aber nicht sein, die Angst oder den Ekel abzubauen. Damit wäre die unterrichtliche Situation wohl überfordert. Als Ziel sollte die Anerkennung der Angst oder des Ekels stehen und diese aushaltbar zu machen (Gebhard, 2013). Dies kann einen weiteren positiven Effekt nach sich ziehen, nämlich das Wecken von Interesse gegenüber solchen Tieren. Die Faszination bestimmter Spezies, beispielsweise im Hinblick auf deren Überlebensstrategien, ihren Körperbau oder das Verhalten der Krabbeltiere, zu erkennen und zu begreifen, ist ein hohes Gut für die Lernenden aber auch für die Gesellschaft und kann zukünftige Entscheidungen und Entwicklungen beeinflussen (Dräger & Vogt, 2007).

Um den Umgang mit diesen Tieren im Biologieunterricht sinnvoll gestalten zu können, müssen bestimmte Grundvoraussetzungen herrschen. Zum einen sollte die Lehrperson den Tieren gegenüber emotional neutral eingestellt sein. So kann

sie als Vorbild für einen ruhigen und gewissenhaften Umgang mit ihnen fungieren. Außerdem sollte sie auch Angst oder Ekel zugeben können. Gerade deshalb und im gleichen Atemzug zu Lernfähigkeit und einem bewussten Handeln auffordern. Dadurch, dass die Lehrperson eigene Ängste oder Ekel zugeben kann, kann sie glaubhaftes Verständnis zeigen. Angst oder Ekel werden dann nicht als unpassendes Verhalten der Lernenden abgetan und sie fühlen sich verstanden (Gebhard, 2013; Gropengießer & Gropengießer, 1985). Nichtsdestotrotz sollten auch Distanzierungs- und Umgangsstrategien geboten werden. Die Distanzierung durch eine räumliche Trennung, wie ein Beobachtungsglas, ist ratsam. Außerdem sollten drei Grundstrategien zum Umgang mit diesen Tieren eingehalten werden (Devereux, 1984):

Stellvertretende Vorerfahrung:

Durch das Zeigen von Filmen, das Lesen von Versuchsdurchführungen oder das Arbeiten mit Modellen und Abbildungen können Vorerfahrungen mit einem Tier gesammelt werden, welche in einem sicheren Rahmen stattfinden. Sie garantieren, dass der Lernende sich rechtzeitig und selbstständig zurückziehen kann. Die dabei empfundene Angst oder Ekel können durch das vorherige Durchspielen in der Realsituation abgemildert werden.

Professionelle Haltung und Abwehr durch Aktivität:

Durch die Konzentration auf das Interesse an der Erkenntnis über zu sammelnde Daten und das Notieren dieser, kann von der eigentlichen Angst oder dem Ekel ablenken. Auch durch die Verwendung von Fachsprache können negative Emotionen gegenüber einem Tier abgemildert werden.

Methodologische Positionen und technische Manöver:

Die Formulierung von Ausfluchtsätzen wie beispielsweise ‚Insekten spüren keinen Schmerz.‘ kann für manche Lernende das Arbeiten mit diesen aushaltbar machen und sogar erst ermöglichen.

Wichtig ist, dass diese Grundstrategien erst nach dem Zulassen und Akzeptieren der eigenen Angst oder des Ekels bewusst und reflektiert angewendet werden

(Gropengießer & Gropengießer, 1985). Bei einem unausgewogenen Umgang mit ihnen können die Ängste der Lernenden womöglich fixiert und intensiviert werden (Devereux, 1984).

1.5 Anforderungen an Insekten im Biologieunterricht

Besonders Insekten werden von Kindern als angsterregend oder ekelerregend empfunden (Schanz, 1972), obwohl sie die artenreichste Tiergruppe der Erde verkörpern und eine Vielzahl an Aufgaben im Ökosystem leisten (Lengerken, 1966). Ein Grund mehr diese faszinierenden Geschöpfe im Biologieunterricht zu behandeln. Für den Biologieunterricht ist es wichtig, dass die Tiere, im Besonderen die Insekten, nicht zu klein sind. Sehr kleine Tiere sind für die Handhabung im Klassenzimmer problematisch, das hängt natürlich aber auch von der motorischen Entwicklung der Lernenden ab. Abhängig von der motorischen Entwicklung der Lernenden sollte auch die Empfindlichkeit der Tiere gewählt werden (Vogt, 2006).

Die Madeira Schabe erfüllt diese Anforderungen. Mit ihrer Größe von 4 – 5 cm ist sie leicht handhabbar und allgemein wenig empfindlich. Das kurzzeitige Halten der Madeira Schaben in der Schule und die Nutzung im Biologieunterricht sind demnach möglich.

1.6 Den Biologieunterricht mit Insekten umsetzbar machen

Es konnte bereits anhand von Spinnen im Unterricht gezeigt werden, dass Lernende durch die Begegnung mit den Spinnen ein tieferes Verständnis für die Harmlosigkeit und Einzigartigkeit dieser Tiere aufbauen. Dieses Verständnis führt zur Steigerung der Wertschätzung gegenüber diesen Tieren und somit zum Abbau von Angst- und Ekelgefühlen (Koser, 2011). Dadurch wird oft auch eine beschützende Haltung ihnen gegenüber aufgebaut, wodurch der zukünftige Umwelt- und Tierschutz unterstützt wird (Storrer & Hirschfeld, 2007).

Für die Unterrichtsgestaltung muss beachtet werden, dass nicht allein der reine Wissenserwerb verantwortlich für diese Haltung und die Annäherung an das Tier ist. Vielmehr müssen positive Erlebensqualitäten für die Lernenden bereitgehalten werden, sodass der zunächst unbeliebte Unterrichtsgegenstand Interesse weckt (Vogt, 2006).

Die Spinne wurde im Rahmen der Forschung vor der Unterrichtseinheit ‚Pfiu Spinne‘ von der Hälfte der Klasse als abstoßend empfunden. Nach der Unterrichtseinheit waren Berührungsängste abgebaut, was auf abgemilderte Angst- und Ekelgefühle zurückzuführen ist (Koser, 2011).

Das Unterrichtskonzept muss jedoch behutsam aufgebaut sein. Die Unterrichtseinheit sah zunächst einen Film, daraufhin konservierte Spinnen und schließlich eine Führung im Senckenberg Museum mit lebender Vogelspinne vor. Die schrittweise Herangehensweise ist zur Vermeidung von emotionalen Überreaktionen und Gewöhnung an das unterrichtliche Objekt nötig. Arbeitsmaterialien und Methoden sollten zudem ansprechend gestaltet sein und die Faszination dieser Tiergruppe unterstreichen (Gebhard, 2013).

2. Die Unterrichtseinheit „Die Madeira Schabe“

Die gesamte Unterrichtseinheit wird von einem Forschertagebuch begleitet, welche Aufgaben und Experimente bereithält.

2.1 Begründung der entwickelten Unterrichtseinheit

Es wurde eine Unterrichtseinheit zum Thema „Die Madeira Schabe“ entwickelt, welche das freie Arbeiten unter Anleitung eines Forschertagebuchs zulässt. Ziel dieser Unterrichtseinheit ist die persönliche Wahrnehmung der Madeira Schabe und das Zulassen möglicher Ekel- oder Angstgefühle. Durch die Betonung der Besonderheiten, wie beispielsweise den Körperbau und Lebensraum, kann ein erhöhtes Interesse aufgebaut und somit ein Abbau der Ekel- und Angstgefühle möglich werden.

Ein Ziel des Biologieunterrichts ist es, den Lernenden einen reflektierten und respektvollen Umgang mit allen Lebewesen und der Umwelt nahezubringen. Der Mensch als Teil der Natur wird in seinem Alltag regelmäßig mit biologischen Erkenntnissen, Theorien und Fragestellungen konfrontiert und muss durch seine erworbenen Fachkenntnisse und Kompetenzen persönliche und gesellschaftliche Entscheidungen treffen (Hessisches Kultusministerium, 2011). Die Unterrichtseinheit beschäftigt sich mit einem zunächst eher unbeliebten Unterrichtsgegenstand: Die Schabe. Im Laufe der Unterrichtseinheit entwickeln die Lernenden ein Verständnis für diese Tiere und möglicherweise auch eine emotionale Bindung. Ein respektvoller und vor allem nachhaltiger Umgang ist somit auch in Zukunft wahrscheinlich.

Ein weiteres Ziel ist ebenso die Vermittlung von Arbeitsweisen der Biologie. Darunter zählt zum einen die zunehmend eigenständige Erarbeitung von Fachwissen, aber auch die Anwendung von Experimenten und das Entwickeln solcher (Hessisches Kultusministerium, 2011). Die Unterrichtseinheit bietet zunächst einen geleiteten Einstieg, ermöglicht in ihrem Verlauf aber ein selbstgeleitetes und freies Arbeiten und Experimentieren. Auch die biologische Arbeitsweise der Verhaltensforschung wird im Ansatz vermittelt.

An dieser Stelle kommt es zu einer klaren didaktischen Reduktion. Die Lernenden erlernen ausschließlich bestimmte Arbeitsweisen, wobei der Fokus auf der Beobachtung liegt. Auf das Sezieren oder ähnliches wird dahingehend

verzichtet. Auch wird nur der Umweltfaktor des Lichts untersucht, andere Aspekte werden bewusst nicht betrachtet.

Das Inhaltsfeld ‚Vielfalt, Veränderung und Abstammung von Lebewesen‘ beinhaltet für die fünfte und sechste Klasse die Erkenntnisgewinnung im Hinblick auf Ähnlichkeiten zwischen Individuen, aber auch den Zusammenhang zwischen ihrer Körperform und ihrem Lebensraum. Auch die artgerechte Haltung und die Bewertung der Haltung von Tieren finden Raum im Biologieunterricht (Hessisches Kultusministerium, 2011). Im Rahmen dieser Unterrichtseinheit werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Individuen beobachtet und somit auf Variabilität geschlossen. Zudem wird der natürliche Lebensraum recherchiert und dieser mit dem selbstgebauten Terrarium verglichen. Es kommt demnach zu einer Bewertung des Terrariums und somit auch von der Haltung der Schaben.

Die Beschäftigung mit lebenden Tieren im Biologieunterricht ist also essenziell für die Entwicklung der Lernenden und damit für zukünftige Entscheidungen, die die Gesellschaft betreffen. Darunter zählen beispielsweise Entscheidungen, die die Schädlingsbekämpfung anbelangen.

Die Wahl der Tiere im Biologieunterricht muss nicht unbedingt auf die klassischen Vertreter zurückfallen. Tiere wie die Madeira Schabe sind aus verschiedenen Gründen gut für den Unterricht geeignet. Die Haltung dieser ist (kurzzeitig) gut umsetzbar. Außerdem sind die Tiere gut handhabbar und besonders. Verhaltensexperimente können durch ihre geringe Größe und größere Anzahl auch gut in der Schule durchgeführt werden. Jedoch haben sie auch einen Nachteil. Bei einigen Lernenden könnten sie Ekel oder gar Angst auslösen. Doch dies sollte kein Grund sein, sie aus dem Unterricht zu verbannen. Das Ziel der Unterrichtseinheit ist in diesem Falle nicht, dass die Angst oder der Ekel überwunden werden, sondern vielmehr, dass die Lernenden sich ihre Angst oder den Ekel eingestehen und mit diesen Emotionen umgehen können. Außerdem entwickeln die Lernenden schließlich sogar Interesse für Schaben und weitere Spezies und ihren Einfluss auf Lebensräume. Eine Form der Arbeit muss daher geschaffen werden, diese Emotionen aushaltbar zu machen. Analog zu bisherigen, erfolgreichen Unterrichtseinheiten (Koser, 2011) mit dem gleichen Ziel wurde eine schrittweise Herangehensweise an das lebende Tier gewagt. Die Unterrichtseinheit beginnt mit einer geleiteten Durchführung für den Bau eines

Schaben-Terrariums, ohne dass dabei schon Schaben anwesend sind. Anschließend soll eine konservierte Schabe genauer betrachtet und gezeichnet werden. Daraufhin kommt erst das lebende Tier zum Einsatz, indem Verhaltensbeobachtungen und anschließend ein Verhaltensexperiment ‚Mögen Schaben Licht?‘ durchgeführt werden. Im Rahmen des Verhaltensexperiments kann es auch zur Berührung der Schaben kommen, da die Tiere von ihrem Terrarium in das leere Versuchsterrarium umgesetzt werden müssen. Diese Berührung ist aber kein Muss, da die Lernenden in Gruppen zusammenarbeiten und auch die Lehrperson unterstützend mitwirken kann.

Im Rahmen dieser Unterrichtseinheit liegt der Fokus auf einem Vertreter der Wirbellosen, wodurch das unterrichtliche Prinzip der Exemplarität erfüllt wird. Die Madeira Schabe wird in diesem Szenario als ein Vertreter der Insekten durchgenommen. Dieses Prinzip hat die Induktion, Deduktion und Analogisierung des Unterrichtsgegenstandes zum Ziel. Die Lernenden erhalten durch dieses Angebot, diese Fähigkeit im fortlaufenden Biologieunterricht anzuwenden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Madeira Schabe aufgrund ihrer Größe und Handhabbarkeit ein guter Vertreter für die Arbeit mit lebenden Tieren im Biologieunterricht ist. Nicht zuletzt, weil von und mit ihr viel über die Welt der Insekten gelernt werden kann und die Lernenden an sich wachsen und somit ihr Selbstkonzept verbessern können.

Mein Forschertagebuch

1




– Die Madeira Schabe –

Wir gestalten ein Terrarium

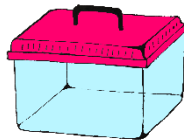
Das brauchst du:

- eine große Fauna-Box
- Kleintier-Einstreu
- Eierkarton
- zwei Schalen
- ein Küchenpapier
- Getreidemixpellets
- Wasser

Das ist eine
Fauna-Box



²



Das ist zu tun:

- Bestreue den Boden der Fauna-Box etwa 1 cm hoch mit dem Kleintierstreu.
- Zerreiße den Eierkarton und baue eine kleine Höhle in der Fauna-Box.
- Lege das zerkleinerte Küchentuch in eine Schale und befülle diese mit Wasser. Gib in die zweite Schale reichlich Getreidemixpellets.
- Stelle beide Schalen in die Fauna-Box. Deckel drauf – Dein Terrarium ist bereit für deine Schaben!

Mein Schaben-Terrarium:

Klebe hier ein Foto von deinem Terrarium ein.

Für Neugierige...

Wenn die Schaben sich bei dir wohl fühlen, kannst du in deinem Terrarium sogar das Schlüpfen von Jungtieren und die Häutung beobachten.

² Eigene Zeichnung

Die Schabe genau unter die Lupe nehmen



Nun geht es darum, eine Schabe ganz genau unter die Lupe zu nehmen. Notiere dir alle Fragen, die dir dabei einfallen, auf der Rückseite deines Arbeitsblatts.

1. Sieh dir die konservierte Schabe genau an. Dafür kannst du auch eine Lupe benutzen.

a. Welche Farbe hat die Schabe?

b. Wie viele Beine hat die Schabe?

c. Wo befinden sich die Augen der Schabe?

d. Hat die Schabe einen Mund und Ohren?

2. Zeichne die Schabe so detailreich wie möglich. Beschrifte die Merkmale, die du beobachtet hast, mit den folgenden Begriffen:

Bein – Flügel – Kopf – Abdomen – Thorax – Auge – Antenne

Wie verhält sich die Schabe?



3

1. Nimm dir Zeit und beobachte die Schaben in deinem Terrarium. Achte darauf, dass du nicht an die Wand des Terrariums klopfst oder es bewegst. Notiere deine Beobachtungen.

Sehen alle Schaben gleich aus? Falls nein, nenne die Unterschiede.

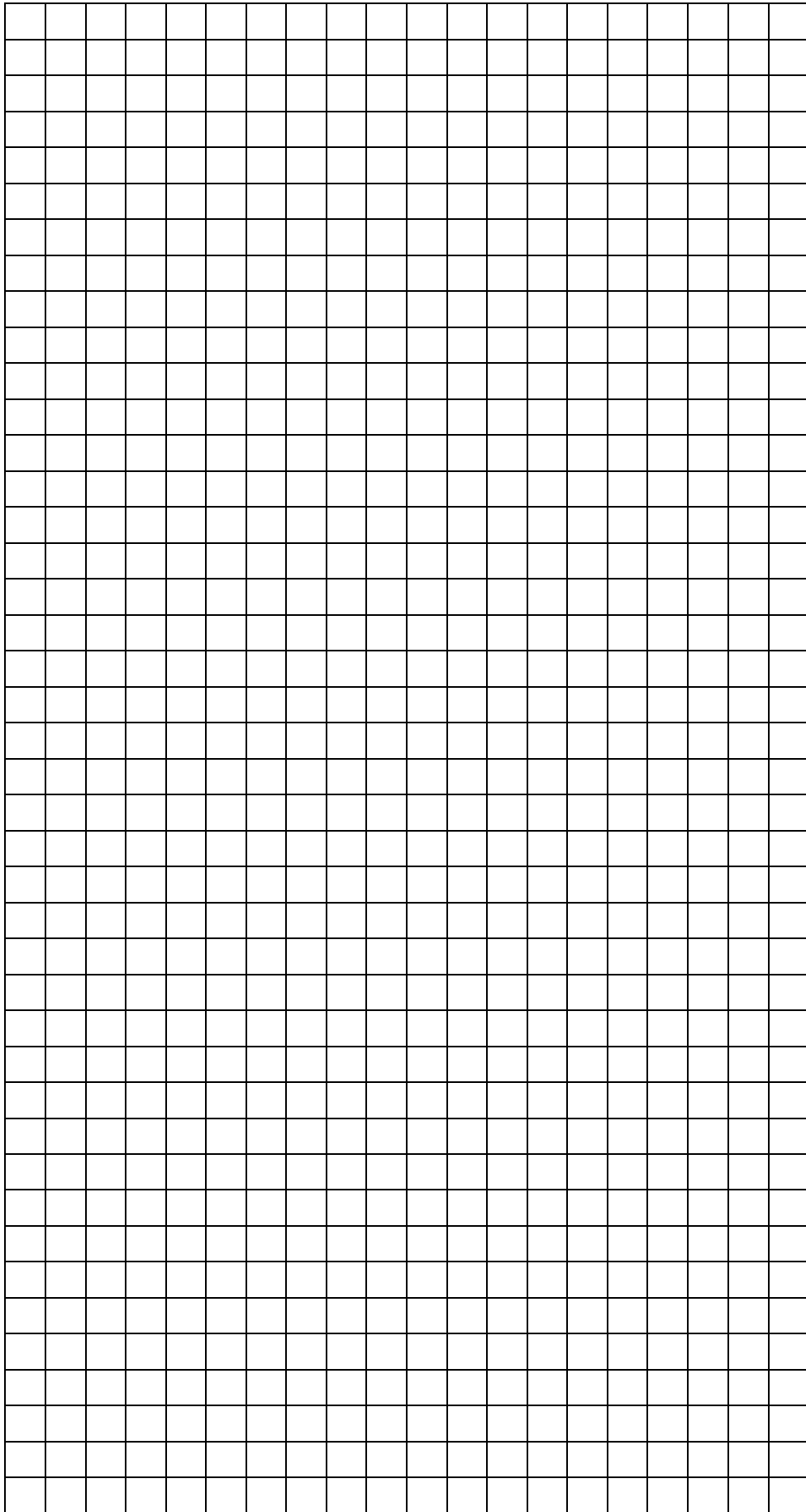
Wo halten sich die Schaben am liebsten auf?

Wann schlafen deine Schaben und wo halten sie sich dabei auf?

Hier ist Platz für weitere Notizen. Was fällt dir ansonsten auf?

2. Beschreibe den natürlichen Lebensraum der Madeira Schaben. Recherchiere im Internet. Beurteile in diesem Zusammenhang den Aufbau deines Terrariums.

³ Eigene Zeichnung



Die faszinierende Schabe?

Beschreibe deine Gefühle, wenn du die Madeira Schabe siehst.

Nenne eine Eigenschaft der Schabe, die du besonders interessant findest.

Hier kannst du Fragen aufschreiben, die noch offengeblieben sind:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen Personen bedanken, die mich auf dem Weg der Examensarbeit stets unterstützt haben. Zuerst gebührt mein Dank Frau Prof. Dr. Monika Stengl, die mir die Möglichkeit gegeben hat, mich in diesem spannenden Themenfeld einzubringen. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Thordis Arnold bedanken, die mir die gesamte Zeit mit Rat und Tat zu Seite stand und immer passende Tipps und Strategien parat hatte! Anschließend möchte ich mich bei meiner Schwester bedanken, die mich in jeder Lebenslage mit ihren künstlerischen Fähigkeiten bereichert. Nicht zuletzt gebührt mein Dank meiner Mama, die durch ihre Unterstützung in vielerlei Hinsicht eine große Stütze für mich ist.

Literaturverzeichnis

- Aguilar, R., Maestro, J. L. & Bell, W. J. (2006). Effects of myoinhibitory peptides on food intake in the German cockroach. *Physiological Entomology*(31), 257–261.
- Arendt, A. (2016). *The function of SIFamide, PDF, and further neuropeptides in the circadian system of Rhyparobia maderae: Dissertation.*
- Arnold, T., Korek, S., Massah, A., Eschstruth, D. & Stengl, M. (2019). Candidates for photic entrainment pathways to the circadian clock via optic lobe neuropils in the Madeira cockroach. *The Journal of comparative neurology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/cne.24844>
- Aschoff, J. (1958). Tierische Periodik unter dem Einfluß von Zeitgebern. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 15(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1958.tb00552.x>
- Barrett, R. K. & Page, T. L. (1989). Effects of light on circadian pacemaker development. *Journal of Comparative Physiology*(165), 41–49.
- Beccaloni, G. W. (2014). *Cockroach Species File Online*. <http://cockroach.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=117447>
- 6
- Beersma, D. G.M. (1998). Models of human sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, 2(1), 31–43. [https://doi.org/10.1016/S1087-0792\(98\)90052-1](https://doi.org/10.1016/S1087-0792(98)90052-1)
- Bell, W. J. (1990). Biology of the Cockroach. In I. Huber, E. P. Masler & B. R. Rao (Hg.), *Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research: Volume I* (S. 7–12). CRC Press.
- Benna, C., Scannapieco, P., Piccin, A., Sandrelli, F., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C. P., Valle, G. & Costa, R. (2000). A second timeless gene in Drosophila shares greater sequence similarity with mammalian tim. *Current Biology*(10), R512-R513.
- Carey, S. (1985). *Conceptual Change in childhood*. MIT.
- Conzelmann, M., Williams, E. A., Tunaru, S., Randel, N., Shahidi, R., Asadulina, A., Berger, J., Offermanns, S. & Jékely, G. (2013). Conserved MIP receptor-ligand pair regulates Platynereis larval settlement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8224–8229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220285110>
- Csikszentmihalyi, M. (1990). *Flow. The Psychology of Optimal Experience*. HarperPerennial.
- Davey, G. C. L. (1994). The "disgusting" spider: The role of disease and illness in the perpetuation of fear of spiders. *Society and Animals*(2), 17–25.

- Davey, G. C. L., Forster, L. & Mayhew, G. (1993). Familial resemblances in disgust sensitivity and animal phobias. *Behavioral Research and Therapy*(31), 41–50.
- Davey, G. C. L., McDonald, A. S., Hirisave, U., Prabhu, G. G., Iwawaki, S., Ching, I. J., Merckelbach, H., Jong, P. J. de, Leung, P. W. L. & Reimann, B. C. (1998). A cross-culturell study of animal fears. *Behavioral Research and Therapy*(36), 735–750.
- Deci, E. L. & Ryan, R. M. (1985). The General Orientations Scale: Self-Determination in Personality. *Journal of Research in Personality*(19), 109–134.
- Devereux, G. (1984). *Angst und Methode in den Verhaltenswissenschaften*. Suhrkamp.
- Dodd, A., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F. & Hibber, J. (2005). Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science*(Vol. 309), 630–633.
- Dräger, M. & Vogt, H. (2007). Von Angst und Ekel zu Interesse. *Erkenntnisweg Biologiedidaktik*(6), 133–149.
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J. C. & Rosbash, M. (2000). Drosophila CRY Is a Deep Brain Circadian Photoreceptor. *Neuron*, 26(2), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81181-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81181-2)
- Gahl, H. (1973). Über die Formenkenntnis des primarschülers und seine Einstellung zum Tier. In E. Schwartz (Hg.), *Entdeckendes Lernen im Lernbereich Biologie*. Arbeitskreis Grundschule.
- Gebhard, U. (2013). *Kind und Natur: Die Bedeutung der Natur für die psychische Entwicklung* (4. Aufl.). Springer VS.
- Gelmann, R., Spelke, E. & Meck, E. (1983). What preschoolers know about animate and inanimate objects: In: D. Rogers & J.Sloboda (Hrsg.). The acquisition of symbolic skills, 297–326.
- Gestrich, J., Giese, M., Shen, W., Zhang, Y., Voss, A., Popov, C., Stengl, M. & Wei, H. (2018). Sensitivity to Pigment-Dispersing Factor (PDF) Is Cell-Type Specific among PDF-Expressing Circadian Clock Neurons in the Madeira Cockroach. *Journal of Biological Rhythms*, 33(1), 35–51. <https://doi.org/10.1177/0748730417739471>
- Golombek, D. A. & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90(3), 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>
- Gropengießer, H. & Gropengießer, I. (1985). Ekel im Biologieunterricht. *Unterricht Biologie*, 9(106), 40–42.

- Gwinner, E. (1974). Testosterone induces "splitting" of circadian locomotor activity rhythms in birds. *Science*(185), 72–74.
- Hardin, P. E. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *Journal of Biological Rhythms*, 19(5), 348–360. <https://doi.org/10.1177/0748730404268052>
- Helfrich-Förster, C. (2009). Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice? *Journal of Biological Rhythms*, 24(4), 259–270. <https://doi.org/10.1177/0748730409339614>
- Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C. & Stanewsky, R. (2001). The Circadian Clock of Fruit Flies Is Blind after Elimination of All Known Photoreceptors. *Neuron*, 30(1), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00277-X)
- Hessisches Kultusministerium. (2011). *Bildungsstandards und Inhaltsfelder.: Das neue Kerncurriculum für Hessen. Sekundarstufe I - Gymnasium. Biologie.*
- Hildebrandt, J.-P., Bleckmann, H. & Homberg, U. (Hg.). (2015). *Penzlin - Lehrbuch der Tierphysiologie* (8. Auflage). Springer Spektrum.
- Homberg, U. (1991). Neuroarchitecture of the central complex in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* and *S. americana* as revealed by serotonin immunocytochemistry. *The Journal of comparative neurology*, 303(2), 245–254. <https://doi.org/10.1002/cne.903030207>
- Homberg, U., Reischig, T. & Stengl, M. (2003). Neural organization of the circadian system of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Chronobiology international*, 20(4), 577–591. <https://doi.org/10.1081/cbi-120022412>
- Hutvagner, G. & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*(9), 22–32.
- Isaac, R. E., Li, C., Leedale, A. E. & Shirras, A. D. (2010). *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proceedings. Biological sciences*, 277(1678), 65–70. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1236>
- Ivanchenko, M., Stanewsky, R. & Giebultowicz, J. M. (2001). Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. *Journal of Biological Rhythms*, 16(3), 205–215. <https://doi.org/10.1177/074873040101600303>

- Kim, B., Park, J.-H. & Sailor, M. J. (2019). Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31(49), e1903637. <https://doi.org/10.1002/adma.201903637>
- Kim, Y.-J., Bartalska, K., Audsley, N., Yamanaka, N., Yapici, N., Lee, J.-Y., Kim, Y.-C., Markovic, M., Isaac, E., Tanaka, Y. & Dickson, B. J. (2010). MIPs are ancestral ligands for the sex peptide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), 6520–6525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914764107>
- King, N. J., Ollendick, T. H. & Hurphy, G. C. (1997). Assessment of childhood phobias. *Clinical Psychology Review*(17), 667–687.
- Koch, I. (1968). *Ekel und Angst vor Tieren bei Kindern: Zulassung zur 1. Staatsprüfung für das Lehramt an Volksschulen. Pädagogische Hochschule Nürnberg der Universität Erlangen-Nürnberg.*
- Kolnai, A. (1929). Der Ekel. *Jahrbuch für Philosophie und phänomenologische Forschung*(10), 515–569.
- Koser, S. (2011). *Pfui Spinne?!: Wertschätzung von Lebewesen - Zum Umgang mit der Diskrepanz von Schülerwissen und Schülereinstellungen (1. Aufl.). Reihe für Unterrichtsentwicklung. Amt für Lehrerbildung.*
- Koziarek, S. (2016). *Funktionelle Analyse der molekularen circadianen Uhr der Schabe Rhyarobia maderae: Diplomarbeit.*
- Lee, C., Bae, K. & Edery, I. (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a Drosophila CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Molecular and cellular biology*, 19(8), 5316–5325. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5316>
- Lengerken, H. v. (1966). *Das Tierreich (2. Aufl.). Sammlung Göschen: Bd. 594. De Gruyter.*
- Leyhausen, P. (1976). Zur Naturgeschichte der Angst. In H. Wiebrock (Hg.), *Die politische und gesellschaftliche Rolle der Angst.*
- Loesel, R. & Homberg, U. (2001). Anatomy and Physiology of Neurons With Processes in the Accessory Medulla of the Cockroach *Leucophaea maderae*. *Journal of Comparative Neurology*(439), 193–207.
- Lorenz, K. (1965). Das sogenannte Böse. In K. Lorenz (Hg.), *Über tierisches und menschliches Verhalten (2. Aufl., S. 187).*
- Lorenz, K. (1998). *Über tierisches und menschliches Verhalten.* Piper & Co.
- Lorenz, M. W., Kellner, R. & Hoffmann, K. H. (1995). A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *The*

- Journal of biological chemistry*, 270(36), 21103–21108.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21103>
- Meijer, J. H. & Schwartz, W. J. (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 235–249. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003006>
- Menet, J. S., Abruzzi, K. C., Desrochers, J., Rodriguez, J. & Rosbash, M. (2010). Dynamic PER repression mechanisms in the *Drosophila* circadian clock: from on-DNA to off-DNA. *Genes & development*, 24(4), 358–367. <https://doi.org/10.1101/gad.1883910>
- Min, S., Chae, H.-S., Jang, Y.-H., Choi, S., Lee, S., Jeong, Y. T., Jones, W. D., Moon, S. J., Kim, Y.-J. & Chung, J. (2016). Identification of a Peptidergic Pathway Critical to Satiety Responses in *Drosophila*. *Current Biology*(26), 814–820.
- Morris, R. G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
- Müller, H.-J. & Prange, D. R. (2016). *PCR: Polymerase-Kettenreaktion* (2. Aufl.). Springer Verlag.
- Muris, P., Merckelbach, H. & Collaris, R. (1997). Common childhood fears and their origins. *Behavioral Research and Therapy*(35), 929–937.
- Nässel, D. R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, 68(1), 1–84. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00057-6)
- Nässel, D. R. & Winther, A. M. E. (2010). *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, 92(1), 42–104. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.010>
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. & Pittendrigh, C. S. (1968). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach: III. The optic lobes, locus of the driving Oscillation? *Journal of Comparative Physiology*(58), 1–13.
- Oh, Y., Yoon, S.-E., Zhang, Q., Chae, H.-S., Daubnerová, I., Shafer, O. T., Choe, J. & Kim, Y.-J. (2014). A Homeostatic Sleep-Stabilizing Pathway in *Drosophila* Composed of the Sex Peptide Receptor and Its Ligand, the Myoinhibitory Peptide. *PLoS Biology*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001974>
- Page, T. L. (1978). Interactions between Bilaterally Paired Components of the Cockroach Circadian System. *Journal of Comparative Physiology*(124), 225–236.

- Page, T. L. (1983). Effects of optic-tract regeneration on internal coupling in the circadian system of the cockroach. *Journal of Comparative Physiology*(153), 353–363.
- Pittendrigh, C. S. & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency(106), 223–252.
- Polte, S. & Wilde, M. (2018). Wirkt Ekel vor lebenden Tieren bei Schülerinnen und Schülern als Prädiktor für ihr Flow-Erleben? *Zeitschrift für Didaktik der Naturwissenschaften*(24), 287–292.
- Poresky, R. H. (1990). The Young Children's Empathy Measure: Reliability, Validity and Effects of Companion Animal Bonding. *Psychological Reports*(66), 931–936.
- Rao, K. R., Mohrherr, C. J., Riehm, J. P., Zahnnow, C. A., Norton, S., Johnson, L. & Tarr, G. E. (1987). Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grasshopper *Romalea microptera*. *Journal of Biological Chemistry*(262), 2672–2675.
- Reineke, A. (2004). *Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendungen ; 5 Tabellen, 11 Methodenboxen* (1. Aufl.). *utb-studi-e-book: Bd. 2581*. Ulmer; UTB. <http://www.utb-studi-e-book.de/9783838525815>
- Reischig, T. & Stengl, M. (2002). Optic Lobe Commissures in a Three-Dimensional Brain Model of the Cockroach *Leucophaea maderae*: Search for the Circadian Coupling Pathways. *Journal of Comparative Neurology*(443), 388–400.
- Reischig, T. & Stengl, M. (2003a). Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *Journal of Biological Rhythms*(206), 1877–1886.
- Reischig, T. & Stengl, M. (2003b). Ultrastructure of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in a three-dimensional model of the accessory medulla of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell and Tissue Research*(314), 421–435.
- Roberts, S. (1960). Circadian activity rhythms in cockroaches. I. The free-running rhythm in steady-state. *Journal of cellular and comparative physiology*, 55, 99–110.
- Rubin, E. B., Shemesh, Y., Cohen, M., Elgavish, S., Robertson, H. M. & Bloch, G. (2006). Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome research*, 16(11), 1352–1365. <https://doi.org/10.1101/gr.5094806>

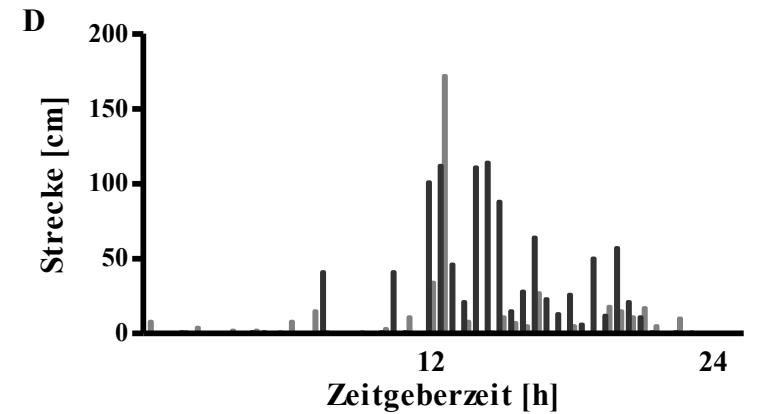
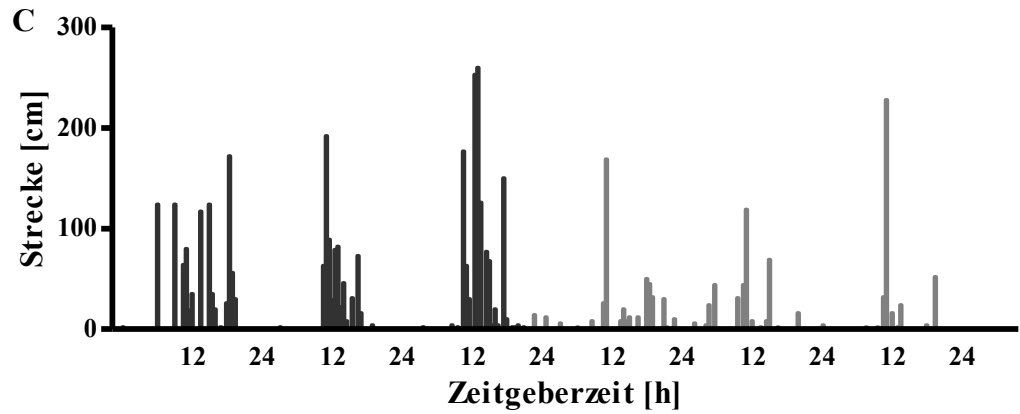
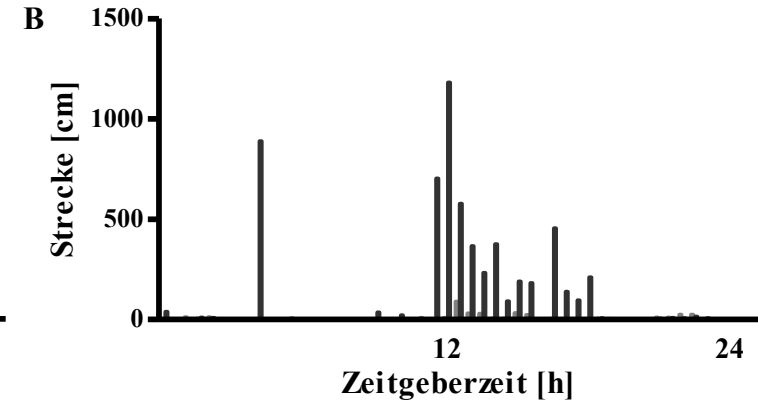
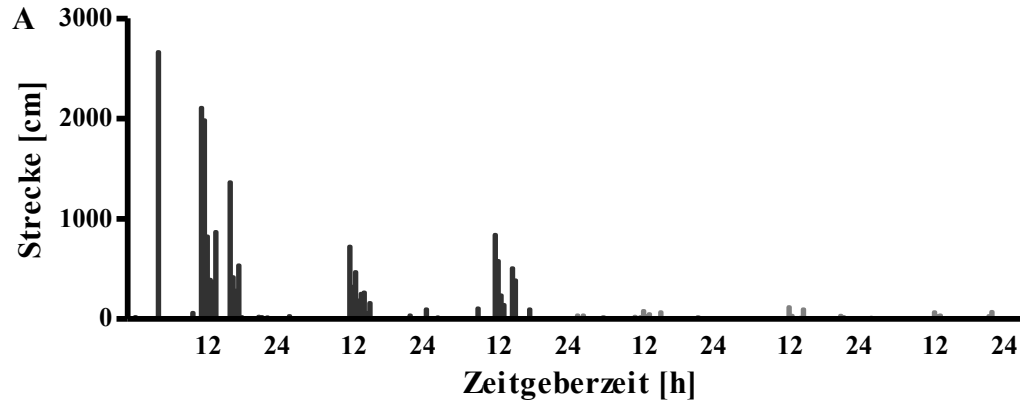
- Schanz, E. (1972). Zum Problem kindlicher Abneigung gegenüber Tieren - ein Beitrag zur Psychologie des Biologieunterrichts. *Der Biologieunterricht*, 1(8), 43–125.
- Schendzielorz, J., Schendzielorz, T., Arendt, A. & Stengl, M. (2014). Bimodal oscillations of cyclic nucleotide concentrations in the circadian system of the Madeira cockroach *Rhyarobia maderae*. *Journal of Biological Rhythms*, 29(5), 318–331. <https://doi.org/10.1177/0748730414546133>
- Schendzielorz, J. & Stengl, M. (2013). Candidates for the light entrainment pathway to the circadian clock of the Madeira cockroach *Rhyarobia maderae*. *Cell and Tissue Research*(355), 447–462.
- Schmid, B., Helfrich-Förster, C. & Yoshii, T. (2011). A New ImageJ Plug-in “ActogramJ” for Chronobiological Analyses. *Journal of Biological Rhythms*(Vol. 26 No. 5), 464–467.
- Schneider, H. & Huttenlau, E. (1986). Das Grundschulkind versucht sich an Tieren. *UB*(111), 13–16.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T. K., Nachman, R. J. & Loof, A. de (1991). Isolation, identification and synthesis of locustamyoinhibiting peptide (LOM-MIP), a novel biologically active neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Regulatory Peptides*, 36(1), 111–119. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90199-Q](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90199-Q)
- Schulze, J., Neupert, S., Schmidt, L., Predel, R., Lamkemeyer, T., Homberg, U. & Stengl, M. (2012). Myoinhibitory Peptides in the Brain of the Cockroach *Leucophaea maderae* and Colocalization With Pigment- Dispersing Factor in Circadian Pacemaker Cells. *Journal of Comparative Neurology*(520), 1078–1097.
- Schulze, J., Schendzielorz, T., Neupert, S., Predel, R. & Stengl, M. (2013). Neuropeptidergic input pathways to the circadian pacemaker center of the Madeira cockroach analysed with an improved injection technique. *European Journal of Neuroscience*(38), 2842–2852.
- Söhler, S., Stengl, M. & Reischig, T. (2011). Circadian pacemaker coupling by multi-peptidergic neurons in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell and Tissue Research*(343), 559–577.
- Sokolove, P. G. & Loher, W. (1975). Rôle of eyes, optic lobes, and pars intercerebralis in locomotory and stridulatory circadian rhythms of *Teleogryllus commodus*. *Journal of Insect Physiology*, 21(4), 785–799. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90009-8)
- Spindler, P. (1959). Studien zur Vererbung von Verhaltensweisen: Verhalten gegenüber Schlangen. *Anthropologischer Anzeiger*(23), 187–218.

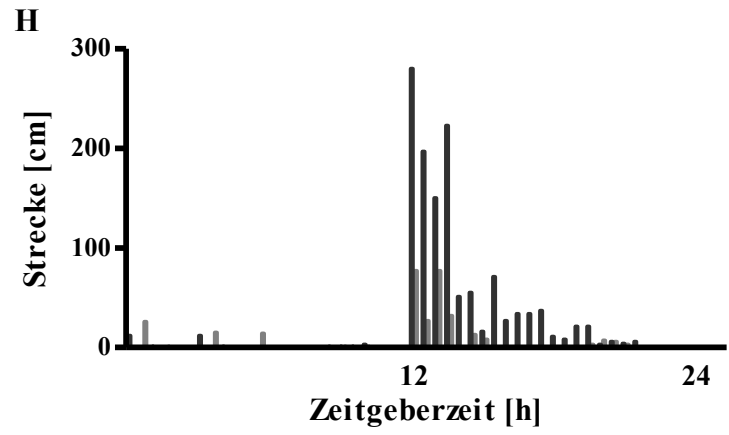
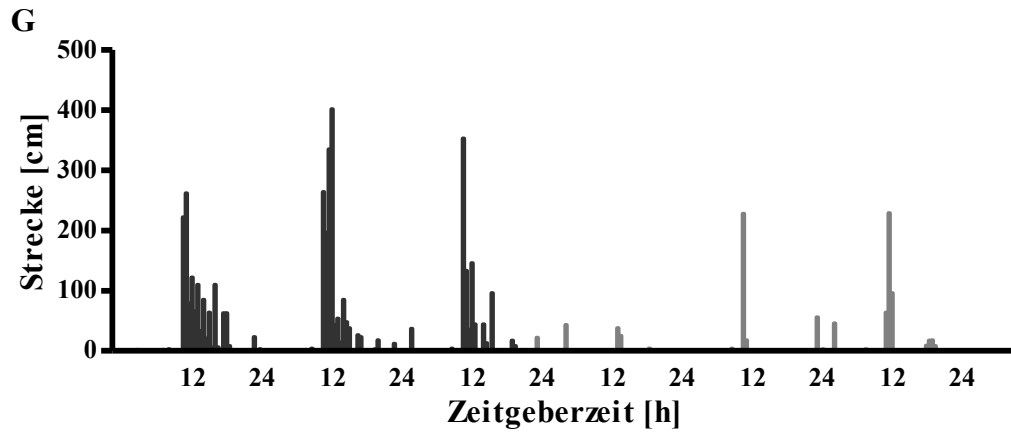
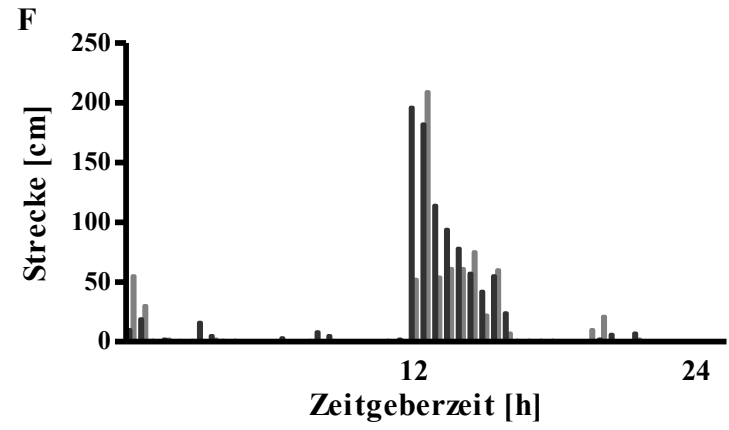
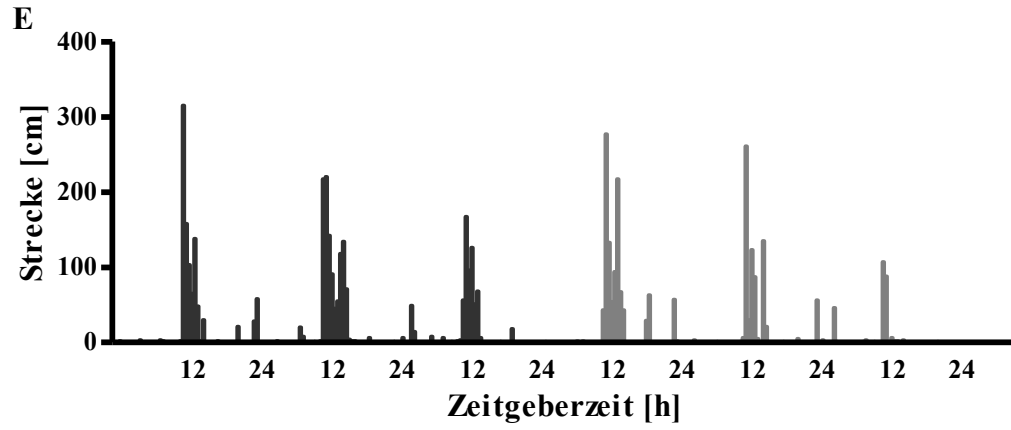
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M. & Hall, J. C. (1998). The cryb Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95(5), 681–692. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81638-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81638-4)
- Stay, B. & Tobe, S. S. (2007). The Role of Allatostatins in Juvenile Hormone Synthesis in Insects and Crustaceans. *Annual Review of Entomology*(52), 277–299.
- Stengl, M. & Arendt, A. (2016). Peptidergic circadian clock circuits in the Madeira cockroach. *Current opinion in neurobiology*, 41, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.07.010>
- Stengl, M. & Homberg, U. (1994). Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach *Leucophaea maderae* share properties with circadian pacemaker neurons. *Journal of Biological Rhythms*(175), 203–213.
- Stengl, M., Werckenthin, A. & Wei, H. (2015). How does the circadian clock tick in the Madeira cockroach? *ScienceDirect*(12), 38–45.
- Storrer, J. & Hirschfeld, E. (2007). Lebende Wirbellose im Unterricht. *Praxis der Naturwissenschaften Biologie*, 56(5).
- Tabara, H., Grishok, A. & Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science Compass*(282), 430–431.
- Tobler, I. (1983). Effect of Forced Lokomotion on the Rest-Activity Cycle of the Cockroach. *Behavioural Brain Research*(8), 351–360.
- Touitou, Y., Reinberg, A. & Touitou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life sciences*, 173, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.008>
- Veenstra, J. A. (1989). Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Letters*, 250(2), 231–234. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80727-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80727-6)
- Vogt, H. (2006). Spinnen und Krabbeltiere - kein ekliges "Zeug". *Die Grundschulzeitschrift*(192), 4–8.
- Wagner, E.-M. (2015). Wie hält man das aus? *JuKiP - Ihr Fachmagazin für Gesundheits- und Kinderkrankenpflege*(04), 165–168. <https://doi.org/10.1055/s-0041-103706>
- Werckenthin, A., Derst, C. & Stengl, M. (2012). Sequence and expression of *per*, *tim1*, and *cry2* genes in the Madeira cockroach *Rhyarobia maderae*. *Journal of Biological Rhythms*, 27(6), 453–466. <https://doi.org/10.1177/0748730412462109>

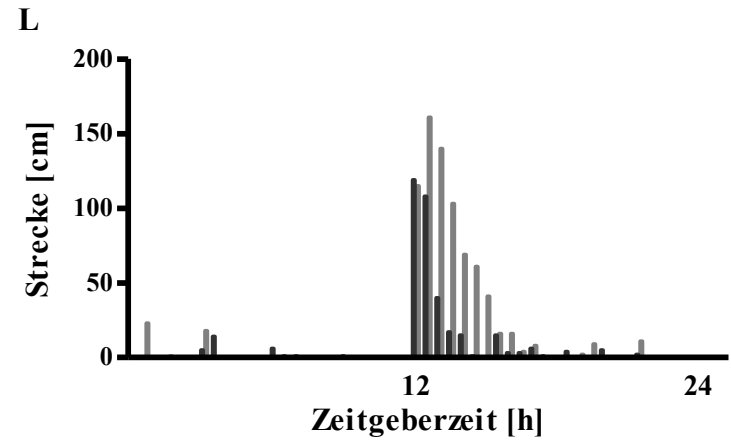
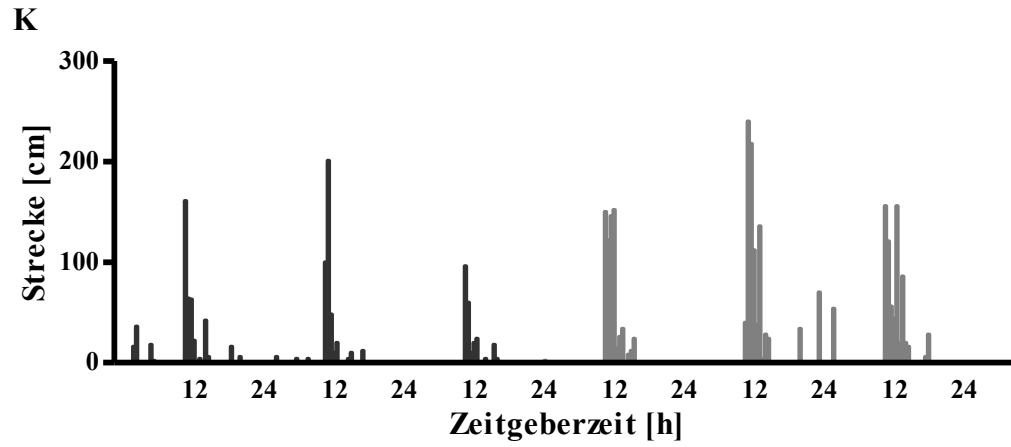
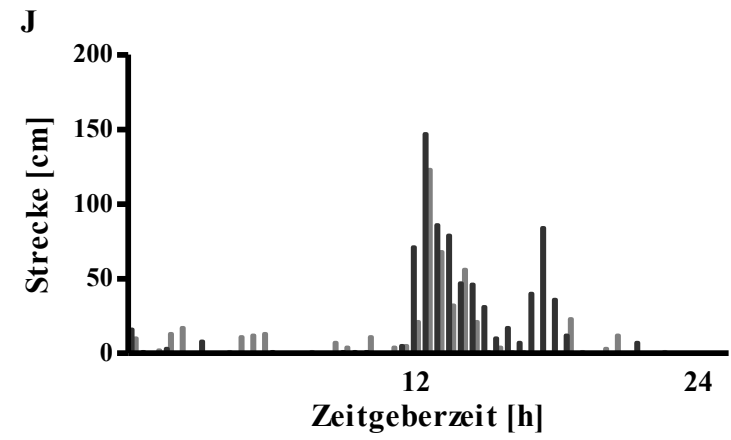
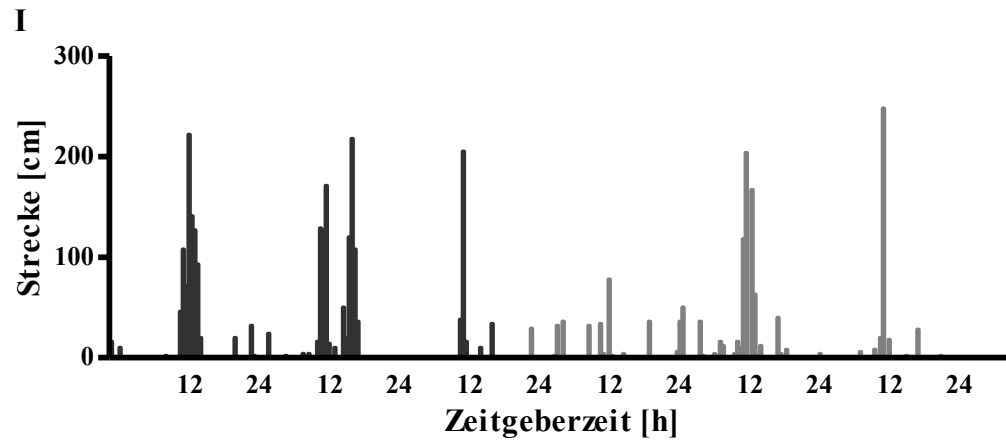
- Wiedenmann, G. (1977). Two activity peaks in the circadian rhythm of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 8(3-4), 378–383.
<https://doi.org/10.1080/09291017709359607>
- Yuan, Q., Metterville, D., Briscoe, A. D. & Reppert, S. M. (2007). Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular biology and evolution*, 24(4), 948–955.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm011>
- Zlotowicz, M. & Redie, R. (1983). Warum haben Kinder Angst?

Anhang

Anhang 1 – Laufaktivität im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel der Versuchsgruppe 1 mit *gfp knock down* vor (dunkel graue Balken) und nach (hell graue Balken) dem Schlafentzug (SE). **A, C, E, G, I, K:** Aktivität (cm/30 min; Balken) je eines Individuums. **B, D, F, H, J, L:** Durchschnittlich zurückgelegte Strecke (cm/30 min; Balken) des linken Diagramms.

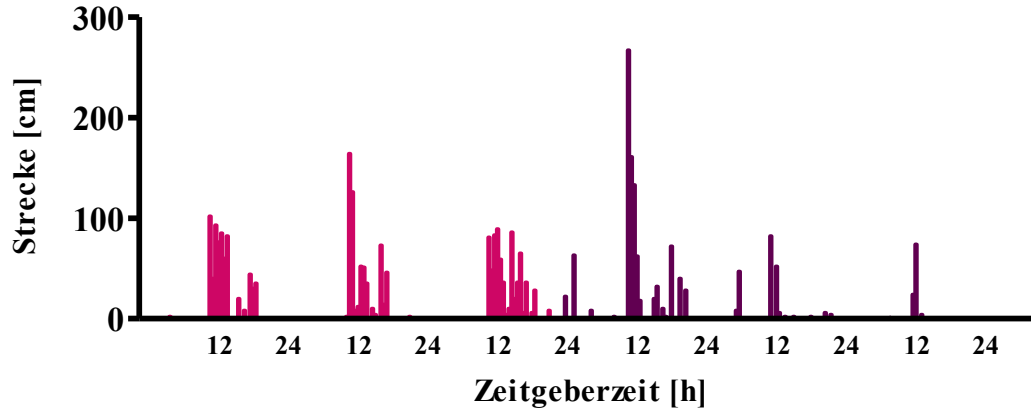




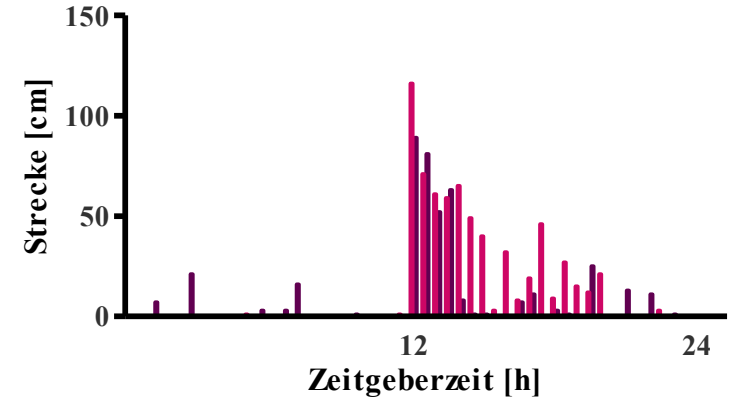


Anhang 2 – Laufaktivität im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel der Versuchsgruppe 2 mit *mip-pre/mip-r knock down* vor (hell violette Balken) und nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug (SE). **A, C, E, G, I, K:** Aktivität (cm/30 min; Balken) je eines Individuums. **B, D, F, H, J, L:** Durchschnittlich zurückgelegte Strecke (cm/30 min; Balken) des linken Diagramms.

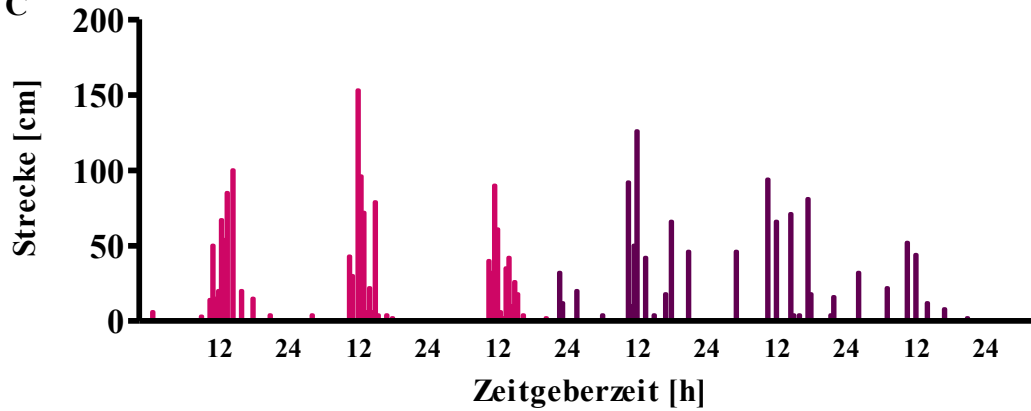
A



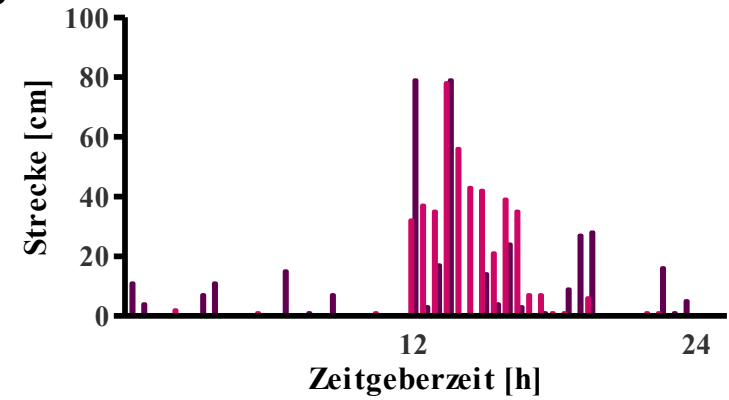
B

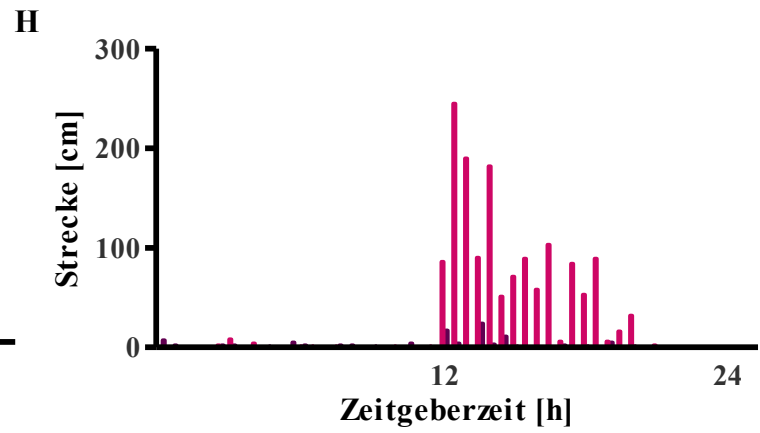
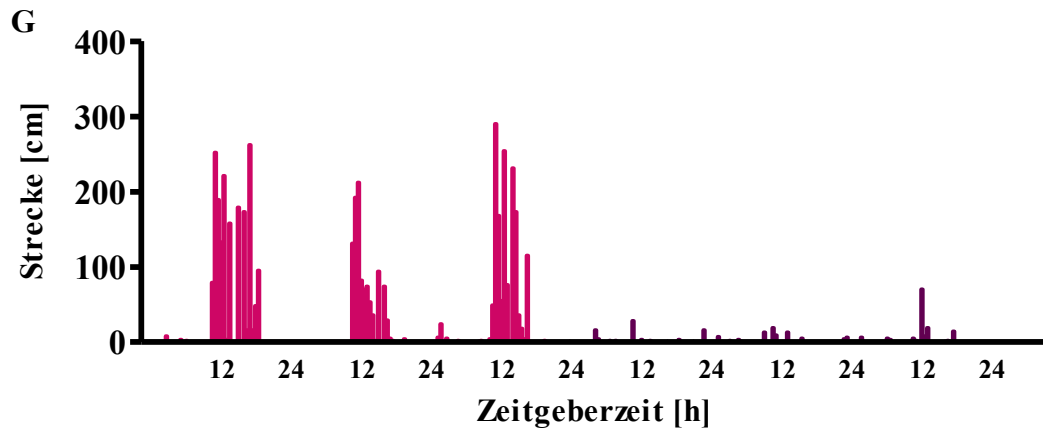
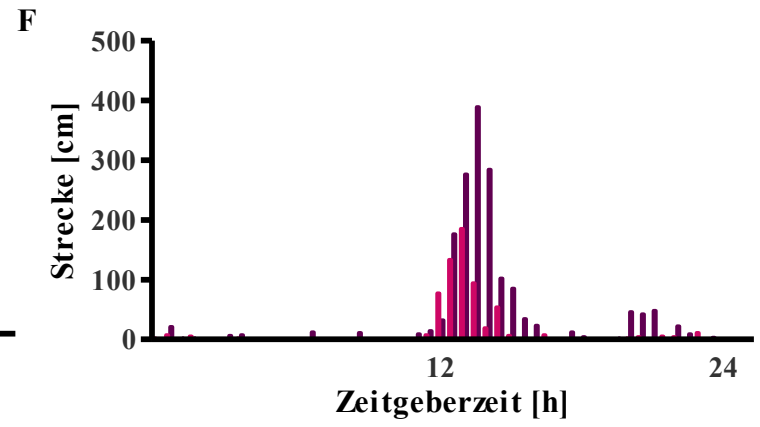
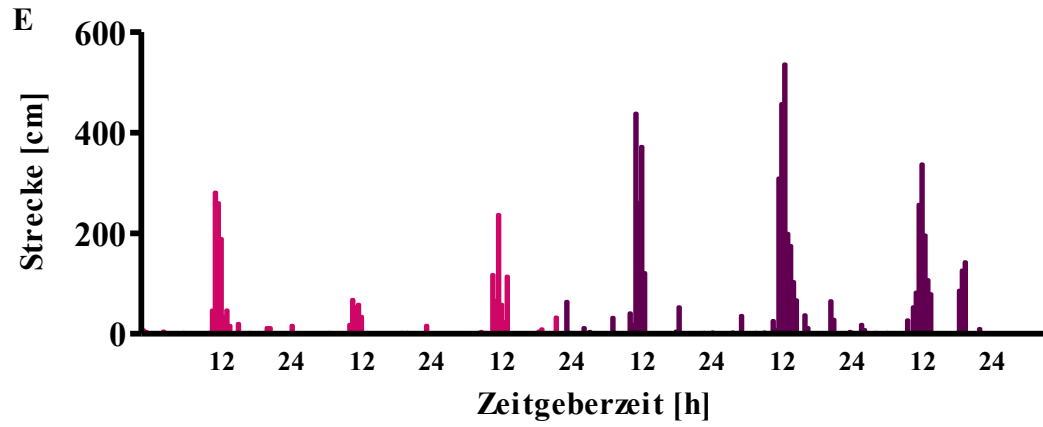


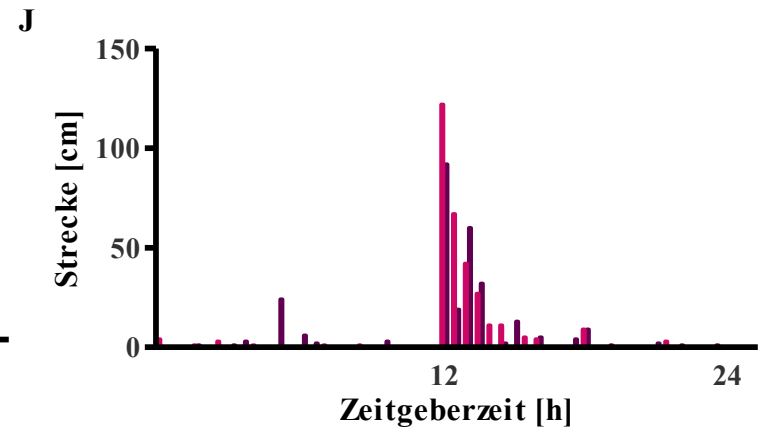
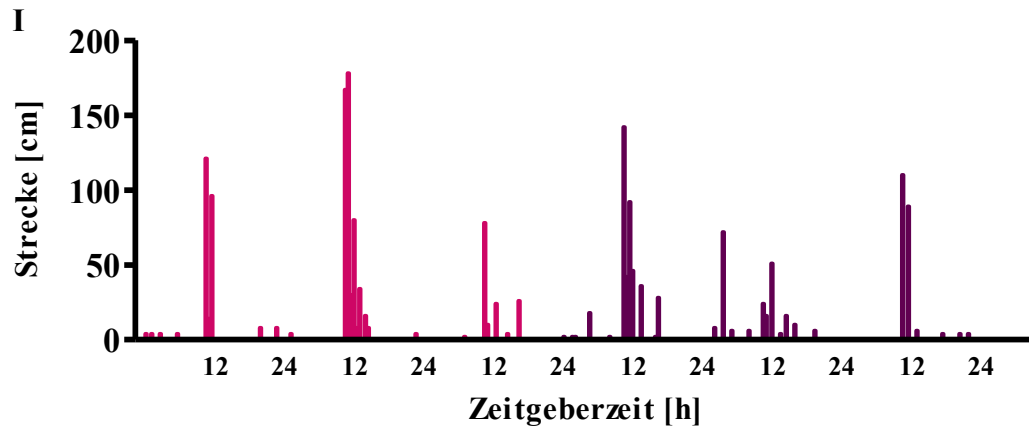
C



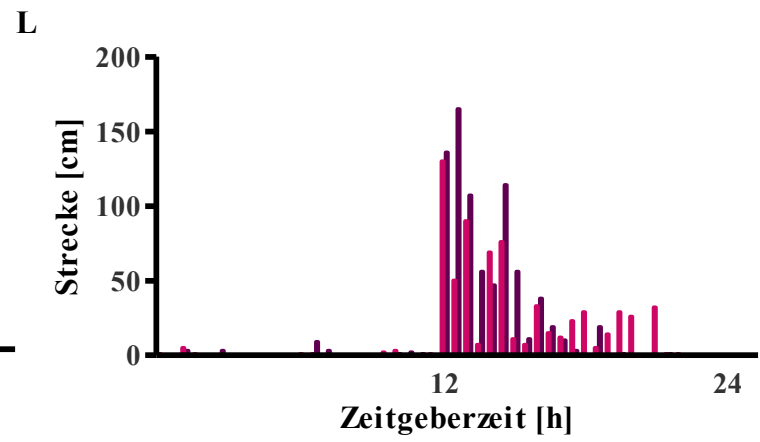
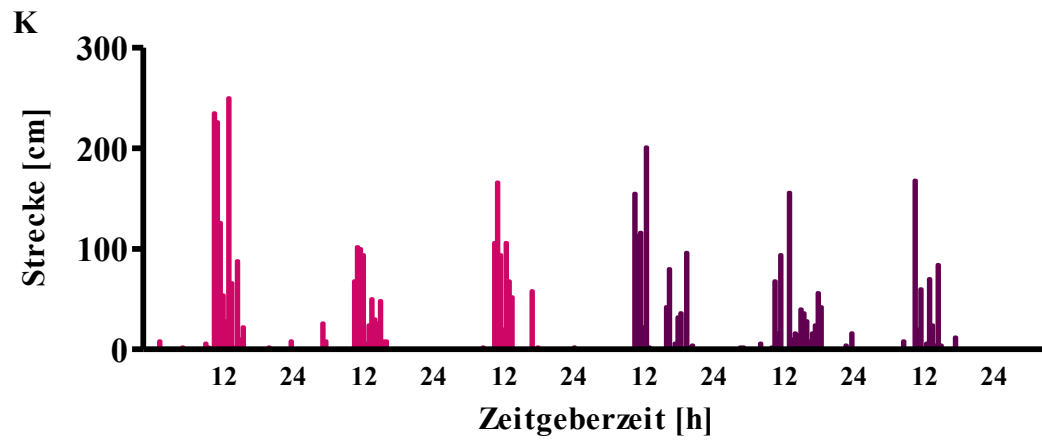
D



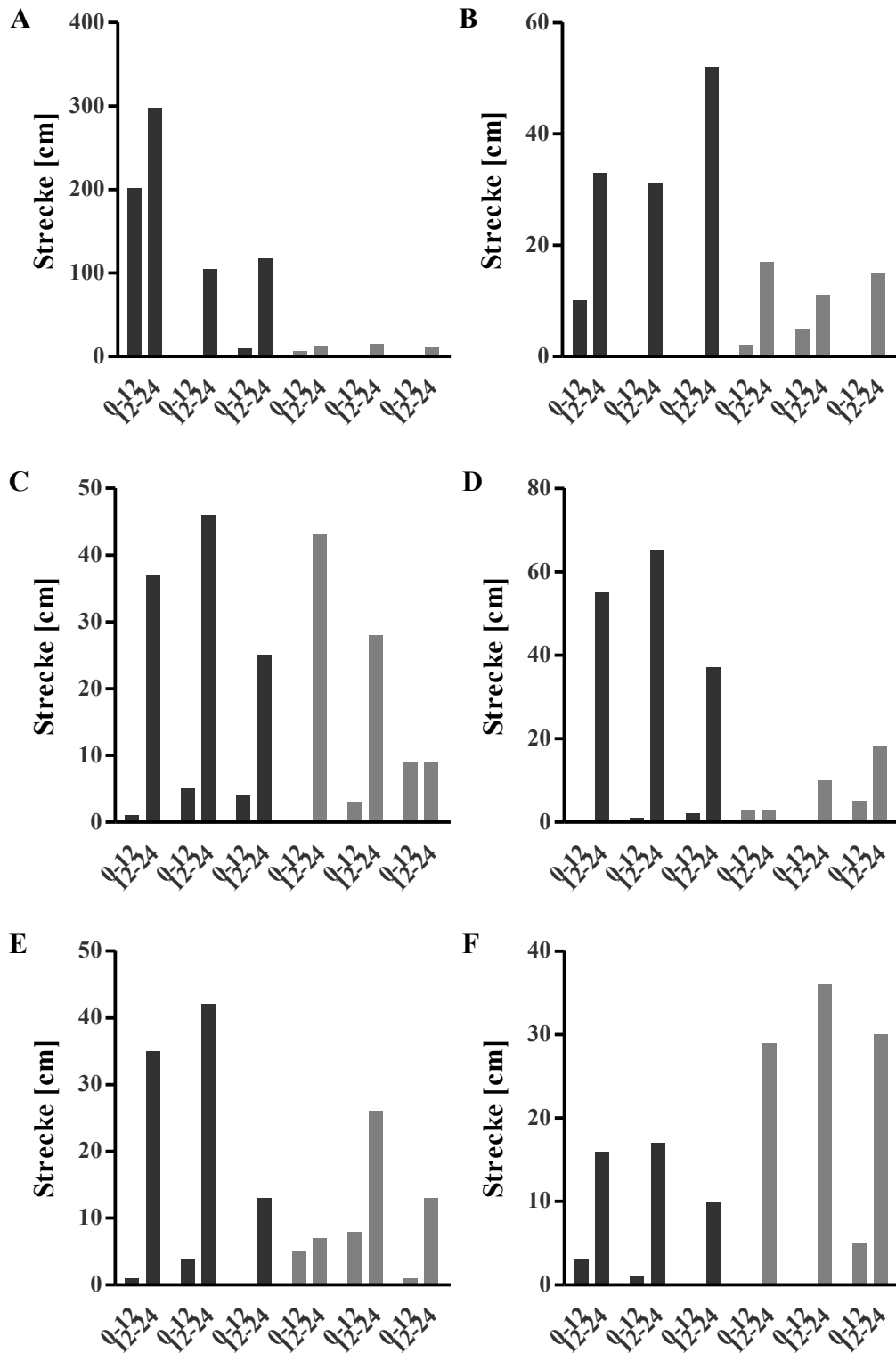




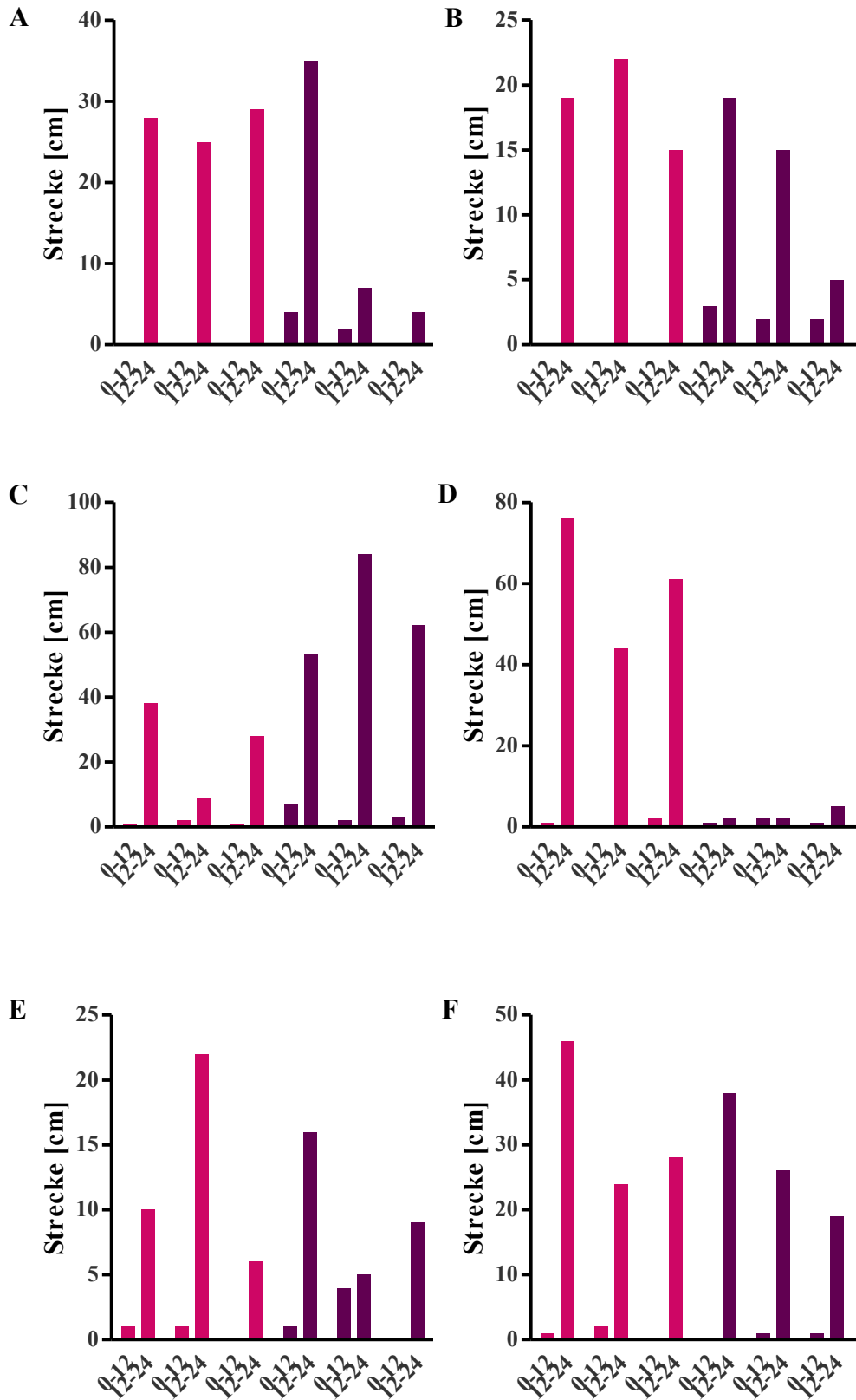
IIIXX



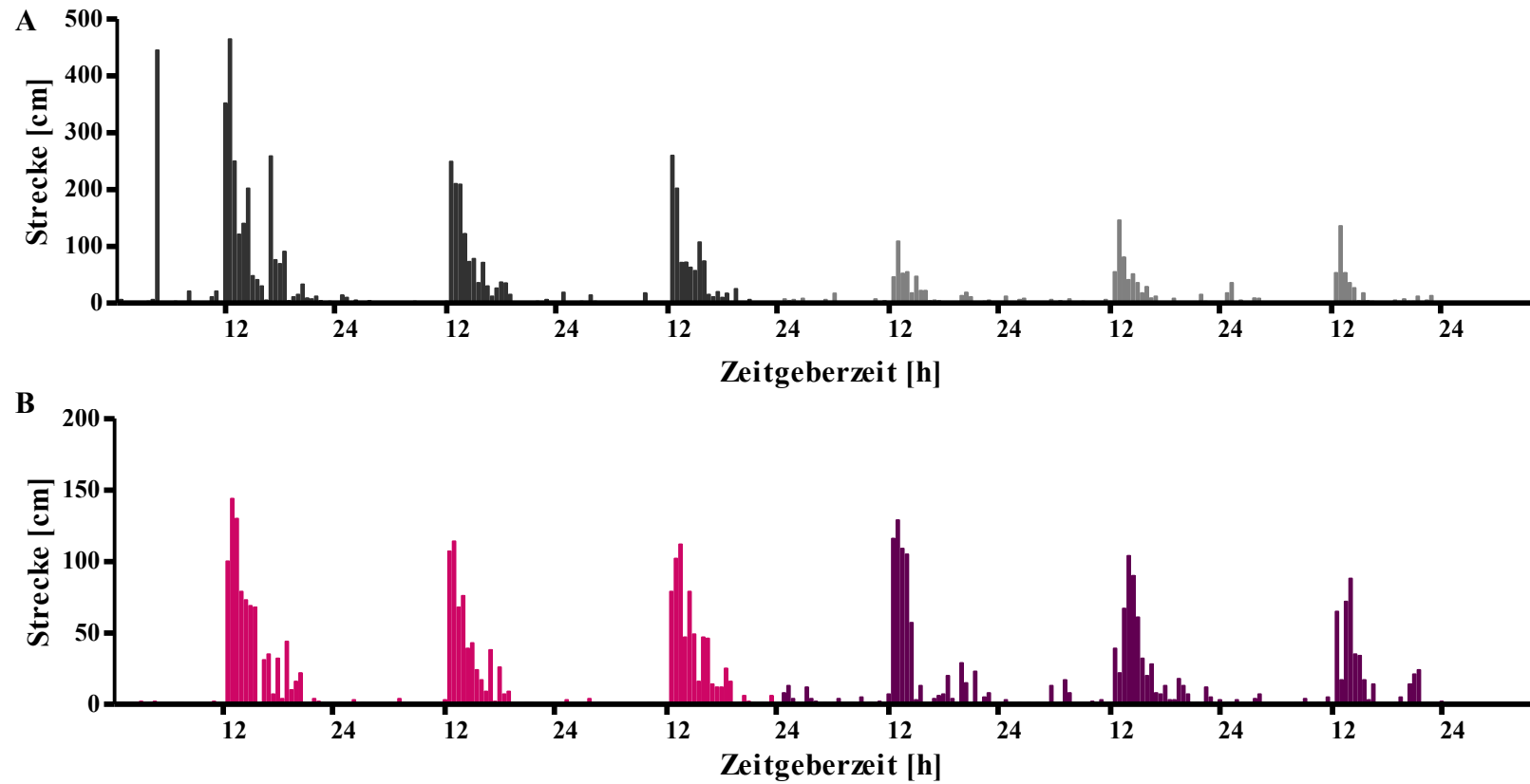
Anhang 3 – Laufaktivität im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel der Versuchsgruppe 1 mit *gfp knock down* vor (dunkel graue Balken) und nach (hell graue Balken) dem Schlafentzug (SE; cm/12 Stunden).



Anhang 4 – Laufaktivität im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel der Versuchsgruppe 2 mit *mip-pre/mip-r knock down* vor (hell violette Balken) und nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug (SE: cm/12 Stunden).



Anhang 5 – Laufaktivität im 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel. **A:** Die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Versuchsgruppe 1 mit *gfp knock down* vor (dunkel graue Balken) und nach (hell graue Balken) dem Schlafentzug (SE; cm/30 min). **B:** Die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Versuchsgruppe 2 mit *mip-pre/mip-r knock down* vor (hell violette Balken) und nach (dunkel violette Balken) dem Schlafentzug (cm/30 min).



Anhang 6:

Tab. 4: Effekte eines mechanischen Schlafentzugs (SE) auf das Aktivitätslevel von *mip-precursor* und *mip*-Rezeptor (*mip-pre/mip-r*) *knock down* und *gfp knock down* Tieren (30 Minuten Intervalle).

	<i>gfp knock down</i>		<i>mip-pre/mip-r knock down</i>		Signifi- kanz
	Vor SE	Nach SE	Vor SE	Nach SE	
	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	
00:00- 00:30	12.78 ± 6.32	12.22 ± 5.29	1.06 ± 0.35	3.22 ± 3.47	nicht signifikant
00:30- 01:00	3.39 ± 5.87	13.33 ± 19.40	1.11 ± 1.39	4.56 ± 7.04	
01:00- 01:30	0.28 ± 0.25	2.28 ± 3.12	0.44 ± 0.77	2.50 ± 2.14	
01:30- 02:00	2.67 ± 2.08	3.83 ± 3.06	1.11 ± 1.39	0.50 ± 0.17	
02:00- 02:30	1.61 ± 1.42	5.56 ± 4.53	0.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00	
02:30- 03:00	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.19	1.22 ± 0.69	3.89 ± 6.43	
03:00- 03:30	7.00 ± 6.39	3.44 ± 4.86	1.33 ± 2.31	2.56 ± 2.22	
03:30- 04:00	3.17 ± 2.57	3.22 ± 4.35	0.28 ± 0.48	3.44 ± 2.83	
04:00- 04:30	148.33 ± 256.63	0.17 ± 0.17	0.94 ± 1.00	0.00 ± 0.00	
04:30- 05:00	0.61 ± 0.35	2.11 ± 3.66	0.11 ± 0.10	0.33 ± 0.51	
05:00- 05:30	0.11 ± 0.19	2.00 ± 3.46	0.11 ± 0.19	4.22 ± 7.17	
05:30- 06:00	0.00 ± 0.00	5.94 ± 9.44	0.28 ± 0.48	1.44 ± 0.69	
06:00- 06:30	1.22 ± 1.58	1.33 ± 2.31	0.11 ± 0.19	1.50 ± 1.83	
06:30- 07:00	0.56 ± 0.69	0.22 ± 0.38	1.72 ± 2.30	5.50 ± 9.48	
07:00- 07:30	0.22 ± 0.38	3.06 ± 3.82	0.83 ± 0.60	2.67 ± 4.48	
07:30- 08:00	6.89 ± 11.93	0.50 ± 0.44	0.11 ± 0.19	0.61 ± 0.59	

	<i>gfp knock down</i>		<i>mip-pre/mip-r knock down</i>	
	Vor SE	Nach SE	Vor SE	Nach SE
	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]
08:00-08:30	1.39 ± 1.69	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.19	0.28 ± 0.29
08:30-09:00	1.61 ± 0.82	1.39 ± 1.18	0.11 ± 0.19	3.06 ± 2.64
09:00-09:30	6.39 ± 9.66	1.28 ± 0.67	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.10
09:30-10:00	0.28 ± 0.48	0.06 ± 0.10	0.22 ± 0.25	0.89 ± 1.02
10:00-10:30	4.44 ± 5.24	2.56 ± 3.86	0.44 ± 0.77	0.50 ± 0.67
10:30-11:00	7.33 ± 11.56	0.06 ± 0.10	0.50 ± 0.87	0.89 ± 1.42
11:00-11:30	0.22 ± 0.38	4.06 ± 1.75	0.11 ± 0.19	1.50 ± 2.60
11:30-12:00	118.39 ± 202.03	0.94 ± 1.64	1.50 ± 1.61	2.44 ± 3.81
12:00-12:30	324.78 ± 121.84	51.22 ± 4.91	95.00 ± 14.73	73.39 ± 39.15
12:30-13:00	220.39 ± 25.71	130.33 ± 19.14	119.78 ± 21.61	55.44 ± 63.16
13:00-13:30	133.61 ± 70.06	61.72 ± 16.85	103.28 ± 31.83	82.50 ± 22.77
13:30-14:00	111.33 ± 34.91	44.11 ± 9.96	67.22 ± 17.43	99.00 ± 9.82
14:00-14:30	112.89 ± 77.47	32.00 ± 16.74	63.33 ± 21.60	60.67 ± 27.88
14:30-15:00	60.83 ± 15.18	29.06 ± 22.32	53.72 ± 13.62	32.00 ± 29.45
15:00-15:30	61.17 ± 39.33	19.44 ± 2.52	35.78 ± 28.08	20.78 ± 9.89
15:30-16:00	58.11 ± 24.82	18.28 ± 13.04	21.61 ± 23.71	7.50 ± 10.76
16:00-16:30	16.56 ± 12.90	5.17 ± 3.24	28.50 ± 18.58	14.06 ± 14.00
16:30-17:00	94.00 ± 142.61	5.94 ± 5.81	28.67 ± 13.06	4.11 ± 3.50

	<i>gfp knock down</i>		<i>mip-pre/mip-r knock down</i>	
	Vor SE	Nach SE	Vor SE	Nach SE
	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]	Mittlere Strecke ±SEM [cm]
17:00-17:30	40.53 ± 31.22	1.33 ± 2.31	7.00 ± 5.00	4.06 ± 3.77
17:30-18:00	38.67 ± 29.87	0.00 ± 0.00	23.22 ± 10.66	6.89 ± 6.51
18:00-18:30	47.28 ± 38.62	0.78 ± 1.07	12.11 ± 11.42	7.83 ± 10.40
08:30-19:00	6.11 ± 7.47	4.83 ± 3.25	22.94 ± 18.52	2.50 ± 1.09
19:00-19:30	11.83 ± 12.55	1.33 ± 1.33	3.50 ± 5.63	7.83 ± 8.61
19:30-20:00	5.78 ± 7.92	6.67 ± 6.58	5.78 ± 8.43	13.94 ± 14.63
20:00-20:30	11.44 ± 18.96	7.61 ± 9.60	9.06 ± 11.26	12.22 ± 4.39
20:30-21:00	5.39 ± 4.39	4.78 ± 5.87	0.67 ± 0.76	7.00 ± 12.12
21:00-21:30	3.17 ± 3.09	5.11 ± 5.68	0.39 ± 0.35	15.83 ± 12.86
21:30-22:00	5.39 ± 5.64	4.94 ± 8.42	1.33 ± 2.03	0.11 ± 0.19
22:00-22:30	1.22 ± 2.12	3.94 ± 1.06	0.83 ± 1.04	5.94 ± 5.61
22:30-23:00	2.56 ± 3.02	5.83 ± 6.29	0.78 ± 0.51	4.28 ± 3.69
23:00-23:30	1.11 ± 1.39	0.22 ± 0.38	1.83 3.18	0.44 ± 0.77
23:30-24:00	0.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.67 ± 1.45
Signifikanz	nicht signifikant			

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die anderen Druckwerken oder digitalisierten Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Die Versicherung gilt auch für verwendete Zeichnungen, Skizzen, Notenbeispiele sowie bildliche und sonstige Darstellungen.

Ort, Datum

Selina Weinand