



**Untersuchung der Rolle von Rhodopsin 7 und Cryptochrom im Sehprozess  
von *Drosophila melanogaster***  
**Investigation of Rhodopsin 7 and Cryptochrome in *Drosophila*  
*melanogaster* vision**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Vorgelegt von

**Rudi Grebler**

aus

**München**

Würzburg,

**2015**



Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Charlotte Förster

2. Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

3. Betreuer: Dr. Robert Kittel

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunden ausgehändigt am: \_\_\_\_\_



---

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Opsine und Cryptochrome – Proteine der Photorezeption .....                                | 1         |
| 1.2 Opsine und Cryptochrom in der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i> .....               | 2         |
| 1.3 Die Komplexaugen von <i>Drosophila melanogaster</i> – Hauptorgane der Photorezeption ..... | 3         |
| 1.3.1 Morphologischer Aufbau.....  | 3         |
| 1.3.2 Verteilung der Opsine.....   | 5         |
| 1.3.3 Photochemische Eigenschaften der Opsine .....  | 6         |
| 1.3.4 Die Aktivierung der Phototransduktionskaskade.....                                       | 8         |
| 1.3.5 Die Inaktivierung der Phototransduktionskaskade .....                                    | 10        |
| 1.4 Cryptochrom und die Lichtperzeption der Komplexaugen .....                                 | 11        |
| 1.5 Rh7 – ein neues <i>Drosophila</i> Opsin? .....   | 12        |
| 1.6 Zielsetzung .....  | 14        |
| <br>   |           |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1 Aufzucht und Auswahl der Fliegen .....   | 15        |
| 2.2 Fliegenstämme .....  | 15        |
| 2.3 Untersuchung der genomischen DNA mittels PCR.....  | 16        |
| 2.3.1 Extraktion genomischer DNA .....   | 16        |
| 2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....  | 17        |
| 2.3.3 Gelelektrophorese .....  | 18        |
| 2.4 Bestimmung der mRNA Level mittels qPCR .....   | 18        |
| 2.4.1 RNA Extraktion.....  | 18        |
| 2.4.2 Herstellung von cDNA.....  | 19        |
| 2.4.3 Quantitative real-time PCR (qPCR).....   | 19        |
| 2.5 Aufnahmen der tiefen Pseudopupille und der Komplexaugen.....                               | 21        |
| 2.6 Untersuchung der Augenpigmentierung.....   | 21        |
| 2.6.1 Extraktion der Pigmente.....   | 21        |
| 2.6.2 Quantifizierung des Pigmentgehalts .....   | 22        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.7 Antikörperfärbung der Retinas .....   | 23        |
| 2.7.1 Präparation und Immunhistochemie .....  | 23        |
| 2.7.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung.....  | 24        |
| 2.8 Paraffin Schnitte .....   | 24        |
| 2.8.1 Anfertigung der Schnitte .....  | 24        |
| 2.8.2 Fotografie .....  | 25        |
| 2.9 Messung der lichtabhängigen Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin .....   | 26        |
| 2.9.1 Präparation der Fliegen und Aufzeichnung der Konversion .....   | 26        |
| 2.9.2 Auswertung .....  | 27        |
| 2.10 Aufnahme von Elektoretinogrammen (ERGs), Bestimmung der Intensitäts-Response Kurven (IRCs) und der Aktionsspektren .....   | 27        |
| 2.10.1 Präparation der Fliegen und Elektoretinogramm Registrierung .....  | 27        |
| 2.10.2 Belichtung der Komplexaugen .....  | 28        |
| 2.10.3 Bestimmung der Intensitäts-Response Kurven.....  | 29        |
| 2.10.4 Bestimmung der Aktionsspektren.....  | 30        |
| 2.11 Optomotorische Reaktion .....  | 31        |
| 2.11.1 Registrierung der Laufbewegung .....   | 31        |
| 2.11.2 Visueller Stimulus .....   | 32        |
| 2.11.3 Quantifizierung der Wendereaktion .....  | 33        |
| 2.12 Statistische Analyse.....  | 34        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1 Ektopische Expression von Rh7 in R1-6 der Komplexaugen .....  | 35        |
| 3.1.1 Rhodopsin 7 scheint die Rhabdomerdegeneration in <i>ninaE</i> <sup>17</sup> Fliegen nicht vollständig zu verhindern ..... | 37        |
| 3.1.2 Rhodopsin 7 kann die Phototransduktionskaskade nicht aktivieren.....  | 38        |
| 3.1.3 Die ektopische Expression von Rh7 hat keinen Einfluss auf die lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen.....      | 39        |
| 3.2 Die endogene Funktion von Rhodopsin 7 .....   | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1 Die Abwesenheit von Rhodopsin 7 hat keinen Einfluss auf die Rhabdomermorphologie .....                                | 41        |
| 3.2.2 Rhodopsin 7 vermindert die lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen .....                                    | 42        |
| 3.2.3 Der Effekt von Rhodopsin 7 auf die Depolarisation scheint von lichtintensität und Adaptationszustand abzuhängen ..... | 44        |
| 3.2.4 Der Einfluss der Pigmentierung .....  | 46        |
| 3.2.5 Die Wellenlängenabhängigkeit des Rh7 Effekts .....  | 48        |
| 3.2.6 Rh7 hat keinen Einfluss auf die Umwandlung von Metarhodopsin zu Rhodopsin .....                                       | 50        |
| 3.2.7 Die Untersuchung des Elektoretinogramm-Nachpotentials .....   | 52        |
| 3.2.8 Rh7 vermindert die optomotorische Reaktion .....  | 55        |
| 3.2.9 Rh7 beeinflusst die Pigmentierung der Komplexaugen .....  | 57        |
| 3.3 Der Einfluss des genetischen Hintergrundes .....  | 60        |
| 3.3.1 Die Augenfarbe der $\bar{y}w^+; +; rh7^0$ Fliegen wird scheinbar durch eine Hintergrundmutation verursacht .....      | 61        |
| 3.3.2 Die Hintergrundmutation ist rezessiv .....  | 62        |
| 3.3.3 Die Hintergrundmutation ist bereits bei $\bar{y}w^+; +; rh7^0$ vorhanden .....  | 64        |
| 3.3.4 Die Rezeptorpotentialamplitude von $\bar{y}w^+; +; rh7^0$ .....   | 66        |
| 3.3.5 Die optomotorische Reaktion von $\bar{y}w^+; +; rh7^0$ .....  | 67        |
| 3.3.6 Die Rezeptorpotentialamplitude von $\bar{y}w^+; +; rh7^0$ .....   | 68        |
| 3.4 Der Einfluss von Cryptochrom auf die Depolarisation der Rezeptorzellen .....  | 70        |
| <b>4. Diskussion .....</b>  | <b>73</b> |
| 4.1 Rh7 ein neuer Photorezeptor? .....  | 73        |
| 4.2 Die endogene Expression und Funktion von Rh7 .....  | 75        |
| 4.2.1 Evaluierung des Einflusses der Hintergrundmutation auf die $rh7^0$ Phänotypen .....                                   | 75        |
| 4.2.2 Die Expression von Rh7 .....  | 76        |
| 4.2.3 Rh7 scheint nicht als Photorezeptor in <i>Drosophila</i> zu agieren .....   | 77        |
| 4.2.4 Erhöhte Rh1 Level als Ursache der $rh7^0$ Phänotypen? .....   | 78        |
| 4.2.5 Der Effekt von Rh7 auf die Depolarisation der Rezeptorzellen .....  | 79        |
| 4.2.6 Das Elektoretinogramm Nachpotential .....   | 82        |

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| <b>5. Anhang .....</b>                | <b>84</b>  |
| <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>86</b>  |
| <b>7. Zusammenfassung .....</b>       | <b>96</b>  |
| <b>8. Summary .....</b>               | <b>98</b>  |
| <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b> | <b>100</b> |
| <b>Lebenslauf .....</b>               | <b>101</b> |
| <b>Danksagung .....</b>               | <b>103</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1 Opsine und Cryptochrome - Proteine der Photorezeption

Von zentraler Bedeutung für die Photorezeption im gesamten Tierreich sind die zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehörenden Opsine. Gemeinsames Merkmal aller bis heute bekannten Opsine ist die Bindung eines Chromophors, der ihnen die Fähigkeit verleiht Photonen zu absorbieren und damit als Lichtsensor zu wirken. Ein Großteil dieser Opsine sorgt zudem, ausgelöst durch die Absorption eines Photons, für die Aktivierung eines G-Proteins und so für die Internalisierung eines ursprünglich externen Lichtstimulus.

Entsprechend ihrer photorezeptiven Fähigkeit dienen Opsine vorrangig der visuellen Wahrnehmung. Daneben sind sie allerdings auch für die Vermittlung zahlreicher weiterer lichtabhängiger, physiologischer Prozesse wie z.B. das Photoentrainment der inneren Uhr zuständig (zusammengefasst in: Terakita, 2005; Peirson *et al.*, 2009; Shichida und Matsuyama, 2009).

Der Mensch beispielsweise besitzt neben den in den Zapfen und Stäbchen der Retina exprimierten Opsinen noch Rhodopsin in den Melanozyten der Haut und Melanopsin in den retinalen Ganglienzellen. Während die drei Zapfen Opsine und das Rhodopsin der Stäbchen für das photopische und skotopische Sehen zuständig sind, vermittelt das in den Melanozyten exprimierte Rhodopsin die dortige UV-Licht induzierte Melanin Synthese (Wicks *et al.*, 2011; zusammengefasst in: Imamoto und Shichida, 2013). Melanopsin hingegen dient als Photorezeptor des Pupillenreflexes sowie als zentraler Lichtsensor für das Photoentrainment der inneren Uhr (zusammengefasst in Schmidt *et al.*, 2011). Bei manchen Tieren wird die Aufgabe des Photoentrainments allerdings nicht durch Opsine sondern in erster Linie durch die zur Familie der Flavoproteine gehörenden Typ 1 Cryptochrome bewerkstelligt. Ein Beispiel hierfür ist die Taufliege *Drosophila melanogaster* (zusammengefasst in Chaves *et al.*, 2011).

## 1.2 Opsine und Cryptochrom in der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Die als Modellorganismus der Neurobiologie dienende Taufliege *Drosophila melanogaster* besitzt bis dato insgesamt sechs eingehend charakterisierte, auch als Rhodopsine bezeichnete Opsine (Rh1-Rh6) und ein Cryptochrom (CRY).

Die Rhodopsine werden in erster Linie in den Zellen verschiedener, der Photorezeption dienender Organe exprimiert. Zu diesen Organen zählen die dorsal am Scheitel des Kopfes gelegenen Ocellen, die jeweils zwischen Retina und Lamina liegenden Hofbauer-Buchner Äuglein sowie die seitlich am Kopf liegenden Komplexaugen (Hofbauer und Buchner, 1989).

In den Ocellen findet sich Rh2, das dort der Detektion von Intensitätsänderungen und damit einhergehend der Kontrolle der Fluglage dient (Hu *et al.*, 1978; Feiler *et al.*, 1988; Pollock und Benzer, 1988; Kastberger, 1990). Das in den Hofbauer-Buchner Äuglein exprimierte Rh6 fungiert hingegen als Lichtsensor für das Photoentrainment der inneren Uhr (Yasuyama und Meinertzhagen, 1999; Helfrich-Förster *et al.*, 2002; Veleri *et al.*, 2007). Hauptorgan der Opsinexpression sind jedoch die der visuellen Wahrnehmung dienenden Komplexaugen. Dementsprechend finden sich dort alle bis dato charakterisierten Opsine, ausgenommen Rh2, in großer Menge. Neueren Untersuchungen zufolge finden sich die Opsine Rh5 und Rh6 auch in den Neuronen des Johnston'schen Organs der Taufliege, wo sie jedoch nicht der Photo- sondern der Mechanorezeption dienen (Senthilan *et al.*, 2012). Rh1 scheint zudem sogar bei der Thermorezeption von *Drosophila* Larven eine Rolle zu spielen (Shen *et al.*, 2011).

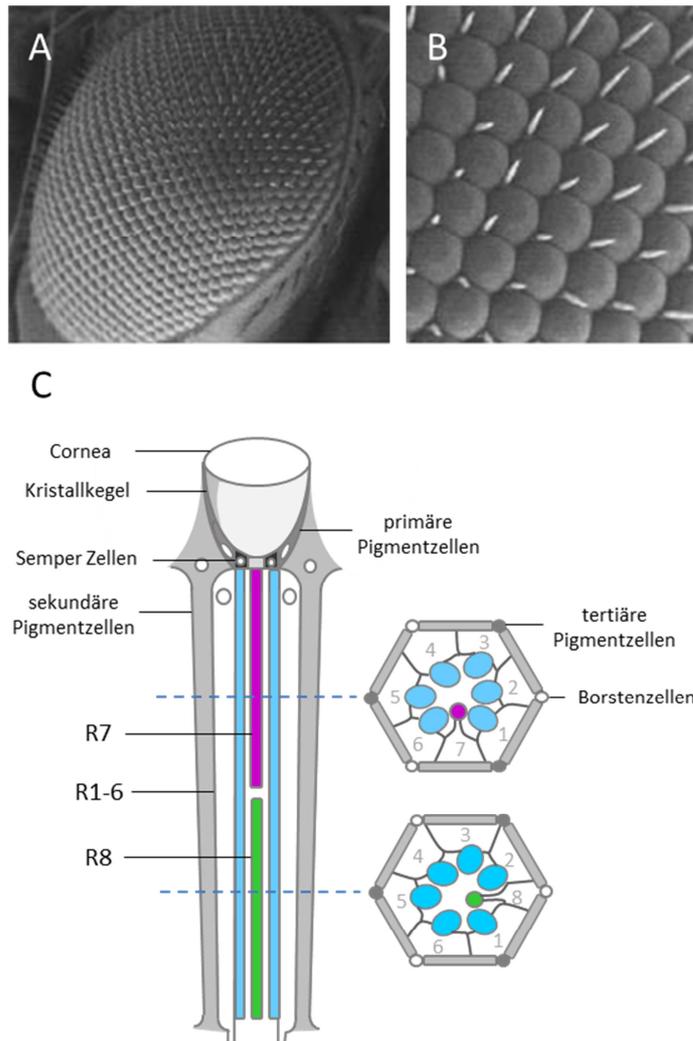
Cryptochrom wird hingegen im Gehirn in den Neuronen der inneren Uhr exprimiert, wo es dem Abgleich letzterer mit den externen Lichtbedingungen dient. Zusätzlich konnte Cryptochrom auch in den Komplexaugen der Taufliege nachgewiesen werden (Yoshii *et al.*, 2008). Wie die Rhodopsine dient auch Cryptochrom nicht einzig und allein der Lichtdetektion. So konnte beispielsweise eine Beteiligung von Cryptochrom an der Thermo- aber auch an der Magnetorezeption nachgewiesen werden (Kaushik *et al.*, 2007; Gegeer *et al.*, 2008; Yoshii *et al.*, 2009; Fedele *et al.*, 2014).

## 1.3 Die Komplexaugen von *Drosophila melanogaster* – Hauptorgane der Photorezeption

Die Komplexaugen von *Drosophila* dienen neben der Detektion von Intensität, Wellenlänge und Polarisationsrichtung des Lichts auch dem Erkennen von Mustern und Bewegungen (zusammengefasst in: Paulk *et al.*, 2013; Borst, 2014). Die Grundlage dieser Fähigkeiten bildet die Expression der Opsine Rh1, Rh3, Rh4, Rh5 und Rh6 in unterschiedlichen Rezeptorzellen des Komplexauges und die damit einhergehende selektive Erregbarkeit dieser Zellen durch die Phototransduktionskaskade.

### 1.3.1 Morphologischer Aufbau

Die Komplexaugen von *Drosophila melanogaster* sind aus jeweils ca. 750-800 strukturell identischen Untereinheiten, den sog. Ommatidien, zusammengesetzt. Die einzelnen Ommatidien sind von Borsten- und vor allem Pigmentzellen umgeben. Die in den Pigmentzellen enthaltenen Pteridine und Ommochrome sorgen für die charakteristische rötliche Augenfarbe wildtypischer Fliegen und dienen der optischen Isolation der einzelnen Ommatidien (Shoup, 1966). Jedes Ommatidium kann in einen distalen und einen proximalen Teil gegliedert werden. Der distale Teil umfasst den dioptrischen Apparat, bestehend aus Cornea und Kristallkegel. Darunter finden sich 4 Semper Zellen, die für die Bildung des hyalinen Kristallkegels verantwortlich sind. Der proximale Teil des Ommatidiums, die Retina, wird von 8 im Querschnitt hexagonal angeordneten Photorezeptorzellen (R1-8) gebildet. Die Rezeptorzellen R1-6 durchziehen die Retina in ihrer gesamten Tiefe. R7 und R8 hingegen erstrecken sich jeweils nur über die distale oder proximale Hälfte der Retina. Jede Rezeptorzelle besitzt eine spezialisierte Membranstruktur, bestehend aus tausenden von Mikrovilli, die als Rhabdomer bezeichnet wird. Die Rhabdomere von R1-6 sind trapezförmig um die tandemartig hintereinander geschalteten Rhabdomere von R7 und R8 angeordnet (Abb. 1).



**Abb. 1: Aufbau des Komplexauges**

Das Komplexauge setzt sich aus etwa 750-800 strukturell identischen Ommatidien zusammen (A) (B), die jeweils von einer Vielzahl an Pigmentzellen umgeben sind. Der distale Teil eines Ommatidiums gliedert sich in Cornea und Kristallkegel. Der proximale Teil wird von acht Rezeptorzellen (R1-8) gebildet. Diese sind im Querschnitt hexagonal angeordnet, wobei jeweils nur sieben der acht Rezeptorzellen in einer Ebene liegen. Die Rhabdomere von R1-6 (blau) sind um die hintereinander geschalteten Rhabdomere von R7 (magenta) und R8 (grün) herum angeordnet (C) (nach Gaumer *et al.*, 2000; Wang und Montell, 2007).

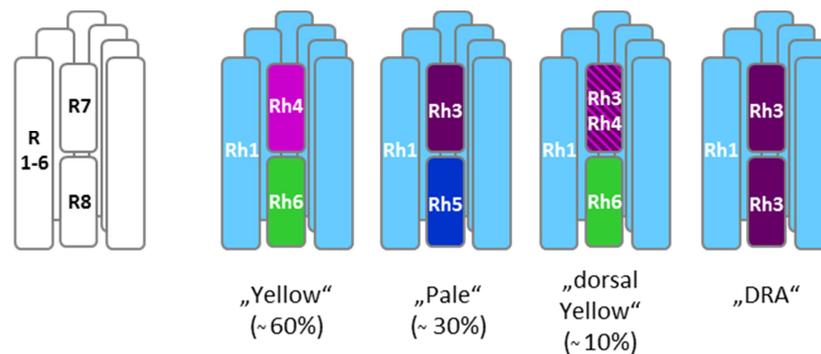
Die Rhabdomere beinhalten die Proteine der Phototransduktion und stellen somit den Ort der Umwandlung von visueller Information in ein zellinternes Signal dar (Ready *et al.*, 1976; zusammengefasst in Wang und Montell, 2007).

Die Axone der Rezeptorzellen R1-6 projizieren in das erste optische Ganglion, die Lamina, wo jeweils die Signale der Rezeptorzellen R1-6 mit parallelen optischen Achsen superponiert werden. Die Axone von R7 und R8 passieren hingegen die Lamina und bilden ihre Synapsen in jeweils unterschiedlichen Schichten des zweiten optischen Ganglions, der Medulla (zusammengefasst in Morante und Desplan, 2004).

### 1.3.2 Verteilung der Opsine

Die Rezeptorzellen R1-6 aller Ommatidien des Komplexauges beinhalten das durch das *ninaE* Gen codierte Opsin Rh1 (O'Tousa *et al.*, 1985; Zuker *et al.*, 1985). Basierend auf Variationen in der Opsinexpression der Rezeptorzellen R7 und R8 können die Ommatidien jedoch allgemein in vier Gruppen unterteilt werden. So unterscheidet man zwischen den über das gesamte Auge zufällig verteilten „Yellow“- und „Pale“-Ommatidien, den in der dorsalen Augenhälfte zusätzlich auftretenden „dorsal Yellow“-Ommatidien und den am dorsalen Rand des Auges liegenden „DRA“-Ommatidien (Bell *et al.*, 2007).

„Yellow“-Ommatidien exprimieren Rh4 in Rezeptorzelle 7 und Rh6 in Rezeptorzelle 8 (Chou *et al.*, 1999). In „Pale“-Ommatidien findet sich Rh3 in R7 und Rh5 in R8 (Papatsenko *et al.*, 1997). Ommatidien des „dorsal Yellow“-Typs besitzen sowohl Rh3 als auch Rh4 in R7 und Rh6 in R8 (Mazzoni *et al.* 2008). Die inneren Rezeptorzellen der „DRA“-Ommatidien beinhalten hingegen beide Rh3 (Fortini und Rubin, 1990; Feiler *et al.*, 1992). Etwa 60% der Ommatiden des Komplexauges sind vom „Yellow“-, 30% vom „Pale“- und etwa 10% vom „dorsalen Yellow“-Typ (Mazzoni *et al.* 2008) (Abb. 2).



**Abb. 2: Opsinverteilung im Komplexauge**

Alle Ommatiden des Komplexauges exprimieren Rh1 in R1-6. Aufgrund der variablen Opsinexpression in R7 und R8 können die Ommatiden allerdings in vier Typen unterteilt werden, die mit unterschiedlicher Häufigkeit im Komplexauge auftreten. Yellow-Ommatiden, die etwa 60% der Ommatiden des Auges ausmachen, besitzen Rh4 in R7 und Rh6 in R8. Pale-Ommatiden, die einen Anteil von etwa 30% haben, exprimieren Rh3 in R7 und Rh5 in R8. Etwa 10% der Ommatiden sind vom dorsalen Yellow-Typ, bei dem die Expression von Rh3 und Rh4 in R7 an die Expression von Rh6 in R8 gekoppelt ist. Die Ommatiden des dorsalen Augenrandes besitzen hingegen in R7 und R8 das Opsin Rh3 (nach Xie *et al.*, 2007; Mazzoni *et al.*, 2008).

### 1.3.3 Photochemische Eigenschaften der Opsine

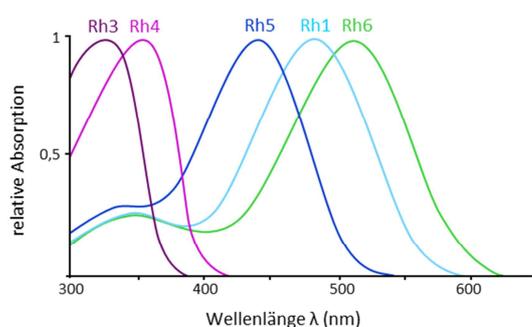
Allgemein handelt es sich bei den Opsinen um integrale Membranproteine, bestehend aus sieben hydrophoben Transmembransegmenten, die über hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind. Gemeinsam ist ihnen neben dieser allgemeinen Struktur zudem ein Lysinrest in der siebten Transmembrandomäne, der als Bindestelle des Chromophors dient (Bownds, 1967; zusammengefasst in Terakita, 2005).

Im Falle der Opsine von *Drosophila melanogaster* handelt es sich dabei um 11-cis 3-Hydroxyretinal, ein Derivat des Vitamin A, das aus  $\beta$ -Carotin gebildet wird und unter Ausbildung einer Schiff'schen Base kovalent über seine Aldehyd Gruppe an den Lysinrest gebunden ist (Harris *et al.*, 1977; Vogt und Kirschfeld, 1983; Goldsmith *et al.*, 1986).

Absorbiert der Chromophor ein Photon, so kommt es zu dessen Isomerisierung von der 11-cis zur all-trans Konfiguration. Dies sorgt für eine Konformationsänderung des Opsins und somit für den Übergang des Rhodopsins in seine physiologisch aktive Form, das Metarhodopsin. Bedingt durch seine thermische Stabilität, d.h. die Tatsache, dass der

Chromophor am Opsin gebunden bleibt, kann das Metarhodopsin ein weiteres Photon absorbieren, wodurch es zur Reisoomerisierung des Chromophors und somit zur Rückumwandlung des Metarhodopsins in das erneut aktivierbare Rhodopsin kommt (zusammengefasst in Schwemer, 1989).

Dabei unterscheiden sich die Absorptionsspektren der einzelnen Rhodopsine und Metarhodopsine nicht nur voneinander, sondern auch, trotz des jeweils gleichen Chromophors, untereinander. So erstreckt sich die Verteilung der Absorptionsmaxima der Rhodopsine vom UV-Bereich bis in den blauen/grünen Spektralbereich, die der Metarhodopsine hingegen vom blauen bis in den orangen Spektralbereich (Abb. 3, Tab. 1.).



**Abb. 3: Absorptionsspektren der im Komplexauge exprimierten Rhodopsine**

Die Absorption der einzelnen, im Auge exprimierten Rhodopsine ist relativ zum jeweiligen Absorptionsmaximum angegeben. Im Falle von Rh1 ist das Absorptionsspektrum ohne „sensitizing Pigment“ dargestellt (nach Stavenga und Arikawa, 2008).

| Rhodopsin | Absorptionsmaximum (nm) |     |
|-----------|-------------------------|-----|
|           | Rh                      | MRh |
| Rh1       | 486                     | 566 |
| Rh3       | 331                     | 468 |
| Rh4       | 355                     | 470 |
| Rh5       | 442                     | 494 |
| Rh6       | 515                     | 468 |

**Tab. 1: Absorptionsmaxima der Rhodopsine (Rh) und Metarhodopsine (MRh) des Komplexauges**

Für Rh1 ist entsprechend Abb. 3 das Absorptionsmaximum des Rhodopsins ohne „sensitizing Pigment“ angegeben (nach Salcedo *et al.*, 1999).

Grund für die Absorptionsunterschiede sind allgemein Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Opsine und damit einhergehend unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein (Britt *et al.*, 1993).

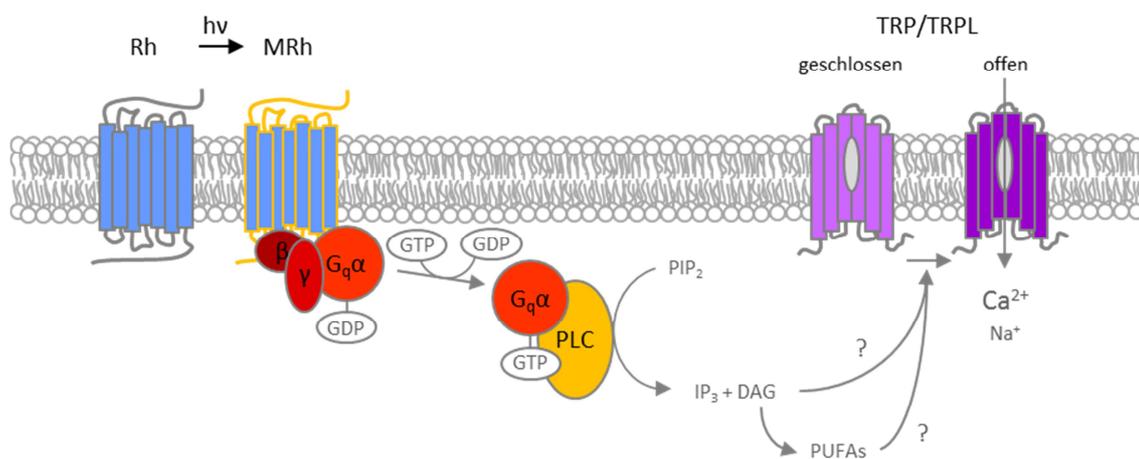
Neben 11-cis 3-Hydroxyretinal interagiert das in R1-6 vorhandene Rh1 noch mit einem weiteren Chromophor, dem 3-Hydroxyretinol (Kirschfeld *et al.*, 1977; Vogt und Kirschfeld, 1983; Vogt und Kirschfeld, 1983). Dieses sog. „sensitizing Pigment“ erhöht die Absorption von Rh1 im UV-Bereich und sorgt so neben dem in Abb. 3 gezeigten Maximum im blauen Spektralbereich für ein weiteres Empfindlichkeitsmaximum von Rh1 bei etwa 350nm (Minke und Kirschfeld, 1979). Das sensitizing Pigment ist am Opsin selbst oder in dessen Nähe gebunden und überträgt die durch die Absorption von Photonen aus dem UV-Bereich gewonnene Energie auf das 3-Hydroxyretinal, induziert dadurch dessen Isomerisierung und sorgt somit ebenfalls für die Umwandlung von Rh in MRh (zusammengefasst in Schwemer, 1989). Die Energieübertragung vom Hydroxyretinol auf das Hydroxyretinal erfolgt dabei in Form des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen (zusammengefasst in Hardie, 2012).

### 1.3.4. Die Aktivierung der Phototransduktionskaskade

Die Absorption eines Photons durch den Chromophor des Rhodopsins, 11-cis 3-Hydroxyretinal, induziert eine Isomerisierung des Retinals von der 11-cis zur all-trans Konfiguration. Dies sorgt für eine Konformationsänderung des Opsins und somit für den Übergang des Rhodopsins in seine physiologisch aktive Form, das Metharhodopsin. Dadurch kommt es zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der  $\alpha$ -Untereinheit  $G_q\alpha$  des heterotrimeren G-Proteins  $G_q$ . Die so aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert anschließend von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die Phospholipase  $C_\beta$ . Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat zu Inositol 1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerol (DAG). Am Ende dieser Reaktionen steht schließlich das Öffnen der TRP und TRPL Kanäle durch die es sodann zum Einstrom von Kationen in das Cytoplasma und somit zur Depolarisation der Rezeptorzellen kommt. Bedingt durch die mehr oder weniger hohe Ionenselektivität der Kanäle handelt es sich dabei in erster Linie um einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom.

Wie die Aktivität der Phospholipase  $C_\beta$  letzten Endes zu einer Öffnung der TRP und TRPL Kanäle führt ist momentan noch ungeklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass DAG oder DAG Metabolite, wie beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren, zur Aktivierung der Kanäle führen (Abb. 4).

Um im Anschluss an die Lichtstimulation die ursprünglichen  $Ca^{2+}$  Verhältnisse wiederherzustellen, wird mittels des  $Na^+/Ca^{2+}$  Austauschers CalX  $Ca^{2+}$  wieder aus der Zelle befördert (zusammengefasst in Wang und Montell, 2007).



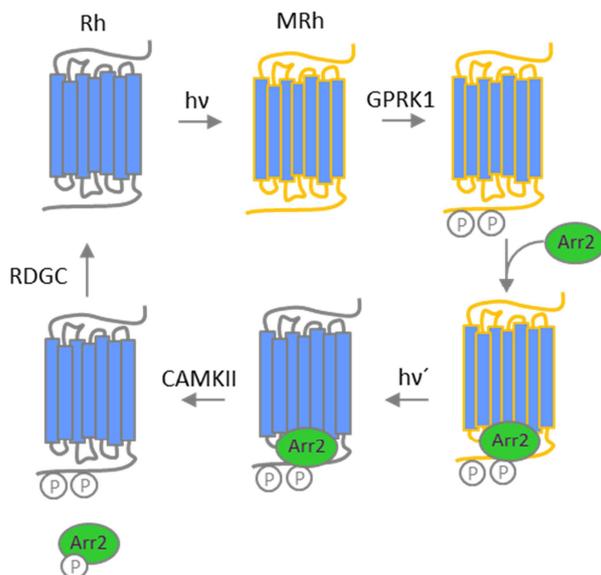
#### Abb. 4: Die Phototransduktionskaskade

Die Absorption eines Photons sorgt für die Umwandlung des Rhodopsins (Rh) ins Metarhodopsin (MRh), wodurch es zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins ( $G_q\alpha$ ) kommt. Nach Abspaltung von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit aktiviert die  $\alpha$ -Untereinheit die Phospholipase  $C_\beta$  (PLC). Diese sorgt sodann für die Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP $_2$ ) in Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Anschließend kommt es möglicherweise durch DAG selbst oder durch DAG Metabolite wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) zur Öffnung der TRP und TRPL Kanäle. Durch deren Öffnung kommt es letztendlich zu einem Kationeneinstrom ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) in die Rezeptorzelle (nach Montell, 1999).

### 1.3.5 Die Inaktivierung der Phototransduktionskaskade

Die Inaktivierung der Phototransduktionskaskade erfolgt allgemein auf mehreren Ebenen die sowohl das Rhodopsin und das G-Protein als auch die TRP und TRPL Kanäle umfassen.

Den wichtigsten Schritt stellt dabei die Deaktivierung des Metarhodopsins dar. Diese wird in erster Linie durch das in den Rezeptorzellen vorhandene Arrestin 2 (Arr2) bewirkt. Im Anschluß an die Photokonversion des Rhodopsins zum Metarhodopsin kommt es zur Phosphorylierung des Metarhodopsins durch die G-Protein gekoppelte Kinase 1, wodurch es bereits zu dessen teilweiser Inaktivierung kommt. Daraufhin bindet Arr2 an das MRh und verhindert so die weitere Aktivierung von G-Proteinen durch das MRh. Durch die darauffolgende Absorption eines Photons wird das inaktivierte MRh wieder in Rh überführt. Anschließend kommt es zur Phosphorylierung von Arr2 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM abhängige Kinase II und zur Dissoziation des Arrestins vom Rhodopsin. Um das Rhodopsin schließlich wieder in die aktivierbare Form zu überführen, wird es letztendlich noch von der Protein Phosphatase RDGC dephosphoryliert (Abb. 5).



**Abb. 5: Inaktivierung des Metarhodopsins und Rückwandlung in Rhodopsin**

Im Anschluß an die Photokonversion von Rhodopsin (Rh) zu Metarhodopsin (MRh) kommt es zur Phosphorylierung des MRh durch die G-Protein gekoppelte Kinase I (GPRK1) und zur Bindung von Arrestin 2 (Arr2). Dadurch wird die weitere Aktivierung von G-Proteinen durch das MRh verhindert. Die Absorption eines zweiten Photons wandelt anschließend das inaktive MRh zurück in inaktives Rh. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung des Arrestins durch die Calmodulin Kinase II (CAMKII) und zu dessen Abspaltung vom Rhodopsin. Erst nach anschließender Dephosphorylierung des Rhodopsins durch RDGC liegt dieses wieder in seiner aktivierbaren Form vor (nach Wang und Montell, 2007).

Neben Arr2 spielen auch der CaM bindende Transkriptionsfaktor dCAMTA und dessen Target dFbx14 eine Rolle bei der Inaktivierung des Rhodopsins (Han *et al.*, 2006). So wird angenommen, dass dFbx14 durch Ubiquitinierung des Rhodopsins eine weitere Aktivierung des G-Proteins verhindert. Die Inaktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins erfolgt durch ihre intrinsische GTPase Aktivität, die die Hydrolyse von GTP zu GDP begünstigt. Katalysiert wird diese durch die hierbei als GAP (GTPase aktivierendes Protein) agierende Phospholipase  $C_{\beta}$ . Die Inaktivierung der TRP Kanäle erfolgt unter anderem mittels der  $Ca^{2+}$  und DAG aktivierten Protein Kinase C (INAC). So trägt INAC durch Phosphorylierung der TRP Kanäle zu deren Deaktivierung bei (zusammengefasst in: Wang und Montell, 2007; Yao *et al.*, 2012).

## 1.4 Cryptochrom und die Lichtperzeption der Komplexaugen

Bei Cryptochrom handelt es um einen im UV-A Bereich und im blauen Spektralbereich sensitiven Photorezeptor (Ozturk *et al.*, 2010). Der Chromophor des Cryptochroms ist das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) (Selby und Sancar, 2012). Die Absorption eines Photons durch den Chromophor bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins, die in den Uhrneuronen schließlich im Abbau des Proteins Timeless, aber auch des Cryptochroms selbst resultiert (Ozturk *et al.*, 2010; Ozturk *et al.*, 2014). Dies sorgt dafür, dass der molekulare Rückkopplungsmechanismus der inneren Uhr zum Erliegen kommt und die Uhr somit neu gestellt wird (Naidoo *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 2006; Peschel *et al.*, 2009).

Neben seiner zentralen Rolle als Lichtrezeptor der inneren Uhr beeinflusst Cryptochrom neueren Untersuchung nach allerdings auch die Lichtperzeption durch die Komplexaugen. So konnte gezeigt werden, dass CRY in den Komplexaugen für die Aufrechterhaltung der in wildtypischen Fliegen gefundenen, circadianen Oszillation im Bewegungssehen nötig ist (Mazzotta *et al.*, 2013). Ob dieser Einfluss von CRY dabei direkt durch Eingreifen in die Phototransduktionskaskade oder indirekt über eine Modifikation der inneren Uhr auf die Bewegungswahrnehmung wirkt ist jedoch unklar. Auch konnte gezeigt werden, dass CRY mit dem in den Rhabdomeren lokalisierten Gerüstprotein der Phototransduktionskaskade INAD interagieren kann (Mazzotta *et al.*, 2013).

## 1.5 Rh7 – ein neues *Drosophila* Opsin?

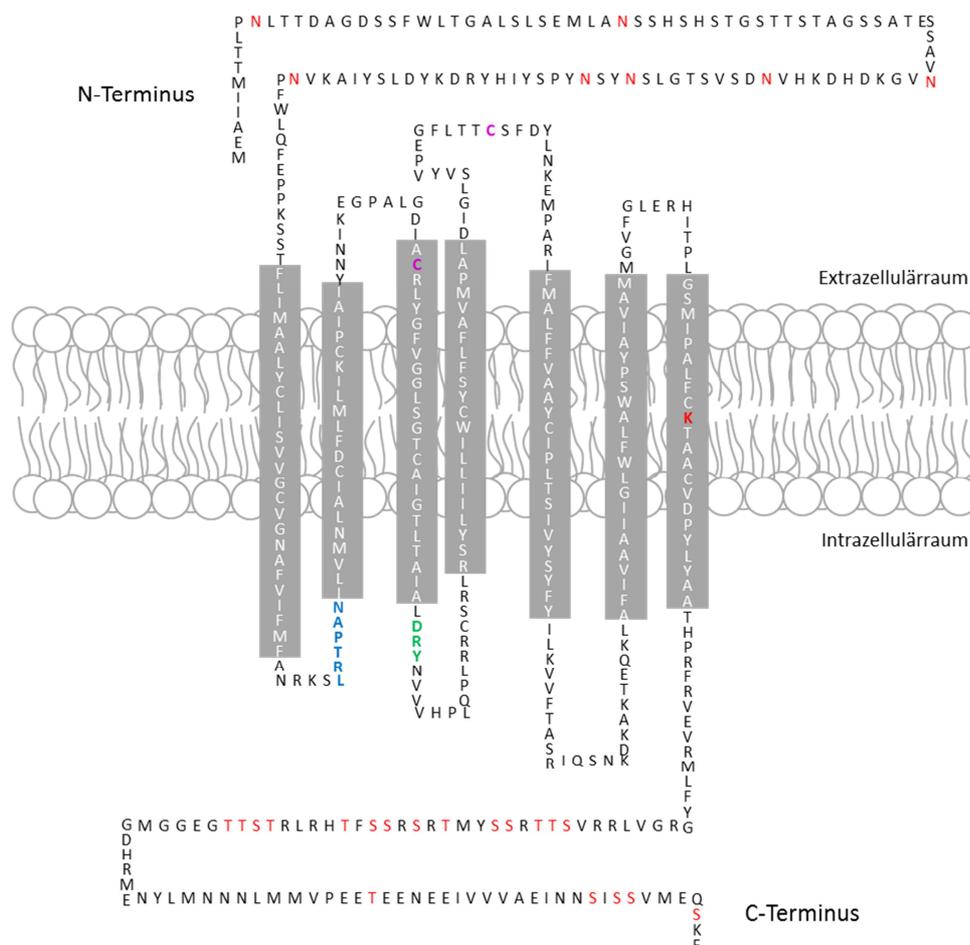
Mit der Entschlüsselung des *Drosophila* Genoms im Jahr 2000 wurde ein bis dato uncharakterisiertes Gen (CG5638) auf dem linken Arm des dritten Chromosoms entdeckt (Adams *et al.*, 2000). Basierend auf Sequenzhomologien, von jeweils mindestens 25%, zu den bereits bekannten *Drosophila* Opsinen wurde dieses Gen als *rh7* bezeichnet (Veleri, 2005).

Das Gen umfasst ca. 11,3kB und besitzt vier Exons, von denen drei für ein 483aa langes Protein mit einem Molekulargewicht von 53,7kDa codieren (Flybase). In der Promotorregion von *rh7* liegt, wie auch bei den anderen *Drosophila* Opsinen, eine TATA Box sowie eine upstream gelegene RCSI (Rhodopsin Conserved Sequence I), die beide für die Transkription des Promotors notwendig sind (Papatsenko *et al.*, 2001).

Eine Untersuchung der Aminosäuresequenz mittels der Predict Protein Software (TU München) ergab, dass es sich entsprechend den Angaben von Flybase bei Rh7 um ein Transmembranprotein mit sieben Transmembrandomänen handelt. Basierend auf der vorgeschlagenen Lage dieser Transmembrandomänen finden sich in der Aminosäuresequenz von Rh7 zudem zahlreiche, bei den *Drosophila* Opsinen konservierte Motive in entsprechenden Abschnitten des Proteins.

Zu diesen zählt das Motiv LRTPXN der ersten cytoplasmatischen Schleife, dessen Aminosäuren Leucin (L) und Asparagin (N) für die Bildung eines funktionellen Rhodopsins nötig sind (Bentrop *et al.*, 1997). In der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife der bisher charakterisierten *Drosophila* Opsine finden sich die wahrscheinlich für die G-Protein Interaktion nötigen Motive DRY und QAKKMNV (Franke *et al.*, 1992). Die einzige Ausnahme bildet Rh3, dem das DRY Motiv der zweiten Schleife fehlt. Rh7 fehlt hingegen das QAKKMNV Motiv der dritten Schleife. In der siebten Transmembrandomäne von Rh7 findet sich wie auch bei anderen Opsinen ein Lysin-Rest, der als mögliche Bindestelle des Chromophors dient (Bownds, 1967). Rhodopsin 7 besitzt außerdem zwei im Bereich der ersten und zweiten extrazellulären Schleife gelegene Cystein Reste, die eventuell für die Stabilisierung des Proteins erforderlich sind (Karnik *et al.*, 1988). Zahlreiche im verlängerten N-Terminus von Rh7 gelegene Asparagin Reste könnten, entsprechend den anderen *Drosophila* Opsinen, als N-Glykosylierungsstellen im Zuge der Proteinreifung dienen (Katanosaka *et al.*, 1998). Die

Serin und Threonin Reste des ebenfalls vergleichsweise langen C-Terminus stellen mögliche Phosphorylierungsstellen des lichtaktivierten Rhodopsin 7 dar (Thompson und Findlay, 1984; Cassill *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2004) (Abb. 6).



### Abb. 6: Hypothetische Struktur von Rhodopsin 7

Rhodopsin 7 besitzt sieben Transmembrandomänen (grau hinterlegt). In der ersten cytoplasmatischen Schleife findet sich das für die Bildung eines funktionellen Rhodopsins nötige Motiv LRTPXN (blau). In der zweiten cytoplasmatischen Schleife liegt das für die G-Protein Interaktion notwendige DRY Motiv. Die beiden Cystein Reste (magenta) dienen möglicherweise der Proteinstabilität. Der Lysin Rest (rot) der siebten Transmembrandomäne stellt eine mögliche Chromophor-Bindestelle dar. Bei den im N- und C-terminalen Bereich liegenden Asparagin (N) und Serin (S)/Threonin (T) (rot) Resten könnte es sich um Phosphorylierungs- bzw. Glycosylierungsstellen handeln.

Allgemein legt diese vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz somit nahe, dass es sich bei Rhodopsin 7 um ein weiteres funktionelles *Drosophila* Opsin handeln könnte. Hierfür fehlt jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt jeglicher experimenteller Beleg.

Die verfügbaren mRNA Expressionsdaten deuten zudem auf eine insgesamt, im Vergleich zu den anderen *Drosophila* Opsinen, sehr geringe Expression von Rh7, mit größten Mengen in Gehirn und Augen, hin (Flybase).

### 1.6 Zielsetzung

Basierend auf dem theoretisch vorhandenen, photorezeptiven Potential sollte geklärt werden, ob Rhodopsin 7 eine Rolle bei der Lichtperzeption von *Drosophila melanogaster* spielt.

Durch die gezielte Expression von Rh7 in den Rezeptorzellen R1-6 des Komplexauges sollte zunächst mittels morphologischer und elektrophysiologischer Methoden untersucht werden, ob Rh7 als Photorezeptor wirken kann.

Des Weiteren sollte eine mögliche endogene Funktion von Rh7 mittels *rh7* Knockout-Fliegen untersucht werden. Aufgrund der Verteilung der anderen Opsine sowie der verfügbaren Expressionsdaten von *rh7* wurde der Fokus dabei auf die Komplexaugen und dementsprechend auf eine Beteiligung von Rh7 an der visuellen Wahrnehmung gelegt.

Durch morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen sollte geklärt werden, ob Rh7 durch strukturelle und/oder funktionelle Veränderungen im Komplexauge die visuelle Wahrnehmung beeinträchtigt. Zudem sollte durch die Untersuchung der optomotorischen Reaktion die mögliche Relevanz von Rh7 für das visuell induzierte Verhalten der Fliege elaboriert werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es die Rolle von Cryptochrom bei der Lichtperzeption der Komplexaugen genauer zu untersuchen. Mittels einer elektrophysiologischen Methode sollte der Einfluss von CRY auf die Phototransduktion näher beleuchtet und charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Aufzucht und Auswahl der Fliegen

Alle Fliegen wurden in Gläschen auf Standard-Nährmedium (0,8% Agar, 2,2% Zuckerrübensirup, 8% Malzextrakt, 1,8% Hefe, 1% Sojamehl, 8% Maismehl, 0,3% 4-Hydroxybenzoesäure) unter einem Licht-Dunkel Wechsel von jeweils 12h bei 18°C oder 25°C und relativer Luftfeuchtigkeit von etwa 60% aufgezogen. Für alle Experimente wurden, sofern nicht anders erwähnt, männliche Fliegen im Alter von 4-7 Tagen verwendet.

### 2.2 Fliegenstämme

Nachfolgend sind die im Zuge der Arbeit verwendeten und hergestellten, stabilen Fliegenstämme aufgelistet (Tab. 2).

| Genotyp                             | Beschreibung  | Referenz/Herkunft                            |
|-------------------------------------|---|--|
| $y^{(+)w}; Rh1-Rh7; +$              | Fliegen ohne Augenpigmentierung ( $w$ ) mit Konstrukt aus <i>ninaE</i><br>Minimalpromotor, codierender Sequenz von <i>rh7</i> und<br><i>ninaE</i> 3' UTR ( <i>Rh1-Rh7</i> ) | Bachleitner, 2008                            |
| $yw; +; +$                          | Kontrolle für $yw; Rh1-Rh7; +$  | Bachleitner, 2008                            |
| $yw; Rh1-Rh7; sr^{1(*)} ninaE^{17}$ | weißäugige Fliegen mit <i>Rh1-Rh7</i> Konstrukt, ohne <i>Rh1</i> ( <i>ninaE</i> <sup>17</sup> )   | vorliegende Arbeit                           |
| $yw; +; sr^1 ninaE^{17}$            | Kontrolle für $yw; Rh1-Rh7; sr^1 ninaE^{17}$  | O'Tousa <i>et al.</i> , 1985/<br>J. Bentreop |
| $yw; +; rh7^0$                      | weißäugige <i>rh7</i> Knockout-Fliegen ( $rh7^0$ )  | Bachleitner, 2008                            |
| $yw; +; +$                          | Kontrolle für $yw; +; rh7^0$  | Bachleitner, 2008                            |
| $yw^+; +; rh7^0$                    | <i>rh7</i> Knockout-Fliegen mit Augenpigmentierung ( $w^+$ )  | Kistenpfennig, 2012                          |

## 2. Material und Methoden

|                                  |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| $yw^+; +; +$                     | Kontrolle für $yw^+; +; rh7^0$  | Kistenpfennig, 2012                              |
| $yw^+; +; rh7^0$                 | $rh7$ Knockout-Fliegen mit Augenpigmentierung, die erneut aus $yw^+; +; rh7^0$ gekreuzt wurden                        | vorliegende Arbeit                               |
| $yw^+; +; +$                     | Kontrolle für $yw^+; +; rh7^0$ , die erneut aus $yw^+; +; +$ gekreuzt wurde   | vorliegende Arbeit                               |
| $+; +; rh7^0 cry^{01}$           | Fliegen ohne Rh7 und Cryptochrom ( $cry^{01}$ )   | Kistenpfennig, 2012                              |
| $yw^+; Sco^{(*)}/CyO; rh7^0$     | $rh7$ Knockout-Fliegen mit Augenpigmentierung und Balancer-Chromosom $CyO$  | Kistenpfennig, 2012                              |
| CantonS                          | Wildtyp   | Lindsley und Grell, 1968/<br>Sammlung des Labors |
| $bw^1$                           | Fliegen mit braunen Augen basierend auf einer Spontanmutation des <i>brown</i> Gens                                   | Lindsley und Grell, 1968/<br>Bloomington # 245   |
| $w^{1118}$                       | Fliegen ohne Augenpigmentierung aufgrund einer Spontanmutation des <i>white</i> Gens                                  | Lindsley und Grell, 1968/<br>Sammlung des Labors |
| $yw^-$                           | Fliegen ohne Augenpigmentierung   | Lindsley und Grell, 1968/<br>Sammlung des Labors |
| $yw^+; Sco^{(*)}/CyO; MKRS/TM6B$ | Fliegen mit Augenpigmentierung und Balancer-Chromosomen $CyO$ , $MKRS$ und $TM6B$                                     | Lindsley und Zimm, 1992/<br>Sammlung des Labors  |
| $+; +; cry^{01}$                 | Fliegen ohne Cryptochrom, die durch mehrfaches Rückkreuzen mit CantonS aus $w^{1118}; +; cry^{01}$ hergestellt wurden | Dolezelova, 2007/<br>Sammlung des Labors         |

(\*) *y*, *sr<sup>1</sup>* und *Sco* sind Marker (Lindsley und Grell, 1968). Das Allel *sr<sup>1</sup>* sorgt zudem für eine Reduzierung der indirekten Flugmuskulatur (Lee *et al.*, 1995)

**Tab. 2: Auflistung der verwendeten und hergestellten, stabilen Fliegenstämme**

## 2.3 Untersuchung der genomischen DNA mittels PCR

### 2.3.1 Extraktion genomischer DNA

Für die DNA Extraktion wurde jeweils eine ganze Fliege in einem Eppendorf Tube in 50µl Squishing Puffer (10mM Tris-HCl pH8,2; 1mM EDTA, 25mM NaCl) und 5µl Proteinase K (2mg/ml) (Sigma Aldrich) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann auf dem Thermoshaker (TS 100, Hartenstein) für 30min bei 56°C inkubiert. Abschließend erfolgte noch

eine Inkubation für 3min bei 93°C, um die Proteinase K zu inaktivieren. Die so erhaltene genomische DNA wurde anschließend sofort für die PCR verwendet.

### 2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zunächst wurden 1µl genomische DNA, 10µl JumpStart REDTaq ReadyMix (Sigma Aldrich) sowie 9µl Primermix (1µM) in einem PCR-Gefäß in den peqSTAR 96 Universal Thermocycler (peqLab) eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Bedingungen der anschließenden PCR wurden wie in Tab. 4 dargestellt festgelegt.

| Zielgen      | Sequenz (5'-3')                  | Herkunft             |
|--------------|----------------------------------|----------------------|
| <i>rh7</i>   | 5': TGCCAATGGCATTGTTTCATCTGAGTG  | Senthilan P          |
|              | 3': CCCCTGTCTAAACATCACATAAGCTC   |                      |
| <i>ninaE</i> | 5': TCTGTATTTTCGAGACCTGGGTGCTC   | Kistenpfennig (2012) |
|              | 3': GACATGAACCAGATGTAGGCAATCTTGC |                      |
| <i>cry</i>   | 5': CGGAGTTGATGAATGTGCC          | Senthilan P          |
|              | 3': GCATGTTTCGCTTTACGG           |                      |

**Tab.3: Sequenzen der PCR Primer**

Die Primer wurden von Pingkalai Senthilan mittels der Software GENTle 1.9.4 (Magnus Manske, Universität Köln) oder von Christa Kistenpfennig (2012) entworfen. Aufgelistet sind die Sequenzen der jeweils verwendeten 3' und 5' Primer, die von Sigma Aldrich oder AGCTLabs bezogen wurden.

| Schritt           | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Anzahl der Durchgänge |
|-------------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| Initialisierung   | 94              | 5           | 1                     |
| Denaturierung     | 94              | 1           |                       |
| Anlagerung        | 63              | 1           | 30                    |
| Elongation        | 72              | 1           |                       |
| Finale Elongation | 72              | 5           | 1                     |
| Kühlung           | 4               | n.b.        | 1                     |

**Tab. 4: Einzelschritte der PCR inklusive Temperatur, Dauer und Anzahl der Durchgänge**

### 2.3.3 Gelelektrophorese

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde zunächst peqGOLD universal Agarose (peqlab) in Tris Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (0,5x) (Sigma Aldrich) gelöst. Um die amplifizierten DNA Fragmente später sichtbar zu machen, wurde dem Gel noch Midori Green Advance (0,05 µl/ml) (Nippon Genetics Europe) zugefügt. Nach Aushärten des Gels wurden je 10µl eines PCR Produkts pro Gelkammer eingesetzt. Als DNA-Leiter diente der GeneRuler 1kb Ladder (Fermentas). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (0,5x) verwendet.

Die Aufnahme der Gele erfolgte unter UV-Licht mittels des Geldokumentationssystems E-BOX VX2 (peqLab). Die Bildbearbeitung erfolgte in Powerpoint 2010 (Microsoft) und GIMP 2.8.6 (Kimball and Mattis).

## 2.4 Bestimmung der mRNA Level mittels qPCR

### 2.4.1 RNA Extraktion

Die RNA Isolierung erfolgte mittels des Quick-RNA Micro Prep Kit von Zymo Research. Pro Ansatz wurden zunächst 5 Köpfe eines Genotyps in 300µl RNA Lysis-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 1min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt. Nach Zugabe von 300µl Ethanol wurden die Flüssigkeiten gemischt und auf eine Säule übertragen. Diese wurde für 30s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurden, jeweils gefolgt von 30-sekündiger Zentrifugation und dem Verwerfen des Durchflusses, nacheinander RNA Prep Puffer (400µl) und RNA Wash Puffer (700µl) auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zugabe von 400µl RNA Wash Puffer und 2 minütiger Zentrifugation wurde die Säule in ein neues Eppendorf Tube gegeben. Schließlich wurde DNase und RNase freies Wasser (8µl) auf die Säule gegeben und nochmals für 30s zentrifugiert. Der so erhaltene Durchfluss enthielt nun die zu isolierende RNA. Alle Zentrifugation wurden bei 14000g mit der Mikrozentrifuge Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

### 2.4.2 Herstellung von cDNA

Um eine zuvor extrahierte RNA in cDNA zu überschreiben, wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet.

Zunächst wurden 6µl des zuvor im Zuge der RNA Extraktion gewonnen Durchflusses mit 1µl gDNA Wipeout Puffer gemischt. Die Lösung wurde dann für jeweils 2min bei 42°C und anschließend bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 3µl Master Mix, bestehend aus 2µl Quantiscript RT Puffer, 0,5µl RT Primer Mix und 0,5µl Quantiscript Reverse Transcriptase zugegeben. Nach Inkubation für 30min bei 42°C, 3min bei 95°C und 2min bei 4°C wurden der Lösung 40µl DNase und RNase freies Wasser hinzugefügt. Die so gewonnene cDNA wurde entweder sofort für die qPCR weiter verwendet oder bis zur Verwendung eingefroren.

### 2.4.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für den Ansatz der quantitativen real-time PCR wurde das SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline) verwendet.

Allgemein wurde beim Pipettieren der Ansätze versucht die Anzahl der Schritte so klein wie möglich zu halten, um den Fehler beim Pipettieren zu reduzieren. Zur Berücksichtigung des verbleibenden Pipettierfehlers wurden zudem stets drei Replikate eines Ansatzes pipettiert und für die qPCR verwendet. Final befanden sich in jedem Ansatz 10µl SensiFAST SYBR No-ROX Mix (2x), 7µl DNase und RNase freies Wasser, 2µl Primermix (1µM) sowie 1µl der zuvor hergestellten cDNA. Die Sequenzen der Primer sind in Tab. 5 gezeigt. Die anschließende real-time PCR wurde mit dem Rotor-Gene Q (Qiagen) unter den in Tab. 6 gezeigten Bedingungen durchgeführt.

| Zielgen          | Sequenz (5'-3')                 | Herkunft             |
|------------------|---------------------------------|----------------------|
| <i>rh7</i>       | 5': GACAAGCACGTGAATGACAGCGTTTC  | Kistenpfennig (2012) |
|                  | 3': TCCCACCACCGAAATCAGGCAATACAG |                      |
| <i>α-tubulin</i> | 5': CAACGAGGCTATCTACGACATCTGCC  | vorliegende Arbeit   |
|                  | 3': GAATCGCAGAGAGGCGGTAATCGA    |                      |

**Tab. 5: Sequenzen der qPCR Primer**

Die *α-tubulin* Primer wurden mit der Software GENTle 1.9.4 (Magnus Manske, Universität Köln, 2003) entworfen. Gezeigt sind die Sequenzen der jeweils verwendeten 3' und 5' Primer (Sigma Aldrich, AGCT Labs).

| Schritt              | Temperatur (°C) | Dauer (s) | Anzahl der Durchgänge |
|----------------------|-----------------|-----------|-----------------------|
| Initialisierung      | 95              | 120       | 1                     |
| Denaturierung        | 95              | 5         | 45                    |
| Anlagerung           | 63              | 10        |                       |
| Elongation           | 72              | 15        |                       |
| Finale Denaturierung | 70-95           | 215       | 1                     |

**Tab. 6: Einzelschritte der quantitativen real-time PCR inklusive Temperatur, Dauer und Anzahl der Durchgänge**

Für die Auswertung des im Zuge der real-time PCR entstandenen Fluoreszenzsignals wurde zunächst mit Hilfe der Rotor-Gene Q Software (Qiagen) für jeden Ansatz der Zyklus ( $C_t$ ) bestimmt bei dem ein zuvor festgelegter Fluoreszenzschwellenwert erreicht wurde. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass er im Bereich der exponentiellen Phase der Amplifikation lag. Anschließend wurden in Excel 2010 (Microsoft) die  $C_t$  Werte der drei Replikate eines Ansatzes gemittelt. Daraufhin wurden die gemittelten  $C_t$  Werte des Zielgen-Templates von den zugehörigen, gemittelten  $C_t$  Werten des Haushaltsgen-Templates subtrahiert. Aus den so erhaltenen  $\Delta C_t$  Werten wurde über  $2^{-\Delta C_t}$  schließlich die Template Menge des Zielgens relativ zum Haushaltsgen bestimmt.

## 2.5 Aufnahmen der tiefen Pseudopupille und der Komplexaugen

Nach leichter Betäubung mit CO<sub>2</sub> wurden die Fliegen mit Hilfe eines drei Komponenten Klebers (Protemp II, 3M ESPE) auf einem Objektträger fixiert. Der Kopf der Fliege wurde dabei so orientiert, dass stets das linke Auge nach oben zeigte. Die so fixierten Fliegen wurden dann in der Objektebene des Stereomikroskops (Leica M165 FC, Leica) plaziert. Für die Fotografien der Komplexaugen wurde das Objektiv Planapo 0,63x (Leica) bei 6,3x Zoom (n.A. < 0,096) verwendet. Für die Aufnahmen der Pseudopupillen wurde das Objektiv Planapo 1,6x (Leica) bei 12x Zoom (n.A. = 0,24) verwendet. Zur Belichtung diente Weißlicht einer Kaltlichtquelle (KL 1500 LED *plus*, Leica). Bei allen Aufnahmen wurde auf eine identische Orientierung und Entfernung des Auges zu der bzw. von der Lichtquelle geachtet. Die Belichtung erfolgte orthodrom.

Für die Aufnahmen der tiefen Pseudopupille wurde eine Ebene etwas unterhalb der Augenoberfläche, in der die Pseudopupille möglichst scharf zu sehen war, fokussiert. Bei Fliegen bei denen bedingt durch Mutationen die Rhabdomere der äußeren Rezeptorzellen degenerieren, wurde die Ebene fokussiert, in der das virtuelle Bild der Rhabdomere von Rezeptorzelle 7 und 8 möglichst scharf zu sehen war. Für die Aufnahmen der Komplexaugen wurde die Augenoberfläche fokussiert.

Die Fotografien wurden mit einer auf dem Mikroskop angebrachten Digitalkamera (Leica DFC, Leica) aufgenommen und mittels der Software LAS V4.2 (Leica) auf dem Computer dargestellt. Abschließend wurden mit den Programmen GIMP 2.8.6 (Kimball und Mattis) und Powerpoint 2010 (Microsoft) Bildausschnitt, Größe sowie Helligkeit und Kontrast der Fotos angepasst.

## 2.6 Untersuchung der Augenpigmentierung

### 2.6.1 Extraktion der Pigmente

Die Extraktion der Pigmente wurde analog zu Eng Ooi *et al.* (1997) durchgeführt.

Zur Isolierung der roten Pteridine wurden jeweils acht Fliegenköpfe in 0,4ml AEA (30%iger Ethanol, dessen pH Wert durch Zugabe von HCl auf pH = 2 gesenkt wurde) gegeben und bei Raumtemperatur für 22h auf dem Mini-Rotator (PRS-22, Hartenstein) gewaschen. Anschließend wurde die Lösung für die Messung im Spektrophotometer verwendet. Als Leerprobe diente AEA, das ebenfalls für 22h bei Raumtemperatur in den Rotator eingesetzt wurde.

Für die Extraktion der braunen Ommochrome wurden zunächst jeweils 18 Fliegenköpfe in 0,15ml 2M HCl homogenisiert. Nach Zugabe von 1mg Natriumdisulfit und 0,2ml n-Butanol wurde das Homogenat bei Raumtemperatur für 30min auf dem Mini-Rotator gewaschen und daraufhin für 5 min bei 4000g in der Mikrozentrifuge (Fresco 21, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Im Anschluß wurde die organische Schicht entnommen und nach Zugabe von 0,15ml 0,66%igem Natriumdisulfit erneut für 30min auf dem Rotator gewaschen und 5min bei 4000g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Die organische Schicht wurde schließlich für die Bestimmung des braunen Pigmentgehalts im Spektrophotometer verwendet. Zusätzlich wurde nur mit 0,15ml 2M HCl das obige Protokoll durchlaufen und diese schließlich als Leerprobe für die spätere Messung verwendet.

### 2.6.2 Quantifizierung des Pigmentgehalts

Die Bestimmung der Pigmentmenge erfolgte durch Messung des Absorptionsspektrums der in Lösung befindlichen roten bzw. braunen Pigmente im NanoDROP 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Die Aufzeichnung der Absorptionsspektren erfolgte mit Hilfe der UV-VIS Anwendung der Software NanoDROP 2000/2000c (Version 1.5). Die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge ist dabei gegeben durch  $\log(I_0/I)$ , wobei  $I_0$  die Intensität des von der Leerprobe transmittierten Lichts und  $I$  die Intensität des von der Pigmentlösung transmittierten Lichts bei der betreffenden Wellenlänge darstellt. Der Messbereich wurde auf 350–700nm mit einer Schrittweite von 10nm festgelegt. Als Referenzwellenlänge zur Korrektur der Grundlinie des Absorptionsspektrums wurde 700nm

gewählt. Für alle Messungen wurden je 2µl auf den Sockel des NanoDROP aufgetragen. Die abschließende graphische Darstellung der Daten erfolgte in Excel 2010 (Microsoft).

## 2.7 Antikörperfärbung der Retinas

Die Präparation und Färbung der Retinas adulter Fliegen erfolgte in Anlehnung an Hsiao *et al.* (2012).

### 2.7.1 Präparation und Immunhistochemie

Die Retinas wurden unfixiert in kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH = 7,4) (Sigma Aldrich) präpariert und anschließend auf Eis in PBS gelagert. Nach einer maximalen Aufbewahrungszeit von 15min wurden die Retinas zur Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) (Affymetrics) in PBS überführt und für 15min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Fixativ durch PBST (0,5% Triton X-100 in PBS) (pH = 7,4) (Roth) ersetzt. Die Retinas wurden zweimal mit PBST gespült und schließlich für 30min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in PBST gewaschen. Daraufhin wurde die Lamina vorsichtig entfernt und die Retinas wurden für 20min bei Raumtemperatur in 5% Normal Goat Serum (NGS) (Sigma Aldrich) in PBST geblockt. Im Anschluss wurden die Retinas für zwei Tage auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in der primären Antikörperlösung inkubiert. Die primäre Antikörperlösung enthielt neben 5% NGS, 0,02% NaN<sub>3</sub> und PBST, die primären Antikörper mouse anti-Rh1 (4C5-s, Developmental Studies Hybridoma Bank) und rabbit anti-RDHB (zur Verfügung gestellt von Craig Montell, University of California, Santa Barbara) in den Verdünnungen 1:50 bzw. 1:100. Anschließend wurden die Retinas drei Mal mit PBST gespült und in PBST für mehrere Stunden gewaschen. Schließlich erfolgte die Inkubation der Retinas in der sekundären Antikörperlösung über Nacht auf dem Schüttler. Entsprechend der primären Antikörper wurden für die sekundäre Antikörperlösung neben 5% NGS und PBST

die sekundären Antikörper Alexa Fluor 635 (goat anti-mouse, Invitrogen) und Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit, Invitrogen) verwendet. Am nächsten Tag wurden die Retinas erneut dreimal mit PBST gespült und abschließend nochmals für mehrere Stunden in PBST auf dem Schüttler gewaschen.

Vor dem Einbetten der Retinas wurden zunächst „Abstandhalter“ auf dem Objektträger angebracht. Dazu wurden auf die Fläche des Objektträgers zwei Deckgläschen im Abstand von ca. 5mm geklebt. In dem so erzeugten Spalt wurden sodann die Retinas in Vectashield (Vector Laboratories) eingebettet. Die Retinas wurden dabei so orientiert, dass die Cornea nach unten, Richtung Objektträger, orientiert war und die Retinas somit später unter dem Mikroskop antidrom belichtet wurden.

### 2.7.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Betrachtung und Aufnahme der Antikörperfärbungen erfolgte unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SPE mit Leica DM 5500 Q Mikroskop, Leica) mittels der Software LAS AF (Leica). Um die Lokalisation der Antikörper sichtbar zu machen, wurden entsprechend der Absorptionsmaxima der sekundären Antikörper zur Anregung Laser mit Emissionsmaxima bei 488nm bzw. 635nm verwendet. Mit diesen wurden verschiedene Objektebenen im Abstand von 1,98µm nacheinander gescannt. Abschließend wurde in LAS AF Lite (Version 2.6.3, Leica) und GIMP 2.8.6 (Kimball und Mattis) der Bildausschnitt sowie Kontrast und Helligkeit der so gewonnenen Bilder angepasst.

## 2.8 Paraffin Schnitte

### 2.8.1 Anfertigung der Schnitte

Zur Anfertigung der Paraffin Schnitte wurde die Kragentechnik von Heisenberg und Böhl (1979) verwendet. Dabei wurden die Fliegen zunächst nach Betäubung mit Äther vorsichtig

mit dem Hals in den Schlitz eines Kragens eingeführt. Pro Kragen wurden maximal 12 Fliegen nebeneinander aufgereiht, wobei auf eine gleiche Orientierung der Köpfe geachtet wurde. Zur Trennung von Genotypen wurde eine augenlose Fliege (*sine oculis*) eingeführt. Anschließend wurden die Fliegen für 3,5-4h in Carnoy-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach darauffolgender Dehydrierung für 2mal 30min in 99%igem Ethanol und für eine Stunde in 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur wurden die Fliegen über Nacht in Methylbenzoat, ebenfalls bei Raumtemperatur, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Fliegen im Wärmeschrank bei 60°C zuerst für 1h in 50% Paraffin in Methylbenzoat überführt und sodann 8mal für 20min in jeweils frischem Paraffin inkubiert.

Zur Einbettung wurden mit Hilfe einer Gussform die Köpfe der Fliegen mit 60°C warmem Paraffin übergossen. Im Anschluss an dessen Aushärtung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica VT1000 S, Leica) 7µm dünne Serienschnitte in der Frontalebene der Fliegenköpfe angefertigt und diese dann vorsichtig auf Objektträger transferiert. Dort wurden die Schnitte in 45°C warmem Wasser kurz gestreckt und danach bei Raumtemperatur in staubfreier Umgebung getrocknet. Nach Entfernung des Paraffins durch zweimalige Inkubation für je 30min in Xylol wurden die Schnitte abschließend in Entellan eingebettet.

## 2.8.2 Fotografie

Zur Fotografie der Schnitte wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DMR (Leica) verwendet. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung des Objektivs PL FLUOTAR (40x/0,7) (Leica) mittels der auf dem Mikroskop angebrachten Kamera (DP20-5E, Olympus) bei Durchlicht im Hellfeld gemacht. Die Anpassung von Helligkeit, Kontrast und Bildausschnitt erfolgte in GIMP 2.8.6 (Kimball und Mattis) und Powerpoint 2010 (Microsoft).

## 2.9 Messung der lichtabhängigen Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin

### 2.9.1 Präparation der Fliegen und Aufzeichnung der Konversion

Nach leichter Betäubung mit CO<sub>2</sub> wurden die Fliegen mit Hilfe eines drei Komponenten Klebers (Protemp II, 3M ESPE) auf einem Objektträger fixiert. Der Kopf der Fliege wurde dabei so orientiert, dass stets das linke Auge nach oben zeigte. Die so fixierten Fliegen wurden dann in der Objektebene des Fluoreszenzmikroskops Leica DMR (Leica) plaziert. Als Objektiv diente das HC PL FLUOTAR (Leica) mit 10x Vergrößerung und einer numerischen Apertur von n.A. = 0,3. Die Belichtung der Komplexaugen erfolgte orthodrom mittels der Hg-Lampe des Fluoreszenzmoduls. Um die spektrale Zusammensetzung des Anregungslichts sowie die des Emissionslichts zu modifizieren, wurden der Filterwürfel A (Anregungsfilter: BP 340-380; dichromatischer Spiegel: 400; Emissionsfilter: LP 425, Leica) sowie der Filterwürfel TX2 (Anregungsfilter: BP 560/40; dichromatischer Spiegel: 595; Emissionsfilter: BP 645/75, Leica) je nach Bedarf in den Strahlengang der Hg-Lampe eingebracht. Zunächst wurde kurzzeitig unter Verwendung des Filterwürfels TX2 das im Auge vorhandene MRh durch Grünlicht zur Lichtemission angeregt und unter Betrachtung der langwelligen Emission des MRh die tiefe Pseudopupille fokussiert. Im Anschluß wurde der Filterwürfel A in den Strahlengang gebracht und das Auge für 2min mit UV-Licht belichtet, um das Rh/MRh Gleichgewicht möglichst weit in Richtung MRh zu verschieben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Belichtung durch Verschluss einer Blende für 1min unterbunden. Während dieser Zeit wurde der Filterwürfel TX2 in den Strahlengang gebracht. Anschließend wurde die Blende geöffnet und das Auge für 2min mit Grünlicht, das das Rh/MRh Gleichgewicht wieder in Richtung Rh verschiebt, belichtet und die langwellige Emission des MRhs in der Pseudopupille aufgenommen. Zur Aufnahme wurden über 2min hinweg mit der auf dem Mikroskop angebrachten Kamera (DP20-5E, Olympus) im Zeitintervall von je 10s Fotos bei einer Belichtungszeit von 1s gemacht. Das erste Foto wurde jedoch nicht bei t = 0s sondern bei t = 2s gemacht.

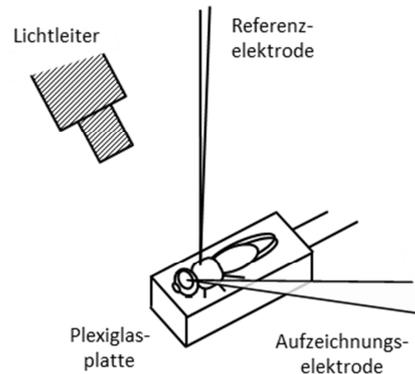
## 2.9.2 Auswertung

Um die Intensität der MRh Fluoreszenz auf den Fotografien der Pseudopupille zu bestimmen, wurde die Software Fiji (<http://fiji.sc/>) verwendet. Mit Hilfe des „Freihand-Tools“ wurde die Pseudopupille auf jedem Foto zunächst möglichst genau umrandet und die Gesamtintensität innerhalb der so erzeugten Fläche in Graustufenwerten gemessen. Der Graustufenwert pro Flächeneinheit (Pixel) ist dabei gegeben durch den Mittelwert aus den R-, G- und B-Werten pro Flächeneinheit (Pixel). Zusätzlich wurde mit der gleichen Fläche in drei Bereichen des Auges, außerhalb der Pseudopupille, ebenfalls die jeweilige Gesamtintensität gemessen. Anschließend wurden in Excel 2010 (Microsoft) die Intensitätswerte der Augenfläche gemittelt und vom Intensitätswert der Pseudopupille subtrahiert, um so die Intensität der MRh Fluoreszenz zu erhalten.

## 2.10 Aufnahme von Elektoretinogrammen (ERGs), Bestimmung der Intensitäts-Response Kurven (IRCs) und der Aktionsspektren

### 2.10.1 Präparation der Fliegen und Elektoretinogramm Registrierung

Nach leichter CO<sub>2</sub> Betäubung wurden die Fliegen zunächst unter Verwendung des drei Komponenten Klebers PROTEMP II (3M ESPE) mit ihrer Ventralseite nach unten auf einer kleinen Plexiglasplatte fixiert. Dabei wurden Kopf, Körper, Flügel und Beine so angeklebt, dass die Atembewegungen der Fliege möglichst nicht beeinträchtigt wurden. Der Kopf wurde zudem so gedreht, dass stets das linke Auge zur ERG Aufnahme leicht nach oben orientiert war. Anschließend wurden die so fixierten Fliegen in der Objektebene eines Stereomikroskops plaziert. Ein chlorierter Silberdraht ( $d = 0.38\text{mm}$ ) wurde als Referenzelektrode in den Thorax der Fliege eingestochen und eine mit Insekten-Ringer (0,9% NaCl, 0,02% KCl, 0,025% CaCl, 0,4% Glucose in *aq. dest.*) gefüllte Glaselektrode als Aufzeichnungselektrode auf das Komplexauge der Fliege aufgesetzt (Abb. 7).



**Abb. 7: Anordnung von Lichtleiter sowie Referenz- und Aufzeichnungselektrode zur ERG Registrierung**

Die Fliegen wurden auf einer kleinen Plexiglasplatte fixiert und in der Objektebene eines Stereomikroskops platziert. Dort wurde die Referenzelektrode in den Thorax eingestochen, die Aufzeichnungselektrode auf das Komplexauge gesetzt und der Lichtleiter über der Fliege positioniert.

Die Glaselektroden wurden mit einem DMZ Puller (Zeitz Instruments) aus Borosilikatglas Kapillaren mit Filament (Science Products) hergestellt. Das Mikroskop sowie die Referenz- und Aufzeichnungselektrode befanden sich in einem Faraday'schen Käfig, der dazu diente das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Die Spannungssignale wurden zunächst mit dem Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems) 10x vorverstärkt und anschließend mit einem selbst gefertigten Differentialverstärker noch 50x weiter verstärkt. Beide Verstärker wurden im DC Modus betrieben. Die verstärkten Signale wurden sodann sowohl auf einem digitalen Oszilloskop (HP 54600A, Hewlett Packard) wiedergegeben als auch über das DS1M12 Pocketscope (Meilhaus Electronic) unter Verwendung der zugehörigen Software EasyLogger auf dem PC. Das Abtastintervall des Signals betrug 3ms. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Raumtemperatur von 20°C.

### 2.10.2 Belichtung der Komplexaugen

Zur Belichtung der Komplexaugen wurden zwei separate Strahlengänge aufgebaut.

Als Lichtquelle wurde jeweils eine Halogenlampe (Spindler & Hoyer und Leitz) verwendet. Deren Licht passierte zunächst jeweils einen KG Wärmeschutzfilter (Schott), einen Filterhalter

sowie eine elektronische Blende (von Melles Griot bzw. selbst gefertigt) bevor es jeweils mit Hilfe einer plankonvexen Linse (LOT Oriel) auf das eine Ende eines doppelarmigen Lichtleiters (LOT Oriel) fokussiert und so zur Fliege geleitet wurde. Lichtleiter und Linsen bestanden aus Quarzglas. Der Wärmeschutzfilter diente dazu die Erwärmung des Untersuchungsobjekts im Verlauf der Belichtung zu reduzieren. Mit Hilfe der elektronischen Blende konnte die Dauer der Belichtung eingestellt werden. Der zum Öffnen der Blende nötige Spannungspuls wurde mittels eines Tastkopfs (TT-LF, Testtec) ebenfalls über das DS1M12 Pocketscope mittels der Software Easy Logger parallel zum ERG aufgezeichnet. Die zeitliche Verzögerung zwischen Beginn des Spannungspulses und Öffnen der Blende sowie Ende des Spannungspulses und Blendenverschluß wurde mittels einer zwischen Linse und Lichtleiter eingebrachten Photodiode ermittelt, um so aus der zeitlichen Lage des Spannungspulses möglichst genau die zeitliche Lage des Lichtpulses zum ERG zu bestimmen.

Die spektrale Zusammensetzung des Lichts wurde im sichtbaren Bereich mit Farbfiltern (Schott) verändert. Zur Realisierung von UV-Licht wurde eine der beiden Halogenlampen durch eine im UV-Bereich emittierende LED (Roithner) ersetzt und der KG-Filter aus dem Strahlengang entfernt. Zur Modifikation der Lichtintensität wurden Neutraldichtefilter (Edmund Optics und Schott) unterschiedlicher Transmission verwendet. Wurden diese zusammen mit einem Farbfilter bzw. der LED verwendet, so wurden jeweils die Transmissionswerte der Graufilter neu bestimmt. Bei Kombinationen von Neutraldichtefiltern wurden die Transmissionen als additiv behandelt. Die Bestimmung der Lichtintensität erfolgte ohne Neutraldichtefilter möglichst genau am Ort der Fliege mit Hilfe des Spektrometers QE6500 (Ocean Optics).

### 2.10.3 Bestimmung der Intensitäts-Response Kurven

Sofern nicht anders erwähnt wurden die Fliegen nach Plazierung der Elektroden und Positionierung des Lichtleiters zunächst dunkeladaptiert. Anschließend erfolgte die Belichtung zur Minimierung von Adaptationseffekten beginnend mit der niedrigsten Lichtintensität. Die Dauer der Lichtpulse sowie deren zeitlicher Abstand wurden dabei vor

Experimentbeginn festgelegt. Bei der Verwendung von Farblicht wurde zudem vor jedem Farblichtpuls ein Weißlichtpuls oder Orangelichtpuls konstanter Intensität verabreicht, um das Rh/MRh Verhältnis im Verlauf der Belichtung möglichst konstant zu halten oder wieder in Richtung Rh zu verschieben. Verschiedene Genotypen wurden stets alternierend gemessen, um systematische Einflüsse auf die Messung zu eliminieren. Um schließlich die Intensitäts-Response Kurven der Rezeptorpotentialamplitude zu erhalten, wurde aufgrund des bestehenden sigmoidalen Zusammenhangs die Amplitude des ERG Rezeptorpotentials gegen den dekadischen Logarithmus der zugehörigen Lichtintensität aufgetragen (Belusic, 2011). Die Amplitude des Rezeptorpotentials entspricht der Differenz zwischen der Grundlinie unmittelbar vor Licht an und der Depolarisation im ERG unmittelbar vor Einsetzen des „Off-Transients“. Für die Intensitäts-Response Kurven des Nachpotentials wurde die 4s nach Ende des Lichtpulses noch im ERG vorhandene Depolarisation relativ zur Grundlinie im ERG vor Licht an gemessen und ebenfalls gegen den dekadischen Logarithmus der zugehörigen Lichtintensität aufgetragen. Die Ausmessung der ERG Rezeptorpotentialamplitude und der 4s nach Pulsende vorhandenen Depolarisation erfolgte mit dem Programm EasyLogger.

### 2.10.4 Bestimmung der Aktionsspektren

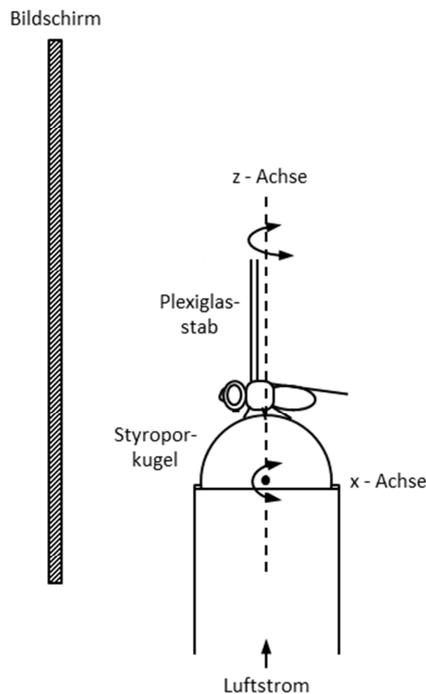
Zunächst wurden die IRCs für die Amplitude des Rezeptorpotentials bei Farblicht unterschiedlicher Wellenlänge im Bereich von 370-648nm bestimmt. Daraufhin wurde manuell für jede Kurve die Intensität in Photonen/s cm<sup>2</sup> bestimmt, die bei der jeweiligen Wellenlänge nötig war, um eine Rezeptorpotentialamplitude von 5mV auszulösen. Anschließend wurde als Maß für die Empfindlichkeit der Kehrwert dieser Intensitätswerte gebildet und gegen die jeweilige Wellenlänge aufgetragen.

## 2.11 Optomotorische Reaktion

### 2.11.1 Registrierung der Laufbewegung

Für die Messung der optomotorischen Reaktion wurde ein Aufbau von Reinhard Wolf (Rudolf-Virchow Zentrum, Universität Würzburg) verwendet. Nach leichter Betäubung mit CO<sub>2</sub> wurde zunächst mit Hilfe des lichthärtenden Klebers Sinfony (3M ESPE) ein kurzer zylindrischer Plexiglasstab (Durchmesser ca. 1mm, Länge ca. 10mm) dorsal am Thorax der Fliegen befestigt. Zur Aushärtung des Klebers wurde die Polymerisationslampe LED.B (Woodpecker) verwendet. Im Anschluss wurden die Fliegen mit Hilfe des Plexiglasstabs in fester Orientierung auf eine frei drehbare Styroporkugel (Durchmesser ca. 7mm) gesetzt und vor einem Computerbildschirm, auf dem der visuelle Stimulus dargeboten wurde, plaziert. Ein leichter Luftstrom diente dazu die Rollreibung der Kugel zu reduzieren und so das Rollen der Kugel durch die auf ihr laufende Fliege zu erleichtern. Rotationen der Kugel um ihre x-Achse stellen Laufbewegungen zum Mustern hin bzw. vom Muster weg dar. Rotationen der Kugel um ihre z-Achse repräsentieren Laufbewegungen in oder entgegen der Bewegungsrichtung der Streifen (Abb. 8).

Die Messung der Kugelrotation erfolgte durch Bestimmung der zeitlichen Veränderung eines Interferenzmusters, das durch Reflexion des Lichts einer Laserdiode auf der Styroporkugeloberfläche erzeugt wurde. Für die Registrierung des Interferenzmusters wurde der optische Sensor einer Computermaus verwendet.



**Abb. 8: Versuchsanordnung zur Registrierung der optomotorischen Reaktion**

Mittels eines Plexiglasstabs wurden die Fliegen auf einer Styroporkugel plaziert. Zur Reduktion der Rollreibung wurde die Kugel durch einen Luftstrom unterstützt. Auf dem Bildschirm wurden in cw und ccw Richtung laufende Streifenmuster unterschiedlichen Kontrasts präsentiert. Rotationen der Kugel um die x-Achse repräsentieren Laufbewegungen der Fliege auf den Bildschirm zu bzw. von ihm weg. Rotationen der Kugel um ihre z-Achse werden durch Laufbewegungen der Fliege in oder entgegen der Richtung der Streifenbewegung verursacht. (nach Buchner, 1976)

### 2.11.2 Visueller Stimulus

Als visueller Reiz wurde ein zweifarbiges, vertikales Streifenmuster verwendet. Die Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  des Streifenmusters betrug  $18^\circ/\text{s}$ . Die Musterwellenlänge  $\lambda$ , d.h. der Winkel unter dem die Breite eines Doppelstreifens am Ort der Fliege gesehen wird, wurde auf  $18^\circ$  festgelegt. Die daraus resultierende Bildwechselfrequenz hatte somit einen konstanten Wert von  $f = \omega/\lambda = 1\text{Hz}$ .

Als Streifenfarben wurden nur Grautöne sowie Schwarz und Weiß verwendet. Diese wurden durch Angabe der RGB Werte (Rot, Grün, Blau) festgelegt. Der Kontrast des Musters wurde

mit  $c = \Delta I / \bar{I} = (I_{s1} - I_{s2}) / (I_{s1} + I_{s2})$  berechnet.  $I_{s1}$  und  $I_{s2}$  bezeichnen dabei jeweils den mittleren RGB Wert von Streifen 1 und 2. Da im Zuge dieser Arbeit die Abhängigkeit der Wendereaktion der Fliege vom Musterkontrast untersucht werden sollte, wurden von einer Fliege nacheinander mehrere Streifenmuster unterschiedlichen Kontrastes, mit gleichem RGB Mittelwert  $\bar{I}/2$ , durchlaufen. Um dabei mögliche systematische Asymmetrien sowie Asymmetrien in der Bewegung der Fliege zu eliminieren, wurde jedes Streifenmuster sowohl mit Rotation im Uhrzeigersinn (cw), als auch im Gegenuhrzeigersinn (ccw) präsentiert. Zur Berücksichtigung unterschiedlicher Laufaktivitäten erfolgte ein Wechsel der Musterbedingungen erst nachdem die Fliege eine zuvor festgelegte Laufstrecke auf das Streifenmuster zu zurückgelegt hatte.

### 2.11.3 Quantifizierung der Wendereaktion

Zur Quantifizierung der Nachfolgereaktion wurden nur Fliegen verwendet, die sämtliche Streifenmuster mindestens 50mal durchlaufen hatten. Anschließend wurde für jedes präsentierte Streifenmuster eines bestimmten Kontrastes die optomotorische Reaktion R der Fliege gemäß folgender Formel in Excel 2010 (Microsoft) ermittelt:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{E_z(l)_i}{E_x(l)_i} - \sum_{i=1}^n \frac{E_z(r)_i}{E_x(r)_i}}{2n}$$

**Abb. 9: Formel zur Berechnung der optomotorischen Reaktion R**

Die in der Formel aufgeführten Größen sind gegeben durch:  $n$  = Anzahl der Durchläufe eines Streifenmusters (in cw und ccw Richtung),  $E_z(l)_i$  = vom Sensor detektierte Counts durch Rotation des Balls um seine z-Achse bei nach links (ccw) laufendem Streifenmuster,  $E_x(l)_i$  = detektierte Counts durch Rotation des Balls um seine x-Achse bei nach links (cw) laufendem Streifenmuster,  $E_z(r)_i$  = detektierte Counts durch Rotation des Balls um seine z-Achse bei nach rechts (cw) laufendem Streifenmuster,  $E_x(r)_i$  = detektierte Counts durch Rotation des Balls um seine x-Achse bei nach rechts (cw) laufendem Streifenmuster.

## 2.12 Statistische Analyse

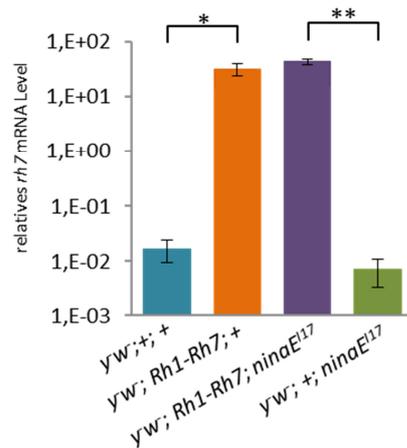
Die statistische Analyse der Daten wurde mit SYSTAT 11 (Systat Software, Inc.) durchgeführt. Für den statistischen Vergleich zweier Kurven wurden die Messwerte der Einzelkurven summiert. Anschließend wurden diese Werte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests mit Lilliefors-Korrektur (Lilliefors, 1967) auf Normalverteilung hin untersucht. Waren die Daten normalverteilt, so wurde anschließend eine One-way ANOVA durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wurden der nicht parametrische Kruskal-Wallis oder der nicht parametrische Wilcoxon signed-rank Test verwendet. Werte von  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ektopische Expression von Rh7 in R1-6 der Komplexaugen

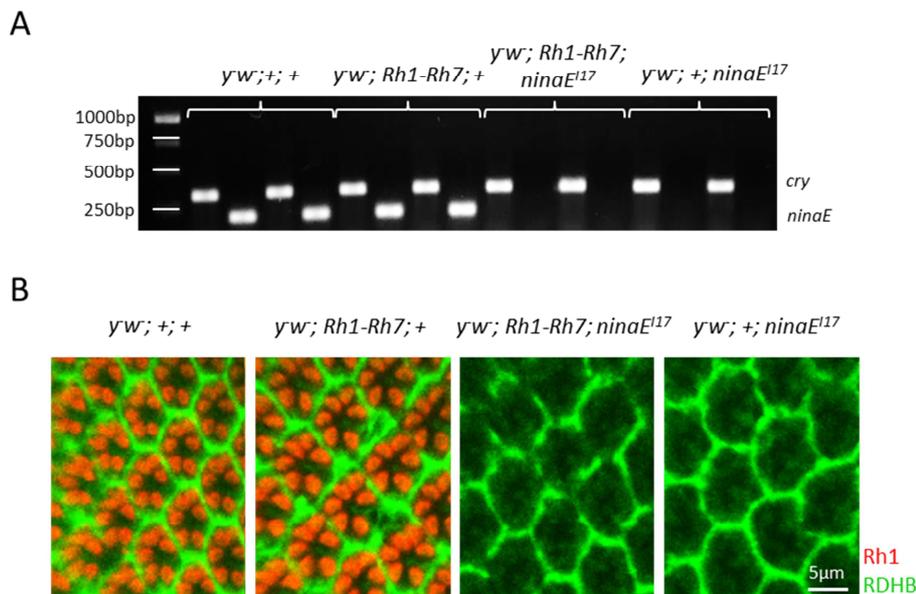
Mit dem Ziel Rhodopsin 7 auf seine mögliche photorezeptive Fähigkeit hin zu untersuchen, sollte eine Fliegenlinie etabliert werden, in deren Rezeptorzellen R1-6 Rhodopsin 7 als einziger, möglicher Photorezeptor vorhanden ist. Grund für die Expression in R1-6 ist die relativ einfache Untersuchbarkeit dieser Zellen bedingt durch ihre photochemisch und physiologisch dominante Stellung innerhalb der Rezeptorzellen des Auges (Heisenberg und Wolf, 1984).

Zunächst wurden weißäugige Fliegen hergestellt, in deren DNA ein Konstrukt bestehend aus dem Minimalpromotor des Rh1 Gens (*ninaE*), der codierenden Sequenz des Rh7 Gens und der 3' UTR von *ninaE* integriert wurde ( $\bar{y}\bar{w}; Rh1-Rh7; +$ ) (Bachleitner, 2008). Ein Teil der Fliegen wurde zusätzlich in den *ninaE*<sup>17</sup> Hintergrund gebracht ( $\bar{y}\bar{w}; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$ ). Dieses Allel weist eine 1,6kb lange Deletion im *ninaE* Gen auf, die bewirkt, dass kein Rhodopsin 1 gebildet wird und in Folge dessen die Rhabdomere von R1-6 degenerieren (O'Tousa *et al.*, 1985; Kumar und Ready, 1995; Ahmad *et al.*, 2007). Sowohl zwischen  $\bar{y}\bar{w}; Rh1-Rh7; +$  und  $\bar{y}\bar{w}; +; +$  (ANOVA; p = 0,015) als auch zwischen  $\bar{y}\bar{w}; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$  und  $\bar{y}\bar{w}; +; ninaE^{17}$  (ANOVA; p = 0,000) zeigt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *rh7* mRNA Level (Abb. 10). In beiden Fällen sind die *rh7* mRNA Level in den Köpfen der Fliegen mit Konstrukt deutlich erhöht, was auf die Funktionalität des *Rh1-Rh7* Konstrukts und damit auf eine Expression bzw. Überexpression von Rh7 in R1-6 hindeutet. Die Homozygotie der Fliegen für das *ninaE*<sup>17</sup> Allel wurde sowohl auf DNA als auch auf Protein Ebene überprüft (Abb. 11). Basierend auf der Deletion im Gen wurden dazu die Primer für eine PCR so gewählt, dass sie zwar an die DNA des wildtypischen Allels, nicht jedoch an die des *ninaE*<sup>17</sup> Allels binden. Dementsprechend zeigt das Fehlen eines PCR Produkts bei  $\bar{y}\bar{w}; +; ninaE^{17}$  und  $\bar{y}\bar{w}; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$ , dass beide Linien homozygot für die Deletion und somit für das *ninaE*<sup>17</sup> Allel sind. Erwartungsgemäß findet sich in diesen Genotypen auch keine Rhodopsin 1 Expression in den Rezeptorzellen R1-6 des Komplexauges, was darauf hindeutet, dass Rh7 der einzige, allerdings nur potentielle, Photorezeptor in R1-6 ist.



**Abb. 10: Relative *rh7* mRNA Level**

Die mittels quantitativer real-time PCR bestimmten *rh7* mRNA Level wurden jeweils relativ zu denen des Haushaltsgens *α-tubulin* berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler von jeweils drei Ansätzen mit je fünf Köpfen. Sowohl *yw*; *Rh1-Rh7*; + als auch *yw*; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> weist im Vergleich zur Kontrolle *yw*; +; + (\*) bzw. *yw*; +; *ninaE*<sup>17</sup> (\*\*) signifikant erhöhte *rh7* mRNA Level auf (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).



**Abb. 11: Nachweis des *ninaE*<sup>17</sup> Allels mittels PCR und Antikörperfärbung**

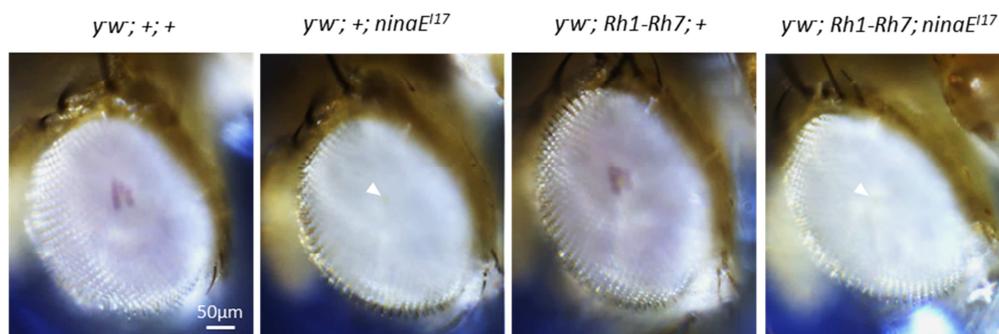
In (A) sind die Produkte der PCR mit genomischer DNA von je zwei Fliegen pro Genotyp abgebildet. Das verwendete *ninaE* Primerpaar bindet innerhalb des beim *ninaE*<sup>17</sup> Allel deletierten Bereichs. Das *cry* Primerpaar bindet innerhalb des Cryptochrom Gens und diente als Kontrolle der DNA Extraktion. Weder bei *yw*; +; *ninaE*<sup>17</sup> noch bei *yw*; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> findet sich ein Produkt der *ninaE* Primer. (B) zeigt Antikörperfärbungen der Retinas. Neben einem Antikörper gegen das *ninaE* codierte Rh1 wurde noch ein Antikörper gegen die in den retinalen Pigmentzellen exprimierte Retinol Dehydrogenase B (RDHB) (Wang *et al.*, 2012) verwendet. Bei keinem der Stämme im *ninaE*<sup>17</sup> Hintergrund ist im Querschnitt durch die Retina eine Rh1 Färbung zu sehen.

### 3.1.1 Rhodopsin 7 scheint die Rhabdomerdegeneration in *ninaE<sup>17</sup>* Fliegen nicht vollständig zu verhindern

Um zu überprüfen ob die ektopische Expression von Rh7 in R1-6 der Rhabdomerdegeneration in *ninaE<sup>17</sup>* Fliegen entgegenwirken kann, wurde die tiefe Pseudopupille der Fliegen betrachtet.

Bei der tiefen Pseudopupille handelt es sich um ein optisches Phänomen, dass durch die Superposition der virtuellen Bilder der Rhabdomere benachbarter Ommatidien entsteht. Basis für diese Überlagerung ist die regelmäßige Anordnung der Ommatidien und der als Lichtleiter agierenden Rhabdomere (Franceschini, 1979).

Fehlen wie bei  $\bar{y}w^-; +; ninaE^{17}$  die Rhabdomere von R1-6, so sind im Gegensatz zu  $\bar{y}w^-; +; +$  auch keine virtuellen Bilder dieser Rhabdomere in der Pseudopupille sichtbar (Abb. 12).



**Abb. 12: Aufnahmen der tiefen Pseudopupille bei ektopischer Rh7 Expression in R1-6**

Die Aufnahmen wurden bei orthodromer Belichtung mit Weißlicht gemacht. Die numerische Apertur des verwendeten Objektivs war n.A. = 0,24. Unter Weißlicht wird die Farbe der Rhabdomerbilder durch die Absorption des Rhodopsins und Metarhodopsins der jeweiligen Rhabdomere bestimmt (Stark und Thomas, 2004). Die virtuellen Bilder der R1-6 Rhabdomere bei  $\bar{y}w^-; +; +$  erscheinen deshalb violett, das virtuelle Bild der R7/8 Rhabdomere hingegen gelb.  $\bar{y}w^-; +; +$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; +$  zeigen deutlich sichtbare virtuelle Bilder der Rhabdomere von R1-6. Bei  $\bar{y}w^-; +; ninaE^{17}$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$  ist nur ein virtuelles Bild der R7/8 (weißer Pfeil) Rhabdomere sichtbar.

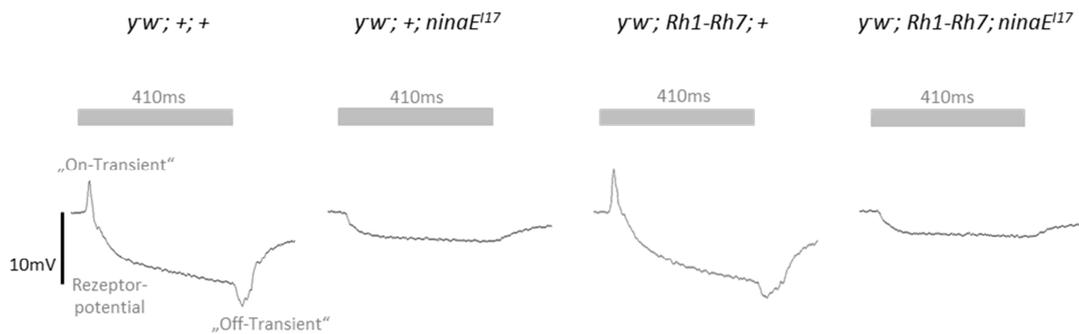
Neben dem vollständigen Fehlen der Rhabdomere würde allerdings unter anderem auch eine Beeinträchtigung der Struktur oder der regelmäßigen Anordnung der Rhabdomere zu einem Fehlen der virtuellen Bilder dieser Rhabdomere führen.

Somit deuten die bei  $\bar{y}\bar{w}$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> fehlenden Rhabdomerbilder von R1-6 möglicherweise darauf hin, dass Rh7 entweder nicht oder nur teilweise in der Lage ist der durch das *ninaE*<sup>17</sup> Allel verursachten Degeneration entgegenzuwirken.

#### 3.1.2 Rhodopsin 7 kann die Phototransduktionskaskade nicht aktivieren

Zur Untersuchung der Aktivierbarkeit der Phototransduktionskaskade durch Rh7 wurden die Elektroretinogramme (ERGs) bei Weißlichtpulsen steigender Intensität aufgezeichnet. Allgemein besteht das ERG aus drei Komponenten, die die summierte, lichtinduzierte elektrische Aktivität der Rezeptorzellen des Komplexauges und der nachgeschalteten Lamina Neurone widerspiegeln. So werden der zu Beginn und zum Ende der Lichtantwort auftretende „On-“ und „Off-Transient“ in den Laminaneuronen erzeugt. Da dort nur die Rezeptorzellen R1-6 ihre Synapsen bilden, basiert die Aktivität der dortigen Neurone auf der lichtinduzierten Depolarisation von R1-6. Das zwischen den Transienten auftretende Rezeptorpotential des ERGs gibt hingegen direkt die durch die Phototransduktionskaskade ausgelöste Depolarisation der Rezeptorzellen R1-8 des Komplexauges wieder (Pak *et al.*, 1969; zusammengefasst in: Heisenberg, 1971; Belusic, 2011).

Das Fehlen der beiden Transienten sowie die deutlich reduzierte Rezeptorpotentialamplitude im ERG von  $\bar{y}\bar{w}$ ; +; *ninaE*<sup>17</sup> und  $\bar{y}\bar{w}$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> deuten somit darauf hin, dass die Belichtung des Auges mit Weißlicht keine Depolarisation in R1-6 erzeugt (Abb. 13). Im Falle von  $\bar{y}\bar{w}$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> bedeutet dies, dass Rh7 die Phototransduktionskaskade nicht aktiviert. Demzufolge lassen sich auch die im ERG von  $\bar{y}\bar{w}$ ; *Rh1-Rh7*; + auftretenden Transienten sowie die im Vergleich zu  $\bar{y}\bar{w}$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> erhöhte Amplitude des Rezeptorpotentials auf die alleinige Aktivierung der Phototransduktionskaskade in R1-6 durch Rh1 zurückführen.



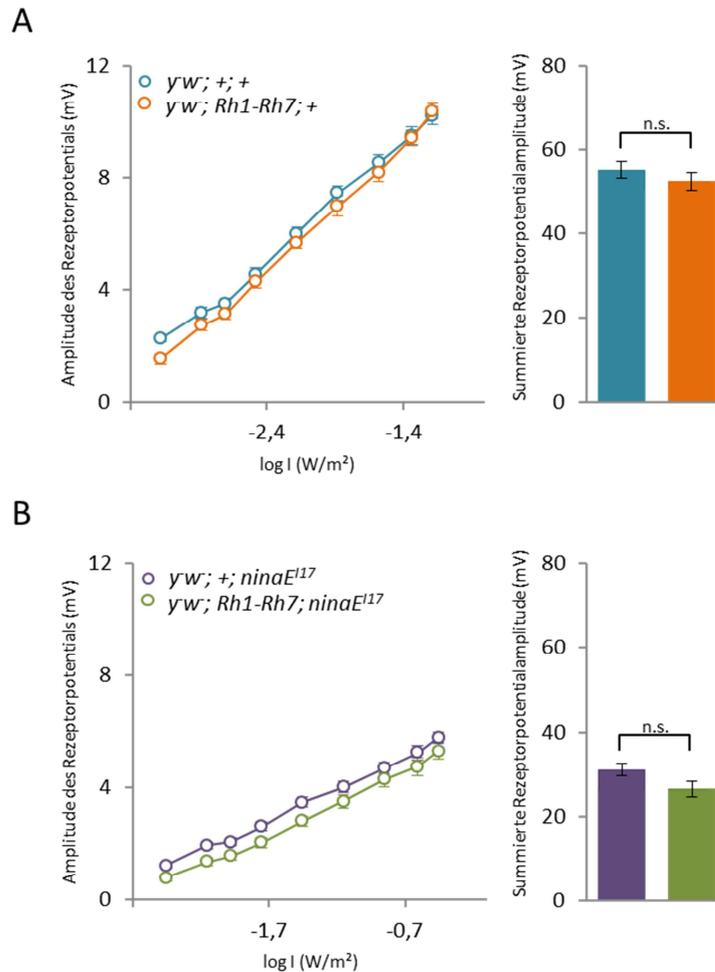
**Abb. 13: Beispiel-Elektroretinogramme von Fliegen mit ektopischer Rh7 Expression**

Die ERGs wurden bei Weißlichtpulsen der Dauer  $t = 410\text{ms}$  (dargestellt durch die grauen Balken) aufgezeichnet. Die abgebildeten ERGs von  $yw; +; +$  und  $yw; Rh1-Rh7; +$  wurden bei einer Intensität von  $I = 0,066\text{ W/m}^2$  gemessen, die von  $yw; +; ninaE^{117}$  und  $yw; Rh1-Rh7; ninaE^{117}$  bei einer Intensität von  $I = 0,07\text{ W/m}^2$ . Im Gegensatz zum ERG von  $yw; +; ninaE^{117}$  zeigt das ERG von  $yw; +; +$  einen deutlichen „On-“ und „Off-Transient“ sowie ein stark ausgeprägtes Rezeptorpotential. Auch im ERG von  $yw; Rh1-Rh7; +$  finden sich deutlich ausgeprägte Transienten und ein hohes Rezeptorpotential. Bei  $yw; Rh1-Rh7; ninaE^{117}$  fehlen hingegen die Transienten. Zudem ist das Rezeptorpotential ähnlich gering ausgeprägt wie bei  $yw; +; ninaE^{117}$ .

### 3.1.3 Die ektopische Expression von Rh7 hat keinen Einfluss auf die lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen

Um zusätzlich zu überprüfen, ob die Expression von Rh7 in R1-6, unabhängig von einer Aktivierung der Phototransduktionskaskade, die lichtinduzierte Depolarisation beeinträchtigt, wurden aus den zuvor aufgezeichneten Elektroretinogrammen zusätzlich noch die Intensitäts-Response Kurven (IRCs) für die Amplitude des Rezeptorpotentials bestimmt (Abb. 14). Bei jedem der untersuchten Genotypen zeigt sich eine Zunahme der Rezeptorpotentialamplitude und dementsprechend der retinalen Depolarisation mit steigender Lichtintensität. Die Zunahme ist darauf zurückzuführen, dass mit steigender Lichtintensität zum einen mehr Rhodopsine innerhalb einer Rezeptorzelle aktiviert werden und zum anderen mehr Rezeptorzellen rekrutiert werden (zusammengefasst in Belusic, 2011). Die Fliegen im  $ninaE^{117}$  Hintergrund zeigen eine allgemein geringere Depolarisation als diejenigen mit wildtypischem  $ninaE$  Allel, was auf das Fehlen von Rh1 zurückzuführen ist. Um zu berücksichtigen, dass die einzelnen Punkte einer Kurve jeweils voneinander abhängige

Messpunkte darstellen, wurde für den statistischen Vergleich der Kurven für jede Fliege die Summe ihrer ERG Rezeptorpotentialamplituden berechnet. Weder zwischen den summierten Amplituden von  $\bar{y}w^-; +; +$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; +$  (ANOVA,  $p = 0,331$ ) noch zwischen denen von  $\bar{y}w^-; +; ninaE^{17}$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$  (ANOVA,  $p = 0,064$ ) ergab sich ein Unterschied.



**Abb. 14: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden bei ektopischer Rh7 Expression in R1-6**

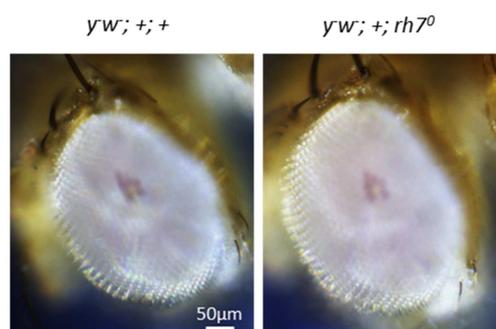
Die Fliegen wurden zunächst für 15min dunkeladaptiert und anschließend mit Weißlichtpulsen ( $t = 410ms$ ) steigender Intensität belichtet. Um die Fliegen in einem möglichst dunkeladaptierten Zustand zu halten, wurden die Lichtpulse in einem zeitlichen Abstand von 20s gegeben. Für die Intensitäts-Response Kurven wurde anschließend die Amplitude des ERG Rezeptorpotentials gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Lichtintensität  $I$  aufgetragen. Die Kurven sowie die Amplitudensummen geben den Mittelwert aus je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Weder zwischen den Amplitudensummen von  $\bar{y}w^-; +; +$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; +$  (A) noch zwischen denen von  $\bar{y}w^-; +; ninaE^{17}$  und  $\bar{y}w^-; Rh1-Rh7; ninaE^{17}$  (B) zeigt sich ein signifikanter Unterschied (n.s.).

## 3.2 Die endogene Funktion von Rhodopsin 7

Zur Untersuchung der endogenen Funktion von Rh7 wurden durch die Remobilisierung eines unmittelbar vor dem *rh7* Gen im Genom integrierten P-Elements *rh7* Knockout-Fliegen ( $y^w; +; rh7^0$ ) hergestellt. Diesen fehlt neben dem P-Element die gesamte codierende Sequenz des *rh7* Gens. Als Kontrolle wurden Fliegen etabliert bei denen im Zuge der Remobilisierung nur das P-Element aus dem Genom entfernt wurde ( $y^w; +; +$ ) (Bachleitner, 2008; Kistenpfennig, 2012).

### 3.2.1 Die Abwesenheit von Rh7 hat keinen Einfluss auf die Rhabdomermorphologie

Die deutliche Sichtbarkeit der virtuellen Rhabdomerbilder in der tiefen Pseudopupille von  $y^w; +; rh7^0$  zeigt, dass das Fehlen von Rh7 weder einen Einfluss auf die Struktur der Rhabdomere noch auf deren regelmäßige Anordnung hat (Abb. 15).

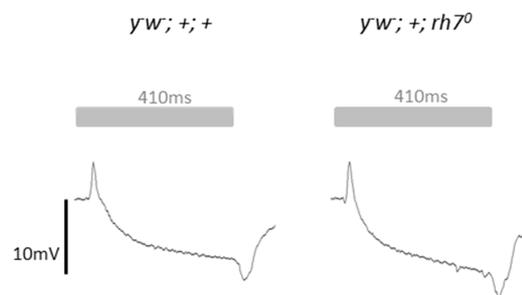


**Abb. 15: Aufnahme der tiefen Pseudopupille von *rh7* Knockout-Fliegen**

Für die Aufnahmen wurden die Augen orthodrom mit Weißlicht belichtet. Die numerische Apertur des Objektivs war  $n.A. = 0,24$ . Die *rh7* Knockout-Fliegen zeigen wie auch ihre Kontrolle eine deutlich sichtbare tiefe Pseudopupille. Neben den violett erscheinenden, virtuellen Bildern der R1-6 Rhabdomere ist in beiden Fällen auch das gelb erscheinende, virtuelle Bild der R7/8 Rhabdomere zu erkennen.

### 3.2.2 Rhodopsin 7 vermindert die lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen

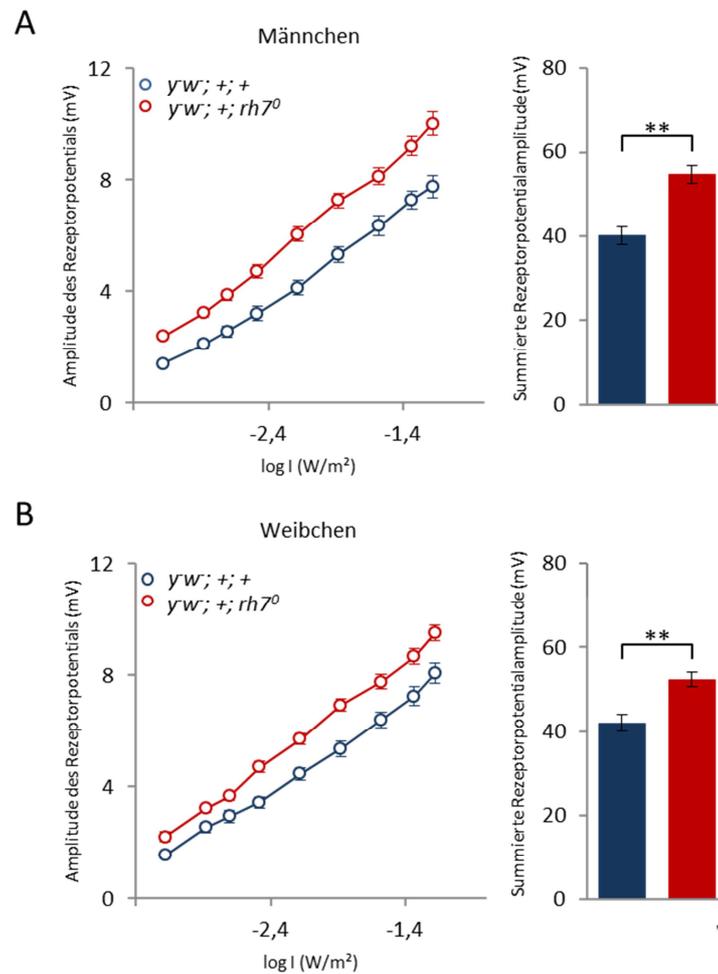
Wie auch bei den Fliegen mit ektopischer Rh7 Expression, wurden auch für die *rh7* Knockout-Fliegen und deren Kontrollen zunächst die Elektretinogramme bei Weißlichtpulsen steigender Intensität aufgezeichnet. Die Anwesenheit der beiden Transienten sowie das im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls deutlich ausgeprägte Rezeptorpotential im ERG von  $\bar{y}w; +; rh7^0$  zeigen, dass es durch das Fehlen von Rh7 zu keiner grundlegenden Beeinträchtigung der primären Prozesse der visuellen Wahrnehmung kommt (Abb. 16).



**Abb. 16: Beispiel-Elektretinogramm einer *rh7* Knockout- Fliege**

Die ERGs wurden bei Belichtung mit Weißlicht steigender Intensität gemessen. Die beispielhaft gezeigten ERGs wurden bei einer Intensität von  $I = 0,066 \text{ W/m}^2$  aufgenommen. Das ERG der *rh7* Knockout-Fliegen zeigt, ebenso wie das ERG von  $\bar{y}w; +; +$ , zwei deutliche Transienten und ein ausgeprägtes Rezeptorpotential.

Beim quantitativen Vergleich der Rezeptorpotentialamplituden in Form der Intensitäts-Response Kurven zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den *rh7* Knockout- und den Kontroll-Fliegen, der sich in den zugehörigen Summen der Rezeptorpotentialamplituden widerspiegelt (Abb. 17). Sowohl männliche (ANOVA,  $p = 0,000$ ) als auch weibliche (ANOVA,  $p = 0,001$ ) *rh7* Knockout-Fliegen reagieren auf eine Belichtung mit Weißlicht im mittleren Intensitätsbereich mit einer insgesamt signifikant erhöhten Rezeptorpotentialamplitude, was gleichbedeutend mit einer stärkeren Depolarisation der Rezeptorzellen ist. Umgekehrt scheint folglich die Anwesenheit von Rh7 die Depolarisation in R1-8 bei Belichtung zu reduzieren.



**Abb. 17: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Receptorpotentials und Summen der Receptorpotentialamplituden von männlichen und weiblichen Fliegen ohne Rh7**

Die Fliegen wurden für 15min dunkeladaptiert und dann mit Weißlichtpulsen ( $t = 410\text{ms}$ ) steigender, mittlerer Intensität belichtet. Das Zeitintervall zwischen den Lichtpulsen betrug 20s. Die Intensitäts-Response Kurven sowie die Amplitudensummen geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Sowohl bei männlichen (A) als auch bei weiblichen (B) *rh7* Knockout-Fliegen ist die Summe der Receptorpotentialamplituden im Vergleich zu ihrer Kontrolle signifikant größer (\*\*).

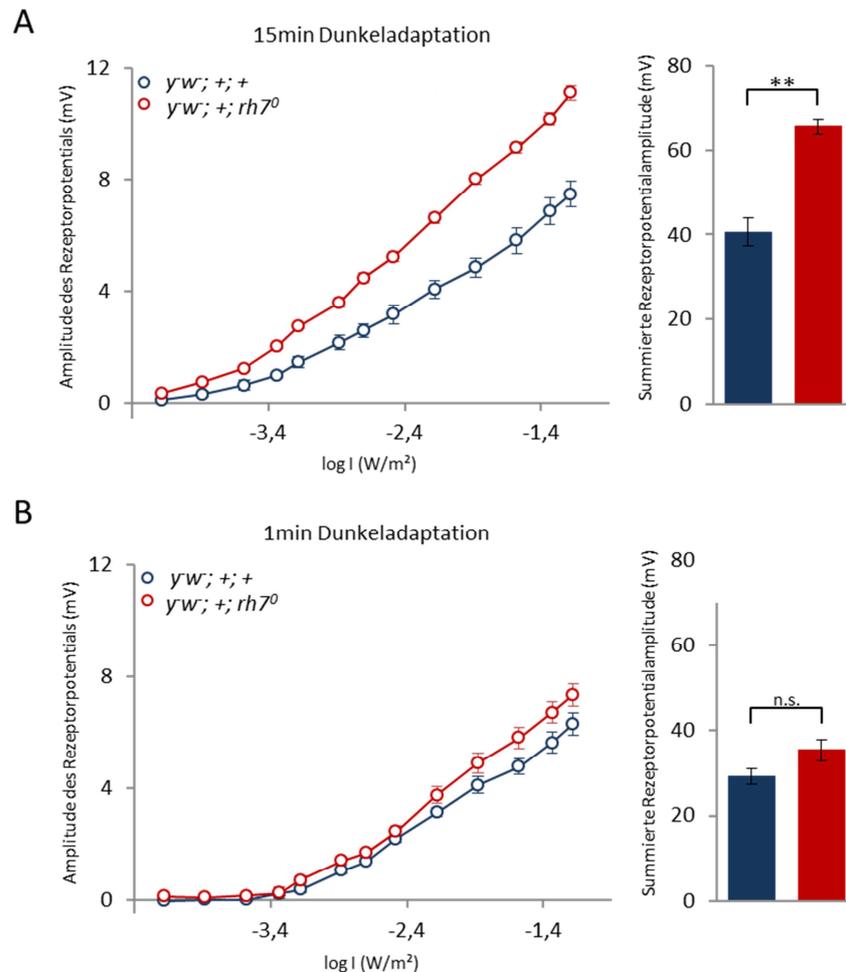
#### 3.2.3 Der Effekt von Rh7 auf die Depolarisation scheint von Lichtintensität und Adaptationszustand abzuhängen

Zur genaueren Charakterisierung dieses Einflusses von Rh7 auf die Amplitude des Rezeptorpotentials, wurden als nächstes erneut die Intensitäts-Response Kurven bestimmt, wobei jedoch einzelne Parameter des Belichtungsprotokolles bei der Aufnahme der ERGs modifiziert wurden.

So wurde zunächst der Intensitätsbereich des Weißlichts, innerhalb dem die ERGs aufgezeichnet wurden, zu niedrigeren Lichtintensitäten hin ausgeweitet. Wie auch zuvor ergibt sich zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $\bar{y}w\bar{; +; rh7^0$  und  $\bar{y}w\bar{; +; +$  ein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis,  $p = 0,000$ ) (Abb. 18A). Die nun allerdings sichtbar größere Steigung der Intensitäts-Response Kurve von  $\bar{y}w\bar{; +; rh7^0$  deutet darauf hin, dass der durch Rh7 herbeigeführte Unterschied in der Rezeptorpotentialamplitude intensitätsabhängig ist. So scheint das Fehlen von Rh7 bei einer Belichtung mit Weißlicht niedrigerer Intensität für eine geringere Zunahme der Rezeptorpotentialamplitude zu sorgen als bei Belichtung mit höherer Intensität.

Im nächsten Schritt wurde zusätzlich noch die vor der Aufnahme der ERGs stattfindende Dunkeladaptation von 15min auf 1min verkürzt. Bedingt durch die verkürzte Dunkeladaptationszeit zeigt sich sowohl bei  $\bar{y}w\bar{; +; +$  als auch bei  $\bar{y}w\bar{; +; rh7^0$  eine Verschiebung der Intensitäts-Response Kurven hin zu höheren Intensitäten (Abb. 18B). Grund für die verringerte Empfindlichkeit beider Genotypen sind die bei 1min Dunkeladaptation in nur geringerem Ausmaß stattfindenden Dunkeladaptationsmechanismen. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. die im Dunkeln stattfindende Translokation der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins  $G_q\alpha$  und der TRPL Kanäle ins Rhabdomer hinein (zusammengefasst in: Frechter und Minke, 2006; Wang und Montell, 2007). Im Gegensatz zu den Summen der Rezeptorpotentialamplituden nach 15 minütiger Dunkeladaptation ergibt sich nun kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Amplitudensummen. Dies legt nahe, dass der

Effekt von Rh7 auf die Depolarisation vom Zustand der Dunkeladaptation abhängt und mit zunehmender Dunkeladaptation stärker wird.



**Abb. 18: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden bei fehlendem Rh7 und fehlender Augenpigmentierung nach 15-minütiger und 1-minütiger Dunkeladaptation**

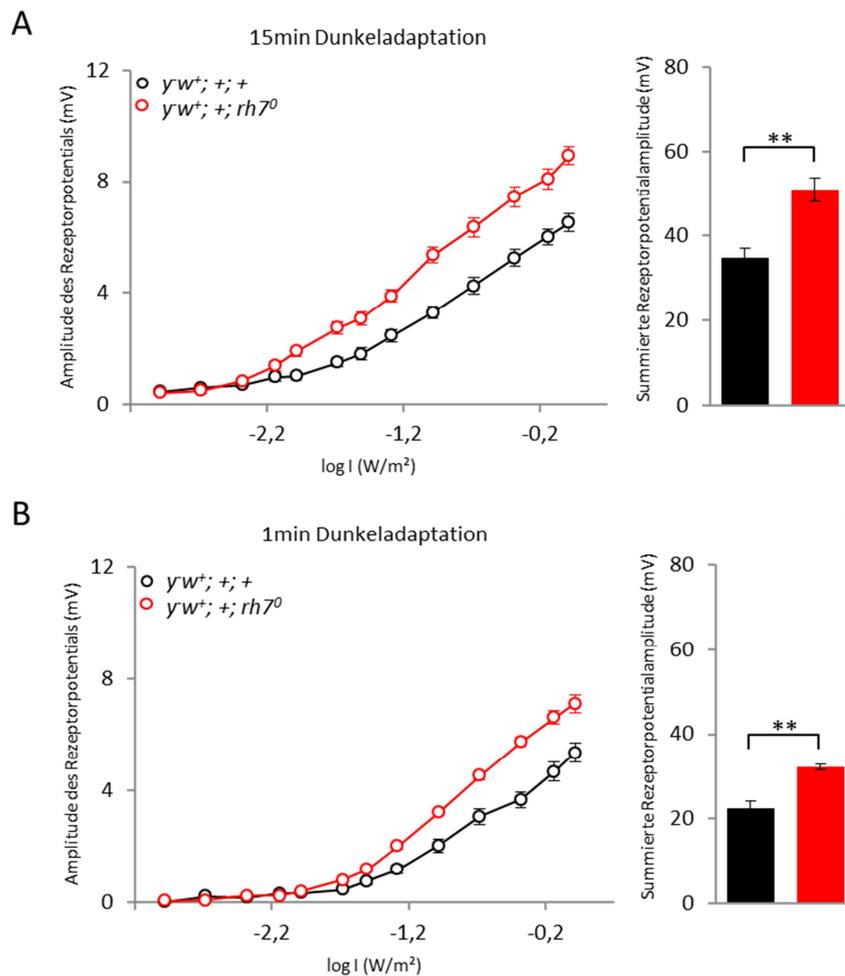
Die Fliegen wurden für 15min (A) bzw. 1min (B) dunkeladaptiert und dann mit Weißlichtpulsen ( $t = 410\text{ms}$ ) steigender Intensität im niedrigen und mittleren Intensitätsbereich belichtet. Die Intensitäten der Lichtpulse wurden im Vergleich zu Punkt 3.2.2 aus einem größeren Bereich gewählt. Der zeitliche Abstand der Pulse betrug 20s. Die Intensitäts-Response Kurven und die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Nach 15-minütiger Dunkeladaptation zeigen die *rh7* Knockout-Fliegen im Vergleich zu ihrer Kontrolle eine signifikant erhöhte summierte Rezeptorpotentialamplitude (\*\*). Zudem zeigt die Intensitäts-Response Kurve der Knockout-Fliegen eine scheinbar größere Steigung als die von *yW; +; +*. Nach 1-minütiger Dunkeladaptation findet sich kein Unterschied zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden der Fliegen (n.s.).

#### 3.2.4 Der Einfluss der Pigmentierung

Ein wesentlicher Unterschied der bisher verwendeten Fliegen zu wildtypischen Fliegen ist die durch das  $w^-$  Allel bedingte, fehlende Pigmentierung der Komplexaugen. Pigmente finden sich bei wildtypischen Fliegen in sog. Pigmentgranula sowohl in den Pigmentzellen als auch im Cytosol der Rezeptorzellen, wo sie allgemein für eine Reduktion der Lichtempfindlichkeit sorgen (Stark und Wassermann, 1972; Stark und Sapp, 1988). Die in den Rezeptorzellen enthaltenen Pigmentgranula dienen jedoch zusätzlich noch der Licht- bzw. Dunkeladaptation. Im Zuge des sog. Pupillenmechanismus verlagern sich die Granula im Licht zum Rhabdomer hin, wodurch es zu einer Reduktion des Lichtflusses durch das Rhabdomer und somit zu einer Verminderung der Lichtempfindlichkeit kommt. Im Dunkeln entfernen sich die Granula hingegen wieder vom Rhabdomer und lassen so den Lichtfluss durch das Rhabdomer unbeeinflusst (Kirschfeld und Franceschini, 1968; Lo und Pak, 1981).

Aufgrund dieses Einflusses der Pigmentierung auf die Lichtperzeption wurde als nächstes untersucht, ob die Pigmentierung den Effekt von Rh7 auf die lichtinduzierte Depolarisation von R1-8 modifiziert. Dazu wurden die Genotypen  $y^-w^-; +; +$  und  $y^-w^-; +; rh7^0$  in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzt (Kistenpfennig, 2012). Von den so erhaltenen Genotypen ( $y^-w^+; +; rh7^0$  und  $y^-w^+; +; +$ ) wurden wie auch zuvor nach 15-minütiger und 1-minütiger Dunkeladaptation die ERGs bei Weißlicht aufgezeichnet, um daraus anschließend die Intensitäts-Response Kurven zu bestimmen (Abb. 19).

Bedingt durch die geringere Lichtempfindlichkeit sind die Intensitäts-Response Kurven der Fliegen mit Augenpigmentierung im Vergleich zu denen der ohne Pigmentierung allgemein zu höheren Lichtintensitäten hin verschoben. Entsprechend den  $w^-$  Fliegen zeigen auch die  $w^+$  Fliegen bei geringerer Dunkeladaptationszeit eine Rechtsverschiebung der Intensitäts-Response Kurven. Der zuvor erwähnte Pupillenmechanismus sollte hierbei allerdings keine Rolle spielen, da die Wanderung der Granula in den Rezeptorzellen innerhalb von Sekunden abläuft und somit bereits nach 1min Dunkeladaptation einen stationären Zustand erreicht haben sollte (Kirschfeld und Franceschini, 1968; Lo und Pak, 1981).



**Abb. 19: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden bei Augenpigmentierung und fehlendem Rh7 nach 15-minütiger und 1-minütiger Dunkeladaptation**

Die Fliegen wurden für 15min (A) bzw. 1min (B) dunkeladaptiert und dann mit Weißlichtpulsen ( $t = 410\text{ms}$ ) steigender, mittlerer Intensität belichtet. Der zeitliche Abstand der Pulse betrug 20s. Die Intensitäts-Response Kurven und die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Sowohl nach 15-minütiger als auch nach 1-minütiger Dunkeladaptation zeigen die *rh7* Knockout-Fliegen mit pigmentierten Augen eine signifikant erhöhte summierte Rezeptorpotentialamplitude im Vergleich zu ihrer Kontrolle (\*\*).

Vergleicht man nun die Summen der Rezeptorpotentialamplituden der *rh7* Knockout-Fliegen mit denen der Kontrollen, so zeigt sich im Gegensatz zu den weißäugigen Fliegen nicht nur nach 15min (ANOVA,  $p = 0,000$ ) sondern auch nach 1min (ANOVA,  $p = 0,000$ ) Dunkeladaptation ein deutlicher und signifikanter Unterschied. In beiden Fällen ist zudem die

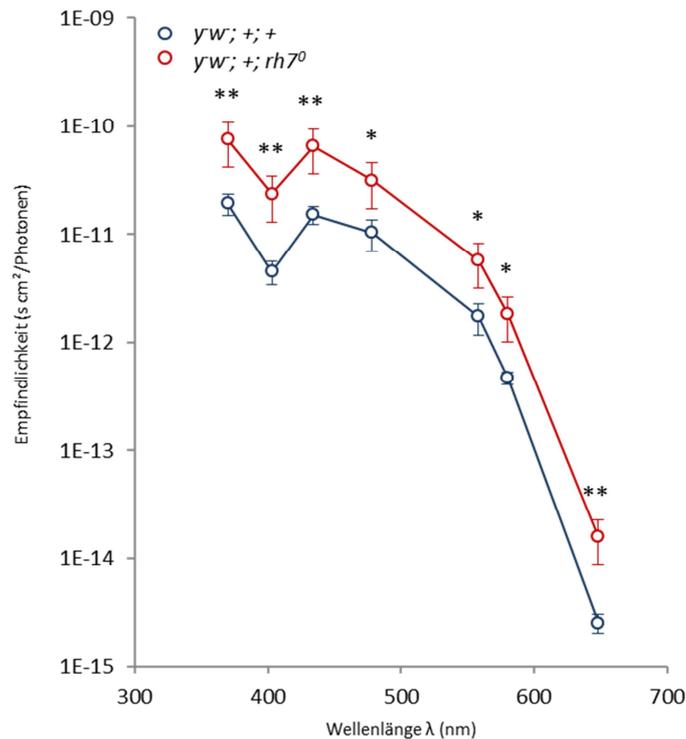
Steigung der Intensitäts-Response Kurven von  $\bar{y}w^+$ ; +;  $rh7^0$  sichtbar größer. Hieraus folgt, dass im  $w^+$  Hintergrund der Effekt von Rh7 auf die Rezeptorpotentialamplitude scheinbar nicht durch Dunkeladaptation modifiziert wird.

#### 3.2.5 Die Wellenlängenabhängigkeit des Rh7 Effekts

Zur Aufzeichnung der Elektoretinogramme wurde in allen bisherigen Experimenten nur Weißlicht mit einem relativ breiten Spektrum verwendet. Um zu überprüfen, ob der Effekt von Rh7 auf die Rezeptorpotentialamplitude nur durch Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs ausgelöst wird, wurde nun das Aktionsspektrum der Amplitude des ERG Rezeptorpotentials von  $\bar{y}w^+$ ; +;  $rh7^0$  und  $\bar{y}w^+$ ; +; + bestimmt (Abb. 20).

Allgemein gibt ein Aktionsspektrum die Abhängigkeit der Größe eines biologischen Effekts von der Wellenlänge des Lichts wieder. Im Falle weißäugiger *Drosophila melanogaster* spiegelt das Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude allerdings nicht nur die Wellenlängenabhängigkeit letzterer, sondern auch die spektrale Empfindlichkeit von Rh1 wieder. Grund hierfür ist die im Vergleich zu den anderen Rhodopsinen stark erhöhte Expression von Rh1 in den Rezeptorzellen des Auges und damit einhergehend dessen physiologisch dominante Rolle bei der Lichtperzeption. Allgemein finden sich im Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude weißäugiger Fliegen somit zwei Maxima, eines im UV Bereich bei etwa 350nm und eines im blauen Spektralbereich bei etwa 480nm, die mit den Empfindlichkeits- bzw Absorptionsmaxima von Rh1 übereinstimmen (Stark und Wassermann, 1972). Auch das Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude von  $\bar{y}w^+$ ; +; + besitzt dementsprechend ein Empfindlichkeitsmaximum im blauen Spektralbereich bei etwa 433-478nm. Zudem deutet die Zunahme der Empfindlichkeit von 402nm hin zu 370nm auf das zweite, bei etwa 350nm auftretende Empfindlichkeitsmaximum hin. Im Vergleich zu  $\bar{y}w^+$ ; +; + zeigen die  $rh7$  Kockout-Fliegen bei offenbar gleicher Lage der Maxima eine allgemein erhöhte Empfindlichkeit. So ergibt sich bei allen untersuchten Wellenlängen ein signifikanter Unterschied zwischen den Empfindlichkeiten von  $\bar{y}w^+$ ; +; + und  $\bar{y}w^+$ ; +;  $rh7^0$  (370nm: ANOVA,  $p = 0,003$ ; 403nm: ANOVA,  $p = 0,000$ ; 434nm: ANOVA,  $p = 0,000$ ; 478nm:

Kuskal-Wallis,  $p = 0,016$ ; 558nm: ANOVA,  $p = 0,025$ ; 580nm: ANOVA,  $p = 0,025$ ; 648nm: ANOVA,  $p = 0,000$ ). Der Effekt von *Rh7* auf die retinale Depolarisation scheint somit nicht nur durch Licht eines engen Wellenlängenbereichs, sondern durch Licht im gesamten Bereich von 370-648nm induziert werden zu können.



#### Abb. 20: Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude von *rh7* Knockout-Fliegen

Nach 15-minütiger Dunkeladaptation wurden zunächst die Intensitäts-Response Kurven für die Rezeptorpotentialamplitude bei Belichtung mit Farblicht unterschiedlicher Wellenlängen bestimmt (Abb. A2, A3). Die Dauer der Farblichtpulse war  $t = 430$ ms. Anschließend wurde für jede Wellenlänge die Intensität in Photonen/s  $\text{cm}^2$  bestimmt, die nötig war um eine Rezeptorpotentialamplitude von 5mV zu generieren. Gezeigt ist der Kehrwert dieser Intensitäten, die Empfindlichkeit, aufgetragen gegen die zugehörige Wellenlänge des verwendeten Lichts. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Empfindlichkeiten von je 5 Fliegen inklusive Standardfehler dar. Das Aktionsspektrum der *rh7* Knockout-Fliegen zeigt verglichen mit dem von *yw; +; +* bei scheinbar gleicher Lage der Maxima für jede der untersuchten Wellenlängen eine signifikant größere Empfindlichkeit (\*/\*\*).

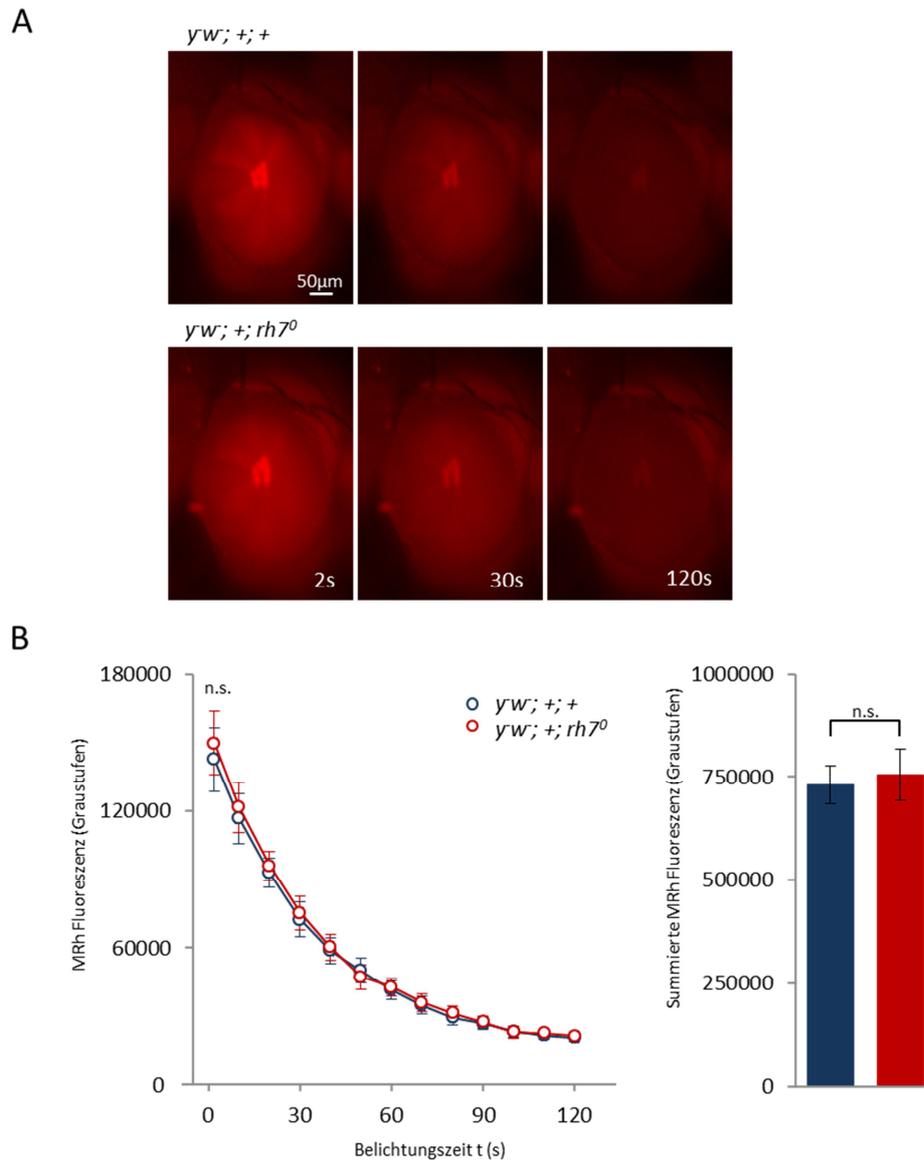
#### 3.2.6 Rh7 hat keinen Einfluss auf die Umwandlung von Metarhodopsin zu Rhodopsin

Bei Belichtung mit Weißlicht wird sowohl Rhodopsin 1 (Rh1) in Metarhodopsin (MRh) als auch MRh in Rh1 umgewandelt und so ein bestimmtes Rh/MRh Verhältnis erzeugt. Das genaue, im Zuge der Belichtung entstehende Verhältnis ist von der spektralen Zusammensetzung und Intensität des Lichts sowie von der Dauer der Belichtung abhängig (Belusic *et al.*, 2010). Die Konversion von MRh in Rh sorgt allgemein für die Bereitstellung von erneut aktivierbarem Rh und dient somit der Aufrechterhaltung der Lichtempfindlichkeit.

Um zu überprüfen, ob sich die *rh7* Knockout-Fliegen von ihrer Kontrolle in der Bereitstellung von erneut aktivierbarem Rh1 unterscheiden wurde die Umwandlung von MRh in Rh1 in R1-6 untersucht. Ausgangspunkt dafür ist, dass das MRh in R1-6 auf die Absorption von Photonen mit einer starken Fluoreszenz im roten Spektralbereich reagiert, die umso stärker ausfällt je mehr MRh vorhanden ist. Die Fluoreszenz von Rh1 nach Photonenabsorption ist hingegen vernachlässigbar (Stavenga, 1983; Stavenga *et al.*, 1984; Belusic *et al.*, 2010).

Durch Verwendung eines entsprechenden Filters kann diese Fluoreszenz in der tiefen Pseudopupille isoliert sichtbar gemacht werden.

Abbildung 21A zeigt einzelne Aufnahmen der tiefen Pseudopupille unter Verwendung eines langwelligen Bandpassfilters bei Belichtung mit intensivem Grünlicht. Sowohl bei  $\bar{y}w^+$ ;  $+$ ;  $+$  als auch bei  $\bar{y}w^+$ ;  $+$ ;  $rh7^0$  ist eine deutliche Abnahme der Intensität der tiefen Pseudopupille und damit der MRh Fluoreszenz mit zunehmender Belichtungszeit zu sehen. Gleiches zeigt sich auch bei den anhand der Aufnahmen bestimmten MRh Fluoreszenzkurven (Abb. 21B). Grund für die im Laufe der Belichtung abnehmende MRh Fluoreszenz ist die durch das Grünlicht bewirkte Umwandlung von MRh in Rh. Dementsprechend kommt es mit fortschreitender Belichtung zu einer Abnahme der MRh Menge und damit zu einer Abnahme der Fluoreszenz.



**Abb. 21: Aufnahmen und Quantifizierung der MRh Fluoreszenz in der tiefen Pseudopupille von  $yw; +; rh7^0$  bei Belichtung mit Grünlicht**

Die Fliegen wurden zunächst 1min bei intensivem UV-Licht adaptiert, um möglichst viel MRh in den Rezeptorzellen zu erzeugen. Anschließend wurden die Fliegen mit intensivem Grünlicht belichtet und die tiefe Pseudopupille unter Verwendung eines langwelligen Bandpassfilters aufgenommen. Die numerische Apertur des für die Aufnahmen der tiefen Pseudopupille verwendeten Objektivs betrug  $n.A. = 0,3$ . In (A) sind einzelne Aufnahmen der tiefen Pseudopupille, die nach einer Belichtungszeit von 2s, 30s und 120s gemacht wurden, abgebildet. (B) zeigt die anhand der Aufnahmen bestimmte MRh Fluoreszenz der tiefen Pseudopupille in Abhängigkeit von der Belichtungszeit sowie die zugehörigen Summen der MRh Fluoreszenz. Die Fluoreszenzkurven und die Summen der Fluoreszenzen geben den Mittelwert von je 7 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Der Vergleich der summierten MRh Fluoreszenzen von  $yw; +; +$  und  $yw; +; rh7^0$  ergibt keinen signifikanten Unterschied (n.s.). Zwischen den Anfangswerten der MRh Fluoreszenzkurven zeigt sich ebenfalls kein Unterschied (n.s.).

Der statistische Vergleich der zu den Fluoreszenzkurven gehörenden summierten MRh Fluoreszenzen ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen  $\bar{y}_w; +; +$  und  $\bar{y}_w; +; rh7^0$  (ANOVA,  $p = 0,763$ ). Dies deutet darauf hin, dass in beiden Fällen die Abnahme der MRh Fluoreszenz und damit die Umwandlung von MRh in Rh in gleicher Weise abläuft. Der fehlende Unterschied zwischen den Anfangswerten der MRh Fluoreszenzkurven von  $\bar{y}_w; +; +$  und  $\bar{y}_w; +; rh7^0$  (ANOVA,  $p = 0,676$ ) zeigt zudem, dass im Zuge der vor Aufzeichnungsbeginn durchgeführten UV-Adaptation gleiche Mengen an MRh erzeugt wurden.

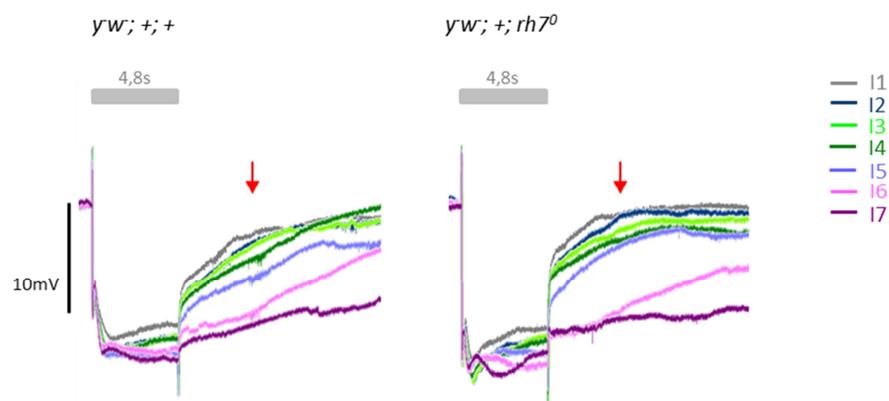
#### 3.2.7 Die Untersuchung des Elektretinogramm-Nachpotentials

Bei dunkeladaptierten Fliegen finden sich etwa 25% des Arrestin 2 (Arr2) im Rhabdomer. Die verbleibenden 75% befinden sich hingegen im Cytoplasma der Rezeptorzelle (Lee *et al.*, 2003). Belichtet man nun dunkeladaptierte Fliegen mit Blaulichtpulsen steigender Intensität, so kommt es allgemein mit steigender Lichtintensität zu einer zunehmend stärkeren Ausprägung des Elektretinogramm Nachpotentials. Diese äußert sich zunächst in einer Verlangsamung der Repolarisation und geht schließlich in eine selbst im Dunkeln anhaltende Depolarisation der Rezeptorzellen über.

Grund hierfür ist, dass mit steigender Blaulichtintensität zunehmend mehr MRh gebildet wird. Wird zunächst weniger MRh gebildet als Arr2 im Rhabdomer vorhanden ist, so kommt es zu einer normalen Repolarisation des ERGs am Ende des Lichtpulses. Liegt die Menge an gebildetem MRh über der Menge an Arr2 im Rhabdomer und unterhalb der in der gesamten Rezeptorzelle verfügbaren Arr2 Menge, so kommt es innerhalb von Sekunden zu einer Translokation von Arr2 vom Cytoplasma ins Rhabdomer, was eine Verlangsamung der ERG Repolarisation nach sich zieht. Übersteigt schließlich die Menge an gebildetem MRh die des in der Zelle verfügbaren Arr2, so tritt keine vollständige Repolarisation mehr ein und der Überschuss an MRh sorgt dafür, dass die Phototransduktionskaskade auch nach Ende des Lichtpulses am Laufen gehalten wird und die Rezeptorzellen weiterhin depolarisiert bleiben. Diese Depolarisation fällt dabei allgemein umso stärker aus, je größer der Überschuss an aktivem MRh ist. Sorgt ein nachfolgender Lichtpuls für die Rückwandlung des zuvor

gebildeten MRh in Rh, so kommt es bei anschließender Dunkelheit innerhalb von wenigen Sekunden wieder zur Auswanderung des Arrestins aus dem Rhabdomer (Belusic *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 2011).

Um nun zu untersuchen, ob Rh7 einen Einfluss auf das Elektretinogramm Nachpotential hat wurden die Fliegen mit Blaulichtpulsen steigender, hoher Intensität belichtet und die Elektretinogramme aufgezeichnet. Abbildung 22 zeigt Beispiel-Elektretinogramme von  $y^w; +; +$  und  $y^w; +; rh7^0$ . Bei beiden Genotypen ist eine zunehmend stärkere Ausprägung des Nachpotentials mit steigender Blaulichtintensität zu erkennen.

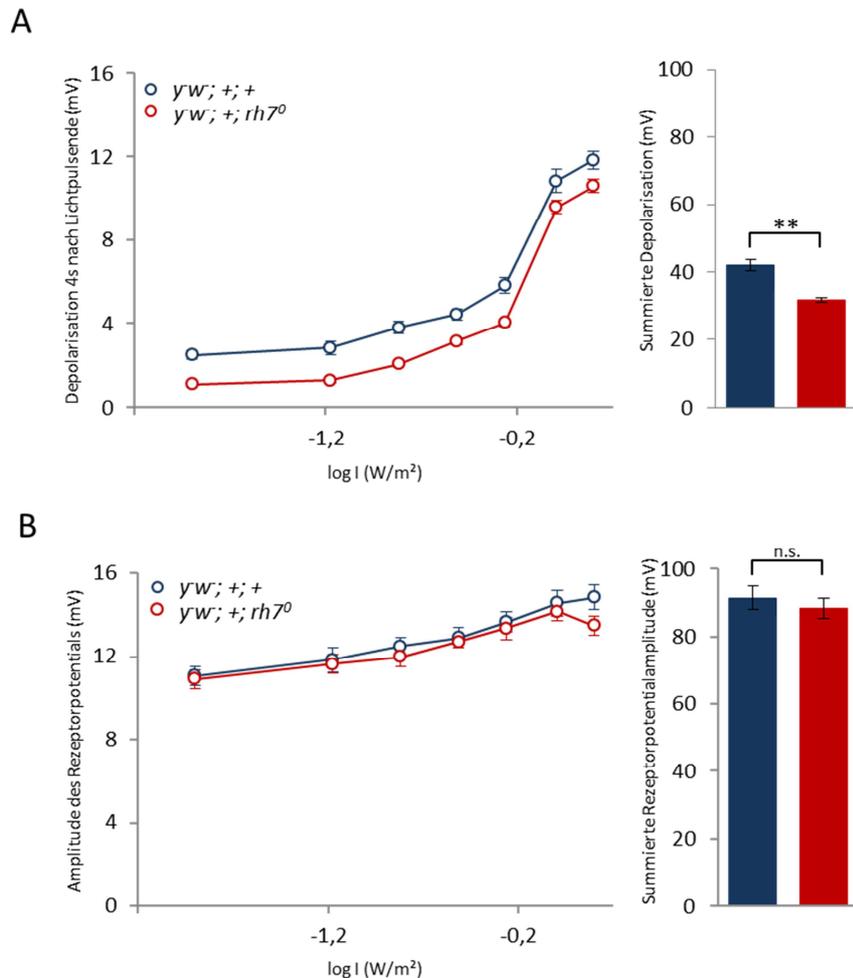


**Abb. 22: Beispiel-Elektretinogramme von  $y^w; +; rh7^0$  bei Belichtung mit langen Blaulichtpulsen hoher, steigender Intensität**

Die Fliegen wurden für 15min dunkeladaptiert und anschließend mit Blaulichtpulsen ( $t = 4,8s$ ,  $\lambda_{max} = 478nm$ , Abb. A2) (dargestellt durch den grauen Balken) steigender, hoher Intensität (I1, I2 ...; I7) ( $I7 = 1,58 W/m^2 = 3,83 E14$  Photonen/s  $cm^2$ ) belichtet. Der zeitliche Abstand zwischen den Blaulichtpulsen betrug 80s. Sowohl vor der anfänglichen Dunkeladaptation als auch 20s nach jedem Blaulichtpuls wurde ein Orangelichtpuls ( $t = 4,8s$ ,  $\lambda_{max} = 580nm$ , Abb. A2) konstanter Intensität ( $I = 4,28 W/m^2 = 1,27 E15$  Photonen/s  $cm^2$ ) gegeben, um vorhandenes bzw. gebildetes MRh wieder in Rh umzuwandeln. Gezeigt sind die als Antwort auf die Blaulichtpulse aufgezeichneten ERGs von  $y^w; +; +$  und  $y^w; +; rh7^0$ . In beiden Fällen zeigt sich eine Zunahme des Nachpotentials mit steigender Blaulichtintensität. Für die Quantifizierung des Nachpotentials wurde die Depolarisation 4s nach Lichtpulsende (roter Pfeil) verwendet.

Zur Quantifizierung des Nachpotentials bzw. als Maß für dessen Ausprägung wurde anschließend die noch 4s nach Ende des Lichtpulses im Elektretinogramm vorhandene Depolarisation bestimmt und gegen den dekadischen Logarithmus der zugehörigen Blaulichtintensität aufgetragen (Abb. 23A). In beiden Fällen zeigt sich entsprechend des mit

steigender Blaulichtintensität größer werdenden MRh Gehalts eine generelle Zunahme des Nachpotentials.



**Abb. 23: Intensitäts-Response Kurven für die Depolarisation 4s nach Lichtpulsende und die Amplitude des Rezeptorpotentials inklusive der summierten Depolarisationen und summierten Rezeptorpotentialamplituden bei fehlendem Rh7**

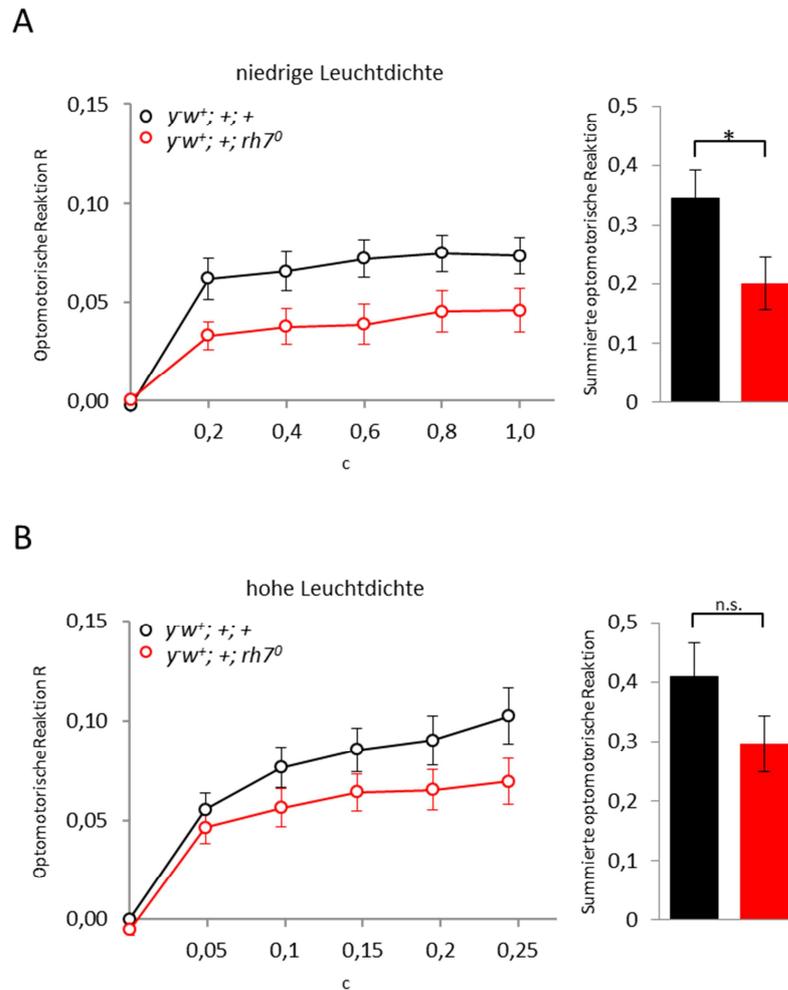
Bei den in Abb. 22 gezeigten ERGs wurde die 4s nach Ende des Blaulichtpulses noch vorhandene Depolarisation gemessen. Anschließend wurde diese Depolarisation gegen den natürlichen Logarithmus der zugehörigen Blaulichtintensität aufgetragen (A). Die Kurven sowie die Depolarisationssummen geben den Mittelwert aus je 7 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Der statistische Vergleich der Summen ergibt für  $\gamma w; +; rh7^0$  eine im Vergleich zu  $\gamma w; +; +$  signifikant niedrigere Depolarisationssumme (\*\*). Zudem scheint die Intensitäts-Response Kurve des Nachpotentials von  $\gamma w; +; rh7^0$  im Vergleich zu der von  $\gamma w; +; +$  parallel nach unten verschoben zu sein. Zusätzlich wurden anhand der aufgezeichneten ERGs noch die Intensitäts-Response Kurven der Rezeptorpotentialamplitude sowie die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden bestimmt (B). Zwischen den Summen der Rezeptorpotentialamplituden von  $\gamma w; +; rh7^0$  und  $\gamma w; +; +$  zeigt sich kein signifikanter Unterschied (n.s.).

Beim Vergleich der zugehörigen summierten Depolarisationen findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen. So zeigen die *rh7* Knockout-Fliegen eine im Vergleich zu  $\bar{y}^w; +; +$  signifikant erhöhte summierte Depolarisation (ANOVA,  $p = 0,000$ ). Der Verlauf der Kurven deutet dabei zusätzlich darauf hin, dass das Fehlen von Rh7 im gesamten, untersuchten Intensitätsbereich zu einer gleichbleibend geringeren Depolarisation 4s nach Lichtpulsende führt. Ursache dieses Unterschieds könnten unter anderem Veränderungen im Arr2 Gehalt oder dessen Verteilung innerhalb der Rezeptorzellen der *rh7* Knockout-Fliegen sein.

Abbildung. 23B zeigt die ebenfalls anhand der aufgezeichneten ERGs bestimmten Intensitäts-Response Kurven der Rezeptorpotentialamplitude. Hier findet sich kein Unterschied zwischen den zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $\bar{y}^w; +; +$  und  $\bar{y}^w; +; rh7^0$  (ANOVA,  $p = 0,513$ ).

### 3.2.8 Rh7 vermindert die optomotorische Reaktion

Wird der Fliege ein in horizontaler Richtung rotierendes Streifenmuster präsentiert, so versucht sie diese Rotation zu kompensieren und zeigt eine Nachfolgebewegung in Richtung der Streifenrotation (zusammengefasst in Borst, 2014). Dieses als optomotorische Reaktion bezeichnete Verhalten wird in erster Linie durch den optischen Input der Rezeptorzellen R1-6 induziert (Heisenberg und Buchner, 1977; Rister *et al.*, 2007). Aufgrund einer Verminderung der Kontrastempfindlichkeit mit abnehmender Augenpigmentierung wurden für die Untersuchung der Nachfolgereaktion die Fliegen im  $w^+$  Hintergrund verwendet (Götz, 1964; Hengstenberg und Götz, 1967). Sowohl bei höherer als auch bei niedrigerer mittlerer Leuchtdichte des Streifenmusters zeigen beide Genotypen mit steigendem Musterkontrast  $c$  eine Zunahme der optomotorischen Reaktion  $R$  bis hin zur Sättigung (Abb. 24). Der Sättigungswert von  $R$  ist dabei bei der höheren mittleren Musterleuchtdichte größer als bei der niedrigeren (Pick und Buchner, 1979).



**Abb. 24: Abhängigkeit der optomotorischen Reaktion von  $rh7$  Knockout-Fliegen vom Musterkontrast bei hoher und niedriger Musterleuchtdichte**

Frei laufenden, weiblichen Fliegen wurden nacheinander in cw und ccw Richtung rotierende Streifenmuster mit steigendem Kontrast präsentiert. Die Winkelgeschwindigkeit des Streifenmusters betrug  $\omega = 18^\circ/\text{s}$ . Für die Bildwechselfrequenz wurde  $f = 1\text{Hz}$  gewählt, um eine maximale optomotorische Reaktion zu induzieren (Götz, 1964). Für die optomotorische Reaktion R wurde jeweils die Laufaktivität in Richtung der Streifenbewegung relativ zur Laufaktivität auf das Streifenmuster zu berechnet, um Unterschiede in der Laufaktivität zu kompensieren. Gezeigt ist die optomotorische Reaktion R aufgetragen gegen den Musterkontrast c bei konstant niedriger ( $\bar{I} = 50$ ) (A) und konstant hoher ( $\bar{I} = 127,5$ ) (B) mittlerer Musterleuchtdichte. Die Kurven geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Zwischen den zugehörigen summierten optomotorischen Reaktionen ergibt sich bei niedrigerer (\*) nicht jedoch bei höherer (n.s.) mittlerer Musterleuchtdichte ein signifikanter Unterschied zwischen  $yw^{+}; +; +$  und  $yw^{+}; +; rh7^0$ .

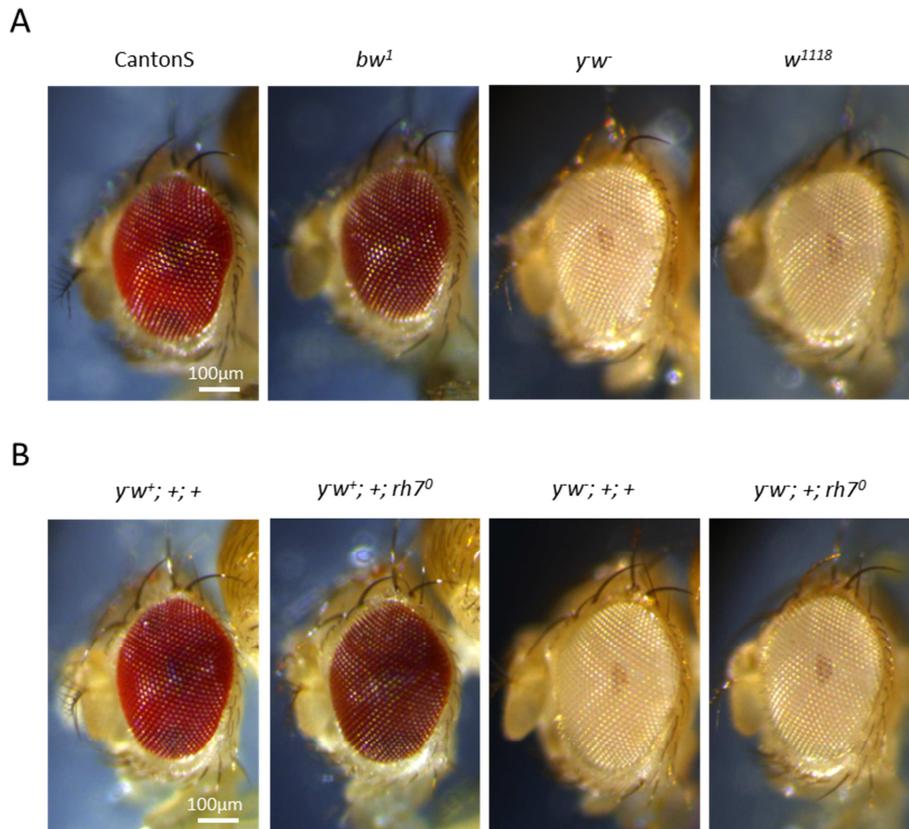
Beim Vergleich der optomotorischen Reaktion der beiden Genotypen ergibt sich bei niedrigerer mittlerer Leuchtdichte ein signifikanter Unterschied. So zeigen die  $yw^{+}; +; rh7^0$  Fliegen unter dieser Bedingung eine im Vergleich zu  $yw^{+}; +; +$  deutlich reduzierte summierte

optomotorische Reaktion (Kruskal-Wallis,  $p = 0,049$ ). Bei höherer mittlerer Leuchtdichte des Streifenmusters findet sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den summierten Reaktionen der beiden Genotypen (ANOVA,  $p = 0,133$ ).

Aufgrund der dominanten Rolle von R1-6 bei der Vermittlung der optomotorischen Reaktion könnte der gefundene Unterschied zwischen  $\bar{y}w^+; +; rh7^0$  und  $\bar{y}w^+; +; +$  somit auf eine Beeinträchtigung der Lichtperzeption in R1-6 durch Rh7 zurückzuführen sein.

### 3.2.9 Rh7 beeinflusst die Pigmentierung der Komplexaugen

Die charakteristische rötliche Augenfarbe wildtypischer Fliegen kommt durch eine Mischung aus roten Pteridinen und braunen Ommochromen zustande, die in erster Linie in den Pigmentgranula der Pigmentzellen zu finden sind. Entsprechend der unterschiedlichen Synthesewege sind für die Aufnahme der jeweiligen Pigmentvorstufe in die Pigmentgranula auch verschiedene ABC Transporterdimere verantwortlich. So ist ein Dimer aus White und Scarlet in der Membran der Pigmentgranula für die Aufnahme eines Intermediates des Ommochromsyntheseweges verantwortlich, wohingegen ein Dimer aus White und Brown für die Aufnahme eines Pteridin Vorläufers in die Granula sorgt (Sullivan *et al.*, 1979; Dreesen *et al.*, 1988; Mackenzie *et al.*, 1999; Mackenzie *et al.*, 2000). Folglich hat z.B. ein Fehlen von Brown in  $bw^1$  Fliegen eine im Vergleich zu wildtypischen Fliegen wie CantonS bräunliche Augenfarbe zur Folge. Fehlt hingegen wie bei  $\bar{y}w^-$  oder  $w^{1118}$  Fliegen der White Transporter, so sind die Augen vollständig unpigmentiert (Mackenzie *et al.*, 1999) (Abb. 25A).

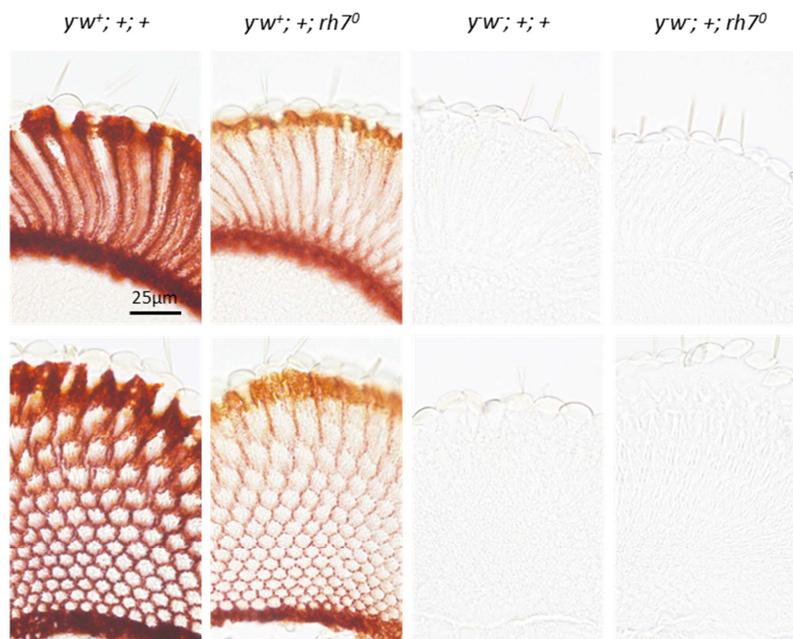


**Abb. 25: Aufnahmen der Komplexaugen von ABC Transportermutanten und  $rh7$  Knockout-Fliegen**

Fliegen, die das  $bw^1$  Allel homozygot tragen zeigen eine im Vergleich zu CantonS bräunliche Augenfarbe. Fehlt wie im Falle der  $yw^-$  und  $w^{118}$  Fliegen das White Protein, so sind die Augen vollständig unpigmentiert und dementsprechend weiß (A). Die in den  $w^+$  Hintergrund gebrachte  $rh7$  Knockout-Kontrolle ( $yw^+; +; +$ ) zeigt eine wildtypische rötliche Augenfarbe. Im Gegensatz dazu zeigen die in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzten  $rh7$  Knockout-Fliegen eine bräunliche, an  $bw^1$  Fliegen erinnernde Augenfarbe. Im  $w^-$  Hintergrund ist weder bei den  $rh7$  Knockout-Fliegen noch bei der Kontrolle eine Pigmentierung der Augen zu erkennen (B).

Betrachtet man nun die Augen der in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzten  $rh7$  Knockout-Fliegen und die ihrer Kontrolle, so erkennt man eine im Vergleich zu  $yw^+; +; +$  bräunlichere Augenfarbe der  $yw^+; +; rh7^0$  Fliegen (Abb. 25B). Die Augenfarbe von  $yw^+; +; +$  entspricht dabei eher der Farbe der wildtypischen CantonS Fliegen, die von  $yw^+; +; rh7^0$  hingegen eher der von  $bw^1$  Fliegen. Zwischen den Augenfarben von  $yw^-; +; +$  und  $yw^-; +; rh7^0$  zeigt sich kein Unterschied. Beide Genotypen zeigen wie auch  $w^{118}$  oder  $yw^-$  keine sichtbare Pigmentierung der Augen. Schnitte durch das Komplexauge deuten zudem darauf hin, dass bei  $yw^+; +; rh7^0$

der Pigmentgehalt im Vergleich zu  $y^w{}^+; +; +$  deutlich reduziert ist und dass diese Reduzierung hauptsächlich auf eine Verminderung des roten Pigmentgehalts zurückzuführen ist (Abb. 26).

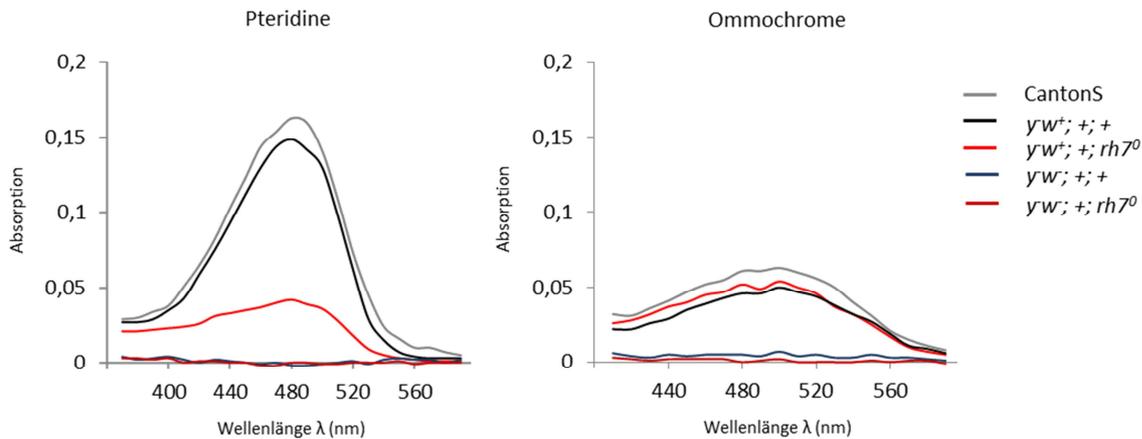


**Abb. 26: Längs- und Querschnitte durch die Komplexaugen von  $rh7$  Knockout-Fliegen**

Sowohl im Längs- (obere Reihe) als auch im Querschnitt (untere Reihe) durch das Komplexauge von  $y^w{}^+; +; +$  ist im Vergleich zu  $y^w{}^+; +; rh7^0$  eine deutlich stärkere Pigmentierung zu erkennen. Das Pigmentierungsdefizit von  $y^w{}^+; +; rh7^0$  scheint zudem auf einen Mangel an roten Pigmenten zurückzuführen zu sein. In den Schnitten durch die Augen von  $y^w; +; +$  und  $y^w; +; rh7^0$  sind keine Pigmente zu erkennen.

Als Maß für den Pteridin- und Ommochromgehalt der Augen wurden anschließend noch die Absorptionsspektren der separat in Lösung gebrachten Pigmente bestimmt (Abb. 27). Dabei gilt, dass die Absorption umso geringer ist, je niedriger der Gehalt an Pteridinen bzw. Ommochromen in der jeweiligen Lösung ist. Fehlen also wie im Falle der  $w^-$  Fliegen die Pteridine und Ommochrome, so zeigt sich auch keine Absorption der entsprechenden Lösungen. Die relativ gute Übereinstimmung der Ommochrom Absorptionsspektren von  $y^w{}^+; +; +$  mit  $y^w{}^+; +; rh7^0$  und CantonS zeigt, dass bezüglich des Ommochromgehalts der Genotypen kein großer Unterschied besteht. Die deutlich niedrigere Absorption der Pteridine von  $y^w{}^+; +; rh7^0$  im Vergleich zu  $y^w{}^+; +; +$  spricht allerdings für eine stark reduzierte Menge

an Pteridinen im Auge von  $\bar{y}w^+; +; rh7^0$  und belegt so die zuvor gezeigten Pigmentierungsunterschiede.



**Abb. 27: Absorptionsspektren der in Lösung gebrachten Pteridine und Ommochrome von  $rh7$  Knockout-Fliegen**

Die Pteridine und Ommochrome wurden gemäß dem von Eng Ooi *et al.* (1997) beschriebenen Verfahren getrennt voneinander in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Absorption der Pigmente im Photometer bestimmt. Die Extraktion der roten Pteridine erfolgte aus 8 Köpfen pro Genotyp. Für die Extraktion der braunen Ommochrome wurden jeweils 18 Köpfe verwendet. Gezeigt ist die Absorption der in Lösung gebrachten Pigmente in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts.  $\bar{y}w^+; +; +$  zeigt eine zu CantonS vergleichbare Absorption der Pteridine und Ommochrome. Für die von  $\bar{y}w^+; +; rh7^0$  extrahierten Pteridine zeigt sich eine wesentlich geringere Absorption als für die von  $\bar{y}w^+; +; +$  und CantonS. Hinsichtlich der Ommochromabsorption zeigt sich jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen den drei Genotypen. Für die Fliegen im  $w^-$  Hintergrund ergibt sich weder bei den Pteridinen noch bei den Ommochrome eine sichtbare Absorption.

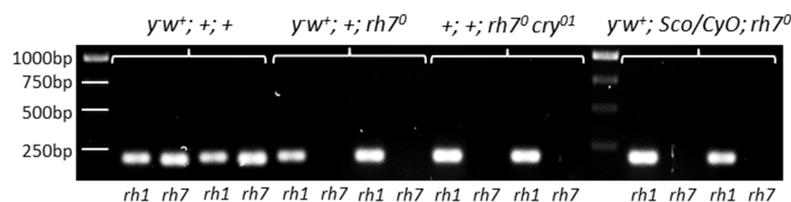
### 3.3 Der Einfluss des genetischen Hintergrundes

Der genetische Hintergrund bezeichnet allgemein die Gesamtheit des Genoms ohne die betrachtete, im Zentrum der Untersuchung stehende Mutation. Der genetische Hintergrund weist allgemein eine natürlich vorkommende genetische Variabilität auf, die innerhalb einer Population jedoch geringer als zwischen Populationen ist. Ursachen der Variabilität sind Rekombination und Mutation. Demzufolge ist es somit auch möglich, dass ein Phänotyp nicht

die Folge der betrachteten, bekannten Mutation ist, sondern durch eine unbekannte Mutation im genetischen Hintergrund verursacht wird.

### 3.3.1 Die Augenfarbe von $y^{-}w^{+}; +; rh7^{0}$ wird scheinbar durch eine Hintergrundmutation verursacht

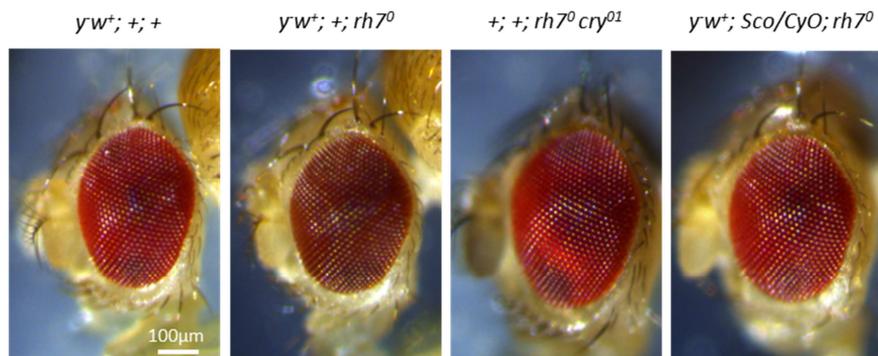
Im Zuge der Doktorarbeit von Christa Kistenpfennig (2012) wurden aus den von Wolfgang Bachleitner (2008) hergestellten  $rh7$  Knockout-Fliegen nicht nur  $y^{-}w^{+}; +; rh7^{0}$  sondern auch  $y^{-}w^{+}; Sco/CyO; rh7^{0}$  und  $+; +; rh7^{0} cry^{01}$  Fliegen gekreuzt. All diesen Genotypen ist die Deletion der codierenden Sequenz von  $rh7$ , was anhand einer PCR mit genomischer DNA überprüft wurde, gemein (Abb. 28).



**Abb. 28: Nachweis der Deletion der codierenden Sequenz des  $rh7$  Gens**

Abgebildet sind die Produkte einer PCR mit genomischer DNA von je zwei Fliegen pro Genotyp. Das verwendete  $rh7$  Primerpaar bindet innerhalb des bei  $rh7^{0}$  Fliegen deletierten Bereichs. Als Kontrolle der DNA Extraktion wurde ein  $ninaE$  Primerpaar verwendet, das innerhalb des Gens von Rhodopsin 1 bindet.  $+; +; rh7^{0} cry^{01}$  und  $y^{-}w^{+}; Sco/CyO; rh7^{0}$  zeigen wie auch  $y^{-}w^{+}; +; rh7^{0}$  kein PCR Produkt bei Verwendung der  $rh7$  Primer.

Dementsprechend sollten die Genotypen  $y^{-}w^{+}; Sco/CyO; rh7^{0}$  und  $+; +; rh7^{0} cry^{01}$  ebenfalls eine bräunlichere Augenfarbe aufweisen, sofern der zuvor gezeigte Unterschied zwischen den Augenfarben von  $y^{-}w^{+}; +; +$  und  $y^{-}w^{+}; +; rh7^{0}$  tatsächlich auf das Fehlen von Rh7 zurückzuführen ist. Allerdings zeigen weder  $y^{-}w^{+}; Sco/CyO; rh7^{0}$  noch  $+; +; rh7^{0} cry^{01}$  eine zu  $y^{-}w^{+}; +; rh7^{0}$  vergleichbare, bräunliche Augenfarbe (Abb. 29). Die Augen beider Genotypen sind eher wildtypisch rötlich wie bei CantonS oder  $y^{-}w^{+}; +; +$  gefärbt.



**Abb. 29: Aufnahmen der Komplexaugen verschiedener *rh7* Knockout-Fliegen**

Weder  $+; +; rh7^0 cry^{01}$  noch  $yw^+; Sco/CyO; rh7^0$  Fliegen haben eine mit  $yw^+; +; rh7^0$  vergleichbare, bräunliche Augenfarbe. Beide Genotypen zeigen eher wie auch  $yw^+; +; +$ , eine wildtypisch rötliche Färbung der Augen.

Somit scheint der zwischen  $yw^+; +; +$  und  $yw^+; +; rh7^0$  gefundene Unterschied in der Augenpigmentierung nicht auf fehlendes Rh7 zurückzuführen zu sein, sondern eher auf einer anderen, zusätzlichen Mutation im Genom der  $yw^+; +; rh7^0$  Fliegen zu basieren.

Der Augenfarbenunterschied zwischen  $yw^+; +; +$  und  $yw^+; +; rh7^0$ , die vermutlich ein identisches X Chromosom besitzen, sowie zwischen  $yw^+; Sco/CyO; rh7^0$  und  $yw^+; +; rh7^0$ , deren drittes Chromosom identisch ist, legt dabei nahe, dass das erste und das dritte Chromosom nicht Träger der Hintergrundmutation sind (Kistenpfennig, 2012).

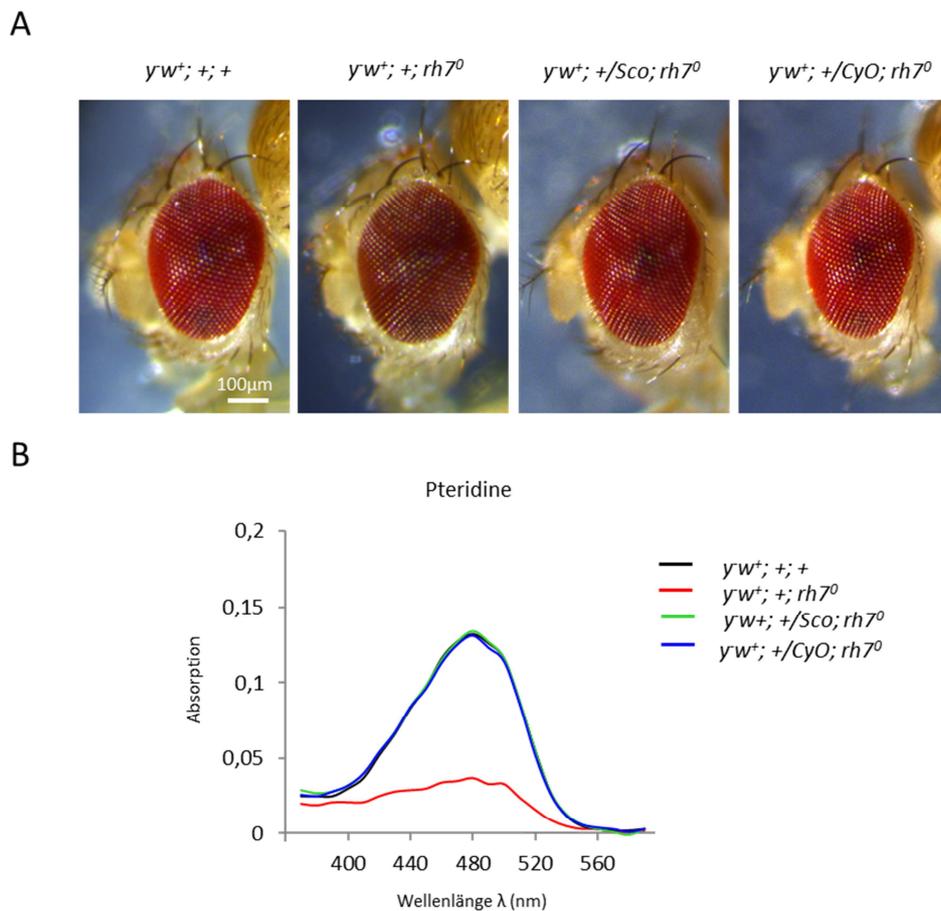
#### 3.3.2 Die Hintergrundmutation ist rezessiv

Um herauszufinden, ob die vermutlich auf dem zweiten Chromosom gelegene Hintergrundmutation dominant oder rezessiv ist wurden  $yw^+; +; rh7^0$  Weibchen mit  $yw^+; Sco/CyO; rh7^0$  Männchen gekreuzt und die Augenfarben der F1 Generation untersucht (Abb. 30A).

Weder  $yw^+; +/Sco; rh7^0$  noch  $yw^+; +/CyO; rh7^0$ , die beide heterozygot für das zweite Chromosom von  $yw^+; +; rh7^0$  sind, zeigen eine bräunliche Augenfarbe. Beide zeigen eine wildtypisch rötliche Färbung der Augen. Dementsprechend zeigen  $yw^+; +/Sco; rh7^0$  und

$yw^+; +/CyO; rh7^0$  auch einen im Vergleich zu  $yw^+; +; rh7^0$  deutlich erhöhten und mit  $yw^+; +; +$  identischen Pteridingehalt (Abb. 30B).

Eine Heterozygotie für die Hintergrundmutation scheint folglich nicht auszureichen, um den Phänotyp der Augenfarbe vollständig oder auch nur teilweise zu induzieren. Dies spricht dafür, dass es sich um eine rezessive Hintergrundmutation handelt.



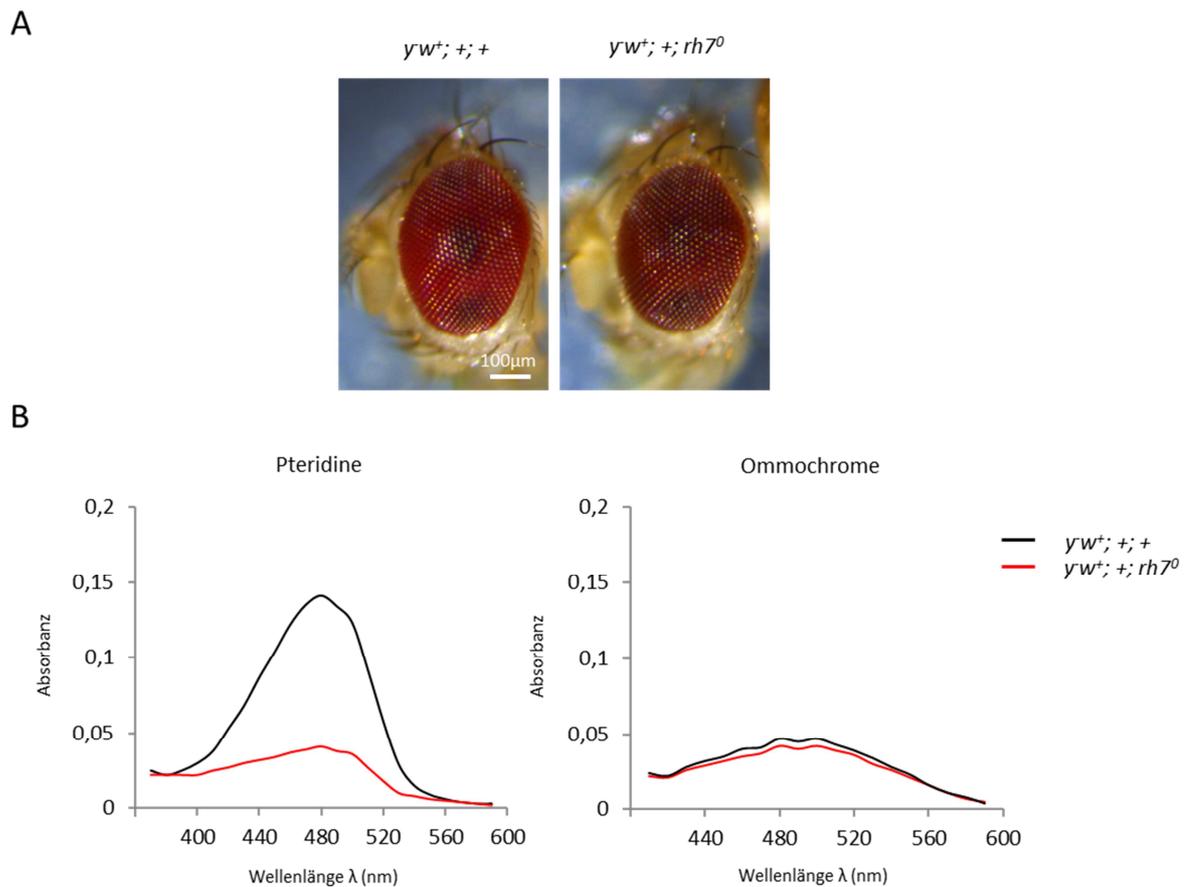
**Abb. 30: Aufnahmen der Komplexaugen und Absorptionsspektren der extrahierten Pteridine von  $rh7$  Knockout-Fliegen mit verändertem Chromosomenpaar II**

In der Parentalgeneration wurden  $yw^+; +; rh7^0$  Weibchen mit  $yw^+; Sco/CyO; rh7^0$  Männchen gekreuzt. Die in der F1 Generation erhaltenen Fliegen  $yw^+; +/Sco; rh7^0$  und  $yw^+; +/CyO; rh7^0$  zeigen keine mit  $yw^+; +; rh7^0$  vergleichbare, bräunliche Augenfarbe. Ihre Augen haben eine rötliche Farbe, ähnlich der von  $yw^+; +; +$  (A). Zur Quantifizierung des Pteridingehalts wurden die Pteridine aus jeweils 8 Köpfen pro Genotyp extrahiert, in Lösung gebracht und im Photometer vermessen. Die Absorption der Pteridinlösung von  $yw^+; +/Sco; rh7^0$  und  $yw^+; +/CyO; rh7^0$  ist im Vergleich zu  $yw^+; +; rh7^0$  deutlich erhöht. Verglichen mit dem Absorptionsspektrum der Pteridine von  $yw^+; +; +$  zeigt sich kein Unterschied zu  $yw^+; +/Sco; rh7^0$  und  $yw^+; +/CyO; rh7^0$  (B).

#### 3.3.3 Die Hintergrundmutation ist bereits bei $y^-w^-; +; rh7^0$ vorhanden

Die bei  $y^-w^+; +; rh7^0$  vorhandene Hintergrundmutation könnte bereits bei  $y^-w^-; +; rh7^0$  vorhanden sein oder auch erst durch das Kreuzen dieser Fliegen in den  $w^+$  Hintergrund ins Genom eingebracht worden sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Genotypen  $y^-w^-; +; rh7^0$  und  $y^-w^-; +; +$  durch Kreuzen mit  $y^-w^+; Sco/CyO; MKRS/TM6B$  erneut in den  $w^+$  Hintergrund gebracht. Dabei wurden stets nur die Fliegen weitergekreuzt, die heterozygot für die Balancer-Chromosomen *CyO* (Curly of Oster) und *TM6B* (Third Multiple 6B) des zweiten und dritten Chromosomenpaares waren (Chyb und Gompel, 2013). Durch die zahlreichen Inversionen innerhalb der Balancer-Chromosomen wird so eine homologe Rekombination zwischen den Chromosomen verhindert und dadurch sichergestellt, dass es zu keinem Verlust des zweiten und dritten Chromosoms der Ausgangsstämme im Verlauf der Kreuzungen kommt.

Wie bereits zuvor zeigen die neu in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzten *rh7* Knockout-Fliegen eine deutlich dunklere, weniger rötliche Augenfarbe als ihre Kontrollen und einen deutlichen Mangel an Pteridinen (Abb. 31). Dies deutet darauf hin, dass die Hintergrundmutation bereits bei den weißäugigen *rh7* Knockout-Fliegen vorhanden ist, auch wenn sie dort aufgrund der generell fehlenden Augenpigmentierung nicht sichtbar ist.



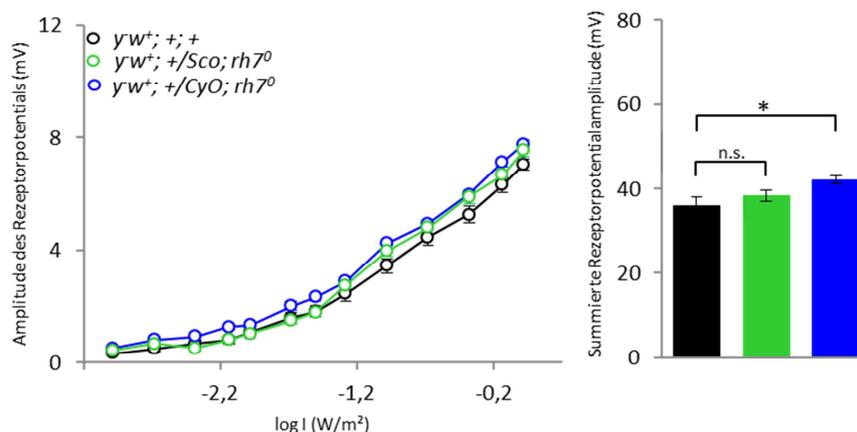
**Abb. 31: Aufnahmen der Komplexaugen und Absorptionsspektren der Augenpigmente von erneut in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzten  $rh7$  Knockout-Fliegen**

Die Stämme  $yw^+; +; rh7^0$  und  $yw^+; +; +$  wurden erneut in den  $w^+$  Hintergrund gekreuzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass im Zuge der Kreuzungen jeweils nur das X Chromosom ausgetauscht wird. Nach Austausch des X-Chromosoms zeigen die  $yw^+; +; rh7^0$  Fliegen im Vergleich zu ihrer Kontrolle  $yw^+; +; +$  eine deutlich bräunlichere Augenfarbe (A). Die Pteridine wurden aus 8 Köpfen, die Ommochrome aus 18 Köpfen je Genotyp extrahiert. Für die in Lösung gebrachten Pteridine von  $yw^+; +; rh7^0$  ergibt sich eine im Vergleich zu  $yw^+; +; +$  deutlich reduzierte Absorption. Zwischen den Absorptionsspektren der extrahierten Ommochrome zeigt sich kein deutlicher Unterschied (B).

### 3.3.4 Die Rezeptorpotentialamplitude von $y^w{}^+; +; rh7^0$

Mit abnehmender Pigmentierung der Augen steigt insgesamt die Lichtempfindlichkeit. Dies spiegelt sich in einer erhöhten ERG Rezeptorpotentialamplitude wider (Hengstenberg und Götz, 1967; Stark, 1972; Stark und Wassermann, 1972).

Folglich könnte die im Vergleich zu  $y^w{}^+; +; +$  erhöhte Rezeptorpotentialamplitude von  $y^w{}^+; +; rh7^0$  auch auf den von Rh7 unabhängigen Mangel an Pigmenten im Auge zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob nun das Defizit an Pteridinen oder das Fehlen von Rh7 ursächlich für den Unterschied der Rezeptorpotentialamplituden ist, wurden die Intensitäts-Response Kurven für die Rezeptorpotentialamplitude von  $y^w{}^+; +/Sco; rh7^0$ ,  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  und  $y^w{}^+; +; +$  bestimmt (Abb. 32).



**Abb. 32: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden von  $y^w{}^+; +/Sco; rh7^0$  und  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$**

Die Fliegen wurden zunächst für 15min dunkeladaptiert. Anschließend wurden die Fliegen mit Weißlichtpulsen ( $t = 410\text{ms}$ ) steigender, mittlerer Intensität belichtet und die ERGs aufgezeichnet. Das Zeitintervall zwischen den Lichtpulsen betrug 20s. Gezeigt sind die Intensitäts-Response Kurven sowie die jeweils zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden, die jeweils den Mittelwert von 10 Fliegen inklusive Standardfehler wiedergeben. Zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $y^w{}^+; +; +$  und  $y^w{}^+; +/Sco; rh7^0$  ergibt sich kein signifikanter Unterschied (n.s.). Zwischen denen von  $y^w{}^+; +; +$  und  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  zeigt sich allerdings noch ein signifikanter Unterschied (\*).

Wie zuvor gezeigt weisen  $y^w{}^+; +/Sco; rh7^0$  und  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  trotz fehlender  $rh7$  CDS keinen Pigmentierungsunterschied mehr zu  $y^w{}^+; +; +$  auf. Der Vergleich der zu den Kurven

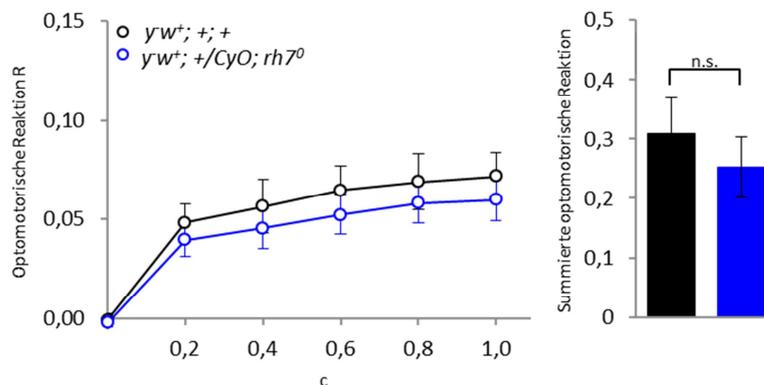
gehörenden Summen der Rezeptorpotentialamplituden ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen  $y^w^+; +; +$  und  $y^w^+; +/Sco; rh7^0$  (Wilcoxon,  $p = 0,338$ ). Ursächlich hierfür könnte allerdings die durch *Sco* bedingte Reduzierung der Rezeptorzellzahl im Auge sein, die dem Effekt von fehlendem Rh7 auf die Rezeptorpotentialamplitude möglicherweise entgegenwirkt (Birkholz *et al.*, 2009). In den folgenden Experimenten wurde deshalb auch auf die weitere Untersuchung dieser Fliegen verzichtet. Die  $y^w^+; +/CyO; rh7^0$  Fliegen zeigen allerdings eine im Vergleich zu  $y^w^+; +; +$  signifikant erhöhte summierte Rezeptorpotentialamplitude (Wilcoxon,  $p=0,034$ ).

Allerdings fällt dieser Unterschied wesentlich geringer aus als der zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $y^w^+; +; +$  und  $y^w^+; +; rh7^0$  (siehe 3.2.4). So besteht zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $y^w^+; +; +$  und  $y^w^+; +; rh7^0$  ein Unterschied von  $16,1 \pm 3,5\text{mV}$ , zwischen denen von  $y^w^+; +; +$  und  $y^w^+; +/CyO; rh7^0$  jedoch nur von  $6,4 \pm 2,5\text{mV}$ . Auch hier besteht die Möglichkeit, dass eine Beeinträchtigung der Rezeptorpotentialamplitude durch das Balancer-Chromosom *CyO* stattfindet. Bis dato ist jedoch kein Effekt der auf diesem Chromosom vorhandenen, dominanten *Cy* Mutation auf die Morphologie der Augen oder deren Funktionalität bekannt. Auch wenn dies nicht bedeutet, dass eine Beeinträchtigung des Rezeptorpotentials durch das Balancer-Chromosom *CyO* zwangsläufig ausgeschlossen werden kann, deutet dies jedoch darauf hin, dass die Abwesenheit von Rh7 im  $w^+$  Hintergrund allenfalls zu einer geringen Erhöhung der Rezeptorpotentialamplitude führt. Der unter 3.2.4 gefundene, starke Effekt auf die Depolarisation der Rezeptorzellen scheint somit hauptsächlich auf den Pigmentierungsunterschied zwischen  $y^w^+; +; +$  und  $y^w^+; +; rh7^0$  zurückzuführen zu sein.

### 3.3.5 Die optomotorische Reaktion von $y^w^+; +; rh7^0$

Je geringer die Pigmentierung des Auges, umso geringer ist auch die Kontrastempfindlichkeit der Fliegen und dementsprechend deren optomotorische Reaktion (Hengstenberg und Götz, 1967).

Aus diesem Grund wurde auch der Versuch zur optomotorischen Reaktion erneut mit  $y^w{}^+; +; +$  und  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  wiederholt (Abb. 33). Im Gegensatz zu dem zwischen  $y^w{}^+; +; +$  und  $y^w{}^+; +; rh7^0$  gefundenen Unterschied zeigt sich zwischen  $y^w{}^+; +; +$  und  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  jedoch kein signifikanter Unterschied in der optomotorischen Reaktion mehr (ANOVA,  $p = 0,481$ ). Daraus lässt sich schließen, dass die bei  $y^w{}^+; +; rh7^0$  im Vergleich zu  $y^w{}^+; +; +$  stark reduzierte optomotorische Reaktion eher auf das Pigmentierungsdefizit und nicht auf das Fehlen von Rh7 zurückzuführen ist.



**Abb. 33: Abhängigkeit der optomotorischen Reaktion von  $y^w{}^+; +/CyO; rh7^0$  vom Musterkontrast bei niedriger Musterleuchtdichte**

Frei laufenden, weiblichen Fliegen wurden nacheinander in cw und ccw Richtung rotierende Streifenmuster mit steigendem Kontrast präsentiert. Die Winkelgeschwindigkeit des Streifenmusters und die Bildwechselfrequenz betragen  $\omega = 18^\circ/s$  bzw.  $f = 1\text{Hz}$ . Für die optomotorische Reaktion R wurde jeweils die Laufaktivität in Richtung der Streifenbewegung relativ zur Laufaktivität auf das Streifenmuster zu berechnet. Gezeigt ist die optomotorische Reaktion R aufgetragen gegen den Musterkontrast c bei konstant niedriger mittlerer Musterleuchtdichte ( $\bar{l} = 50$ ). Die Kurven geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Zwischen den zugehörigen summierten optomotorischen Reaktionen ergibt sich kein signifikanter Unterschied (n.s.).

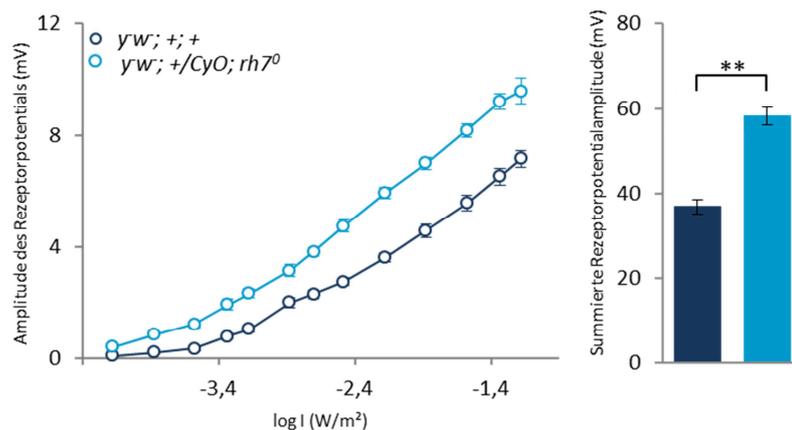
### 3.3.6 Die Rezeptorpotentialamplitude von $y^w{}^-; +; rh7^0$

Wie unter Punkt 3.3.3 gezeigt, sind bereits die  $y^w{}^-; +; rh7^0$  Fliegen Träger der Hintergrundmutation. Neben dem Einfluss auf die Pigmentierung könnte diese Mutation

noch weitere Effekte haben, die auch im  $w^-$  Hintergrund anstelle von Rh7 für den Unterschied in der Rezeptorpotentialamplitude von  $y^-w^-; +; +$  und  $y^-w^-; +; rh7^0$  sorgen.

Der Vergleich der Intensitäts-Response Kurven von  $y^-w^-; +; +$  mit  $y^-w^-; +; CyO; rh7^0$  zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Kurven (ANOVA,  $p = 0,000$ ) (Abb. 34). Wie die Intensitäts-Response Kurve von  $y^-w^-; +; rh7^0$  unter Punkt 3.2.3 zeigt auch die IRC von  $y^-w^-; +; CyO; rh7^0$  eine sichtbar größere Steigung als die von  $y^-w^-; +; +$ . Der Unterschied zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $y^-w^-; +; CyO; rh7^0$  und  $y^-w^-; +; +$  von  $21,4 \pm 2,8\text{mV}$  ist dabei ähnlich zu dem von  $24,9 \pm 3,7\text{mV}$  zwischen  $y^-w^-; +; rh7^0$  und  $y^-w^-; +; +$ .

Dies legt nahe, dass der Unterschied in der Rezeptorpotentialamplitude zwischen  $y^-w^-; +; +$  und  $y^-w^-; +; rh7^0$  in erster Linie auf das Fehlen von Rh7 zurückzuführen ist und dass die Hintergrundmutation im  $w^-$  Hintergrund nicht oder nur wenig zum Tragen kommt.



**Abb. 34: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden von  $y^-w^-; +; CyO; rh7^0$**

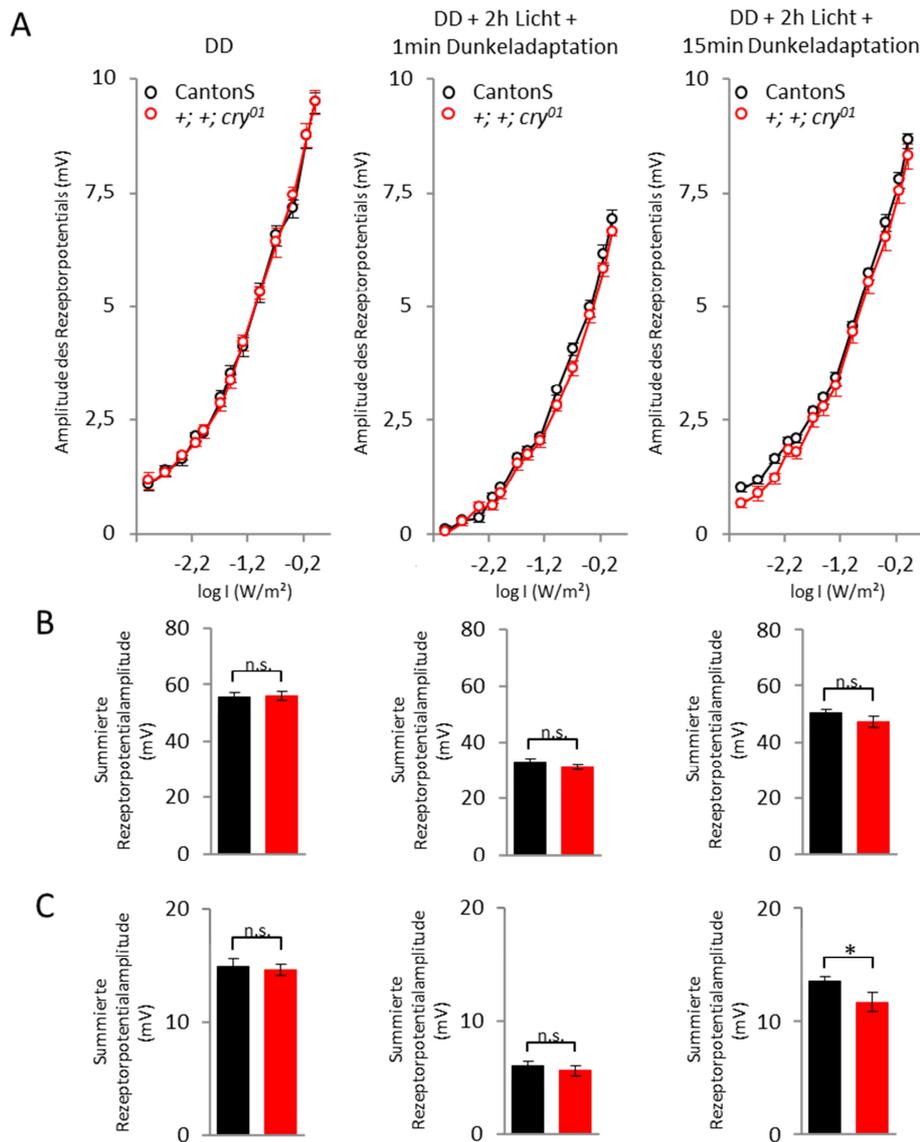
Die Fliegen wurden für 15min dunkeladaptiert und dann mit Weißlichtpulsen ( $t = 410\text{ms}$ ) steigender Intensität im niedrigen und mittleren Intensitätsbereich belichtet. Der zeitliche Abstand der Pulse betrug 20s. Die Intensitäts-Response Kurven und die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden geben den Mittelwert von je 10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $y^-w^-; +; +$  und  $y^-w^-; +; CyO; rh7^0$  zeigt sich ein signifikanter Unterschied (\*\*).

### 3.4 Der Einfluss von Cryptochrom auf die Depolarisation der Rezeptorzellen

Um den Einfluss von Cryptochrom auf die Phototransduktionskaskade näher zu untersuchen wurden die Intensitäts-Response Kurven für die ERG Rezeptorpotentialamplitude bei Belichtung mit Weißlicht von CantonS und *+*; *+*; *cry*<sup>01</sup> bestimmt. Wie von Mazotta *et al.* (2013) gezeigt kann CRY erst allerdings nach vorhergehender Lichtstimulation mit dem Gerüstprotein INAD der Phototransduktionskaskade interagieren. Dementsprechend wurden die Fliegen nach Aufzucht in vollständiger Dunkelheit (DD) für 2h bei Weißlicht niedriger Intensität gehalten bevor nach anschließender Dunkeladaptation schließlich die Elektretinogramme bei Weißlichtpulsen steigender Intensität gemessen wurden.

Abb. 35A und 35B zeigen die IRCs sowie die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden, die aus den Elektretinogrammen unmittelbar nach Aufzucht in DD bzw. nach zusätzlicher 2-stündiger Lichtadaptation, bestimmt wurden.

Allgemein kommt es durch die 2-stündige Belichtung und die damit einhergehende Lichtadaptation zunächst zu einer Rechtsverschiebung der IRCs hin zu höheren Intensitäten. Zu den hier zugrunde liegenden Adaptationsmechanismen zählen u.a. die Translokation der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins und der TRPL Kanäle aus dem Rhabdomer heraus (zusammengefasst in Wang und Montel, 1999). Die anschließende Dunkeladaptation von 1min bzw 15min wirkt entsprechend entgegengesetzt auf die Lage der Intensitäts-Response Kurven und sorgt für eine Verschiebung der Kurven hin zu niedrigeren Intensitäten. Die Verschiebung erfolgt dabei allgemein umso weiter, je länger die Fliegen dunkeladaptiert wurden. Unabhängig davon ob die Fliegen nun allerdings nur in DD (ANOVA,  $p = 0,800$ ) gehalten wurden oder im Anschluss eine 2-stündige Lichtexposition mit 1min (ANOVA,  $p = 0,279$ ) oder 15min (Kruskal-Wallis,  $p = 0,070$ ) Dunkeladaptation erfahren haben, zeigt sich kein Unterschied zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von CantonS und *+*; *+*; *cry*<sup>01</sup>.



**Abb. 35: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials und Summen der Rezeptorpotentialamplituden bei fehlendem Cryptochrom nach Aufzucht in Dunkelheit (DD) sowie anschließender 2-stündiger Lichtexposition und 1-minütiger oder 15-minütiger Dunkeladaptation**

Die Fliegen wurden 6-9 Tage im Dunkeln aufgezogen und daraufhin 2h in weißem LED Licht ( $I = 10\text{lux}$ ), gefolgt von 1min oder 15min Dunkeladaptation, gehalten. Anschließend wurden die Elektroretinogramme bei Weißlichtpulsen steigender Intensität aufgezeichnet. Die Dauer der Weißlichtpulse war  $t = 410\text{ms}$ . Das Zeitintervall zwischen den Pulsen betrug 20s. Die Intensitäts-Response Kurven (A) sowie die zugehörigen summierten Rezeptorpotentialamplituden (B) (C) geben den Mittelwert von je 7-10 Fliegen inklusive Standardfehler wieder. Vergleicht man die für die gesamten in (A) gezeigten Kurven berechneten, summierten Rezeptorpotentialamplituden (B) so zeigt sich weder nach Aufzucht in Dunkelheit noch nach anschließender 2-stündiger Lichtexposition inklusive 1-minütiger oder 15-minütiger Dunkeladaptation ein Unterschied zwischen CantonS und  $+/+; cry^{01}$  (n.s.). Betrachtet man hingegen die für die ersten sieben Lichtpulse berechneten summierten Rezeptorpotentialamplituden (C), so findet man nach 2-stündiger Lichtexposition und 15-minütiger Dunkeladaptation einen signifikanten Unterschied zwischen CantonS und  $+/+; cry^{01}$  (\*).

Betrachtet man allerdings nur die für die ERG Antworten der ersten sieben Lichtpulse berechneten Summen der Rezeptorpotentialamplituden (Abb. 35C), so zeigt sich nach 2-stündiger Lichtexposition mit anschließender 15-minütiger Dunkeladaptation ein signifikanter Unterschied zwischen CantonS und +; +; *cry*<sup>01</sup> (Kruskal-Wallis,  $p = 0,013$ ). Dieser Unterschied zeigt sich jedoch weder nachdem die Fliegen in Dunkelheit aufgezogen wurden (ANOVA,  $p = 0,745$ ) noch nach folgender 2-stündiger Lichtexposition inklusive 1min Dunkeladaptation (ANOVA,  $p = 0,587$ ). Das dieser Effekt nach 1-minütiger Dunkeladaptation nicht sichtbar ist, könnte ein Indiz dafür sein, dass ohne CRY einer der zwischen 1min und 15min Dunkelheit ablaufenden Adaptationsprozesse beeinträchtigt ist. Beispiele hierfür wären die Translokation von  $G_q\alpha$  und der TRPL Kanäle.

## 4. Diskussion

### 4.1 Rh7 ein neuer Photorezeptor?

Bedingt durch die genetische Manipulierbarkeit von *Drosophila melanogaster* ist es zum Zwecke der besseren Untersuchbarkeit nicht nur möglich *Drosophila* eigene Rhodopsine (Rh2, Rh3, Rh4, Rh5 und Rh6), sondern auch die Opsine anderer Arten in den physiologisch dominanten Rezeptorzellen R1-6 anstelle des endogenen Rh1 funktionell zu exprimieren (Feiler et al., 1988; Feiler et al., 1992; Salcedo et al., 1999; Stark und Thomas, 2004). So wurden beispielsweise auch das UV- und Blau-Opisin der Honigbiene *Apis mellifera* oder die Opsine Op8 und Op10 des Moskitos *Aedes aegypti* in R1-6 von *Drosophila melanogaster* exprimiert (Townson et al., 1998; Hu et al., 2014). Die Funktionalität all dieser Opsine wurde dabei durch die Aufnahme von Elektroretinogrammen überprüft.

Ähnlich diesen Arbeiten wurden von Wolfgang Bachleitner (2008) Fliegen hergestellt, die Rh7 in den Rezeptorzellen R1-6 exprimieren sollten. Dazu wurde ein Konstrukt bestehend aus dem *ninaE* Minimalpromotor und der codierenden Sequenz von *rh7* (Rh1-Rh7) in das Genom der Fliegen integriert. Die deutlich erhöhten *rh7* mRNA Level von  $\bar{y}w^+$ ; *Rh1-Rh7*; + und  $\bar{y}w^+$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> deuten dabei auf die Funktionalität des integrierten Konstrukts und somit auf eine Expression von Rh7 in R1-6 hin. Bestätigt werden konnte dies auch durch Antikörperfärbungen an  $\bar{y}w^+$ ; *Rh1-Rh7*; + Fliegen, die im Zuge der Doktorarbeit von Christa Kistenpfennig durchgeführten wurden (Kistenpfennig, 2012).

Vorraussetzung für die funktionelle Expression eines Opsins anstelle von Rh1 in R1-6 ist, dass die durch das Fehlen von Rh1 bedingte Rhabdomerdegeneration verhindert wird. So beugt beispielsweise die Expression von Rh2, Rh3, Rh4, Rh5 oder Rh6 anstelle von Rh1 in R1-6 einer Rhabdomerdegeneration vor, was bei entsprechender Belichtung anhand der Sichtbarkeit der virtuellen Bilder der R1-6 Rhabdomere in der tiefen Pseudopupille deutlich wird (Stark und Thomas, 2004). In der tiefen Pseudopupille von  $\bar{y}w^+$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> sind diese Bilder unter weißem LED-Licht allerdings nicht sichtbar. Voraussetzung für die Sichtbarkeit der Überlagerten virtuellen Bilder ist unter anderem eine regelmäßige Anordnung und Struktur der Rhabdomere in den Ommatidien (Franceschini, 1979). Somit könnte das Fehlen der R1-6

Rhabdomerbilder bei  $\bar{y}w$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> darauf zurückzuführen sein, dass Rh7 entgegen den anderen *Drosophila* Opsinen eine Rhabdomerdegeneration nicht vollständig verhindern kann. Ursächlich hierfür könnte der für die Aufrechterhaltung der Rhabdomerstruktur nötige und im Vergleich zu den anderen *Drosophila* Opsinen bei Rh7 stark verlängerte C-Terminus sein (Ahmad *et al.*, 2007).

Passend zur Abwesenheit der virtuellen Rhabdomerbilder von R1-6 zeigt sich bei Belichtung mit Weißlicht im ERG von  $\bar{y}w$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> auch kein Signal aus R1-6. So fehlen sowohl ein „On-“ und „Off-Transient“ als auch ein Beitrag von R1-6 zur Amplitude des Rezeptorpotentials. Auch  $\bar{y}w$ ; *Rh1-Rh7*; + Fliegen weisen im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Rezeptorpotentialamplitude auf. Dies deutet darauf hin, dass Rh7 innerhalb des für die Belichtung verwendeten Spektrums die Phototransduktionskaskade nicht aktivieren kann. Eine mögliche Begründung hierfür wird durch das bei Rh7 fehlende, für die G-Protein Interaktion nötige QAKKMNV Motiv gegeben (Franke *et al.* 1992).

Zusammengenommen legen die Untersuchungen der tiefen Pseudopupille und der Elektroretinogramme bei den Konstrukt-Fliegen nahe, dass Rh7 nicht als G-Protein gekoppelter Photorezeptor bei Wellenlängen innerhalb des verwendeten Weißlichtbereichs agieren kann.

Allerdings könnte es sich bei Rh7 allerdings auch um einen UV-Photorezeptor handeln. Unter Belichtung mit Weißlicht wird die Farbe der tiefen Pseudopupille durch die Absorption des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins bestimmt (Stark und Thomas, 2004). Dementsprechend wäre es auch möglich, dass Rh7 zwar die Degeneration der Rhabdomere in *ninaE*<sup>17</sup> Fliegen verhindert, die Bilder der Rhabdomere jedoch aufgrund mangelnder Absorption von Rh7 innerhalb des zur Visualisierung der tiefen Pseudopupille verwendeten LED-Weißlichts, dessen Spektrum typischerweise oberhalb von 400nm liegt, nicht sichtbar sind. Würde es sich bei Rh7 um einen UV-Rezeptor handeln, so wäre bei Belichtung mit dem verwendeten Weißlicht, dessen Spektrum sich ebenfalls oberhalb von etwa 400nm erstreckt (Abb. A1), vermutlich weder ein Beitrag von Rh7 zum ERG von  $\bar{y}w$ ; *Rh1-Rh7*; *ninaE*<sup>17</sup> noch zu dem von  $\bar{y}w$ ; *Rh1-Rh7*; + zu erwarten. Für die Hypothese eines Photorezeptors spricht allgemein, dass das Opsin Op10 von *Aedes aegypti*, das größte Ähnlichkeit zu *Drosophila* Rh7 aufweist, trotz fehlendem OAKKMNV Motiv die Phototransduktionskaskade in *Drosophila* aktivieren kann

(Hu *et al.*, 2014). Im Widerspruch zur Hypothese eines UV-Rezeptors steht allerdings die Tatsache, dass  $rh7^0$  Fliegen bei Belichtung mit Licht oberhalb von 400nm einen Phänotyp zeigen.

## 4.2 Die endogene Expression und Funktion von Rh7

### 4.2.1 Evaluierung des Einflusses der Hintergrundmutation auf die $rh7^0$ Phänotypen

Sowohl bei den Intensitäts-Response Kurven als auch bei der optomotorischen Reaktion zeigt sich im  $w^+$  Hintergrund ein deutlicher Unterschied zwischen den  $rh7$  Knockout-Fliegen und der Kontrolle. Allerdings unterscheiden sich die  $y^-w^+, +, rh7^0$  Fliegen von ihrer Kontrolle nicht nur durch fehlendes Rh7 sondern auch durch eine wahrscheinlich nicht auf das Fehlen des Rhodopsins zurückführbare, verminderte Augenpigmentierung. Bei der Wiederholung der Experimente mit Fliegen denen zwar Rh7, nicht jedoch Augenpigment fehlt ( $y^-w^+; +/CyO; rh7^0$ ), ergab sich kein Unterschied in der optomotorischen Reaktion zu  $y^-w^+; +; +$  mehr. Zwischen den Intensitäts-Response Kurven der Rezeptorpotentialamplitude von  $y^-w^+; +/CyO; rh7^0$  und  $y^-w^+; +; +$  zeigte sich nur noch, wenn auch signifikant, ein sehr geringer Unterschied. Auch wenn eine Beeinflussung durch das Balancer-Chromosom  $CyO$  nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, deutet dies darauf hin, dass die ursprünglich im  $w^+$  Hintergrund gefundenen Phänotypen hauptsächlich auf den Unterschied in der Augenpigmentierung und nicht auf das Fehlen von Rh7 zurückzuführen sind. Passend dazu konnten Hengstenberg und Götz (1966) zeigen, dass sich eine Reduzierung der Augenpigmentierung negativ auf die Kontrastempfindlichkeit und damit die optomotorische Reaktion auswirkt. Im Gegenzug sorgt eine Abnahme der Augenpigmentierung jedoch auch für eine Zunahme der Rezeptorpotentialamplitude (Hengstenberg und Götz, 1966; Stark, 1972; Stark und Wassermann, 1972). Rh7 scheint somit im  $w^+$  Hintergrund, allenfalls, einen geringen Einfluss auf Rezeptorpotential und optomotorische Reaktion zu haben.

Im Gegensatz dazu ergab im  $w^-$  Hintergrund nicht nur die für die Rezeptorpotentialamplitude von  $y^-w^-; +; rh7^0$ , sondern auch die für die Rezeptorpotentialamplitude von  $y^-w^-; +/CyO; rh7^0$  bestimmte IRC einen deutlichen Unterschied zu der von  $y^-w^-; +; +$ . Folglich wird davon ausgegangen, dass die Hintergrundmutation im  $w^-$  Hintergrund nicht oder nur wenig zum Tragen kommt und die im  $w^-$  Hintergrund gefundenen Phänotypen in erster Linie das Resultat des *rh7* Knockouts sind. Grund dafür, dass die Hintergrundmutation zwar im  $w^+$  nicht jedoch im  $w^-$  Hintergrund eine Rolle spielt könnte sein, dass es sich bei dem mutierten Gen um ein Gen für ein upstream von oder parallel mit White agierendes, an der Augenpigmentierung beteiligtes Protein handelt. Beispiele hierfür sind *brown (bw)*, *purple (pr)* oder *Punch (Pu)*, die alle auf dem zweiten Chromosom liegen und je nach Allel für eine rezessive bräunliche Augenfarbe, wie sie bei  $y^-w^+; +; rh7^0$  vorzufinden ist, sorgen (Mackay *et al.*, 1985; Chyb und Gompel, 2013).

Ursächlich dafür, dass Rh7 außerdem im  $w^+$  Hintergrund einen scheinbar wesentlich geringeren Einfluss auf das Rezeptorpotential hat als im  $w^-$  Hintergrund scheint die Anwesenheit der Pigmente im Komplexauge sein.

Aufgrund der vermutlich untergeordneten Rolle der Hintergrundmutation im  $w^-$  Hintergrund werden im Folgenden nur die mit den entsprechenden *rh7* Knockout-Fliegen gewonnen Ergebnisse berücksichtigt.

### 4.2.2 Die Expression von Rh7

Expressionsdaten der mRNA von Flybase legen allgemein eine sehr geringe Expression von Rh7, mit allerdings größten Mengen in Gehirn und Auge, nahe.

Fliegen ohne Komplexaugen besitzen im Vergleich zu wildtypischen Fliegen nur noch etwa 50% des *rh7* mRNA Levels, was darauf hin deutet, dass Rh7 entweder im Bereich der Retina oder der Lamina exprimiert wird (Kistenpennig, 2012). Für eine Expression von Rh7 in der Retina sprechen auch die in der vorliegenden Arbeit aufgezeichneten ERGs. So zeigen *rh7* Knockout-Fliegen bei Belichtung mit Weißlicht im mittleren Intensitätsbereich eine signifikant erhöhte Amplitude des ERG Rezeptorpotentials. Da das Rezeptorpotential seinen Ursprung in

der Retina der Fliegen hat, spricht der gefundene Unterschied zwischen Knockout und Kontrolle ebenfalls für eine *rh7* Expression in diesem Bereich (Heisenberg, 1971). Allerdings konnte eine derartige Expression mittels Antikörperfärbungen noch nicht bestätigt werden, da der zur Verfügung stehende Antikörper zwar große Mengen an Rh7 detektiert, bei der Erkennung geringer Rh7 Mengen, wie man sie aufgrund der mRNA Level erwarten würde, vermutlich jedoch scheitert (Kistenpennig, 2012). Demzufolge lassen sich zum momentanen Zeitpunkt auch keine Aussagen über die Expression von Rh7 auf zellulärer Ebene innerhalb der Retina treffen.

### 4.2.3 Rh7 scheint nicht als Photorezeptor in *Drosophila* zu agieren

Unabhängig davon, ob Rh7 nun basierend auf den ERG Untersuchungen der Konstrukt-Fliegen als Photorezeptor wirken kann, sprechen die Ergebnisse der *rh7* Knockout-Fliegen eher gegen eine endogene Funktion von Rh7 als Photorezeptor in *Drosophila*.

So widerspricht der Hypothese eines G-Protein gekoppelten Photorezeptors, dass die Abwesenheit von Rh7 im mittleren Intensitätsbereich zu einer erhöhten Rezeptorpotentialamplitude im Elektoretinogramm führt. Sowohl bei Belichtung mit Weißlicht als auch bei Belichtung mit Farblicht zeigen die *rh7* Knockout-Fliegen eine höhere lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen. Letzteres zeigt sich anhand der signifikant erhöhten Empfindlichkeit der *rh7<sup>0</sup>* Fliegen im Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude. Geht man entsprechend der mRNA Expressionsdaten und der ERG Ergebnisse davon aus, dass Rh7 im Bereich der Retina exprimiert wird, so sollte die Abwesenheit eines die Phototransduktion aktivierenden Proteins, je nach Expressionsstärke, eher einen gegenteiligen Effekt auf die lichtinduzierte Depolarisation der Rezeptorzellen sowie das daraus abgeleitete Aktionsspektrum haben. So zeigen Fliegen, die homozygot für ein hypomorphes *ninaE* Allel sind und somit über weniger Rh1 verfügen eine im mittleren Intensitätsbereich verminderte Rezeptorpotentialamplitude (Johnson und Pak, 1986). Passend dazu führt die bei *ninaA<sup>p228</sup>* Fliegen reduzierte Menge an Rh1 auch im Aktionsspektrum der Rezeptorpotentialamplitude zu einer allgemein reduzierten

Empfindlichkeit (Stephenson et al., 1983; Schneuwly *et al.*, 1989). Rh7 scheint demnach nicht als Photorezeptor in der Retina von *Drosophila* zu agieren.

#### 4.2.4 Erhöhte Rh1 Level als Ursache der *rh7<sup>0</sup>* Phänotypen?

Wie zuvor bereits angesprochen führt die Abwesenheit von Rh7 im Aktionsspektrum der ERG Rezeptorpotentialamplitude zu einer im gesamten Bereich von etwa 370-648nm um ein Vielfaches erhöhten Empfindlichkeit ohne dabei jedoch die Lage der Empfindlichkeitsmaxima im Aktionsspektrum zu verändern. Da sich bei *ninaA<sup>h228</sup>* Fliegen aufgrund eines Rh1 Mangels der genau entgegengesetzte Effekt auf das Aktionsspektrum zeigt, könnten auch erhöhte Mengen an Rh1 ursächlich für den gefundenen Effekt in *rh7<sup>0</sup>* Fliegen sein (Stephenson et al., 1983; Schneuwly et al., 1989). Auf gleiche Weise würden sich auch die bei Belichtung mit Weißlicht mittlerer Intensität im ERG gefundenen, erhöhten Rezeptorpotentialamplituden der *rh7<sup>0</sup>* Fliegen erklären lassen.

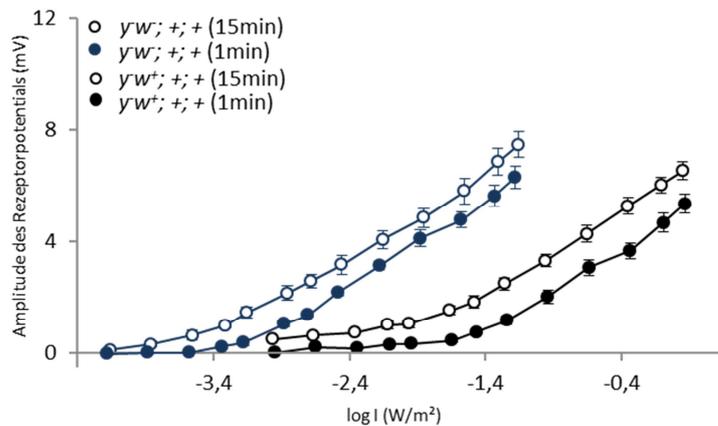
Der Hypothese eines erhöhten Rh1 Spiegels widerspricht jedoch, dass mittels qPCR bei *rh7<sup>0</sup>* Fliegen keine erhöhten Rh1 mRNA Mengen nachgewiesen werden konnten (Senthilan P, persönliche Mitteilung). Zudem sollte sich im Falle erhöhter Rh1 Spiegel vermutlich auch für den Anfangswert der untersuchten Metarhodopsin Fluoreszenz ein Unterschied zwischen dem Knockout und der Kontrolle ergeben. So zeigen *arr2* Mutanten, die nur etwa 75% des wildtypischen Pigments besitzen, eine geringere Metarhodopsin Fluoreszenz nach vorhergehender Adaptation mit monochromatischem Licht (Belusic *et al.*, 2010). Ein Überschuss an Rh1 scheint somit als Ursache für die bei *rh7<sup>0</sup>* Fliegen gefundenen Phänotypen auszuschließen.

#### 4.2.5 Der Effekt von Rh7 auf die Depolarisation der Rezeptorzellen

Die deutliche Sichtbarkeit der tiefen Pseudopupille in *rh7<sup>0</sup>* Fliegen legt nahe, dass die Abwesenheit von Rh7 die Rhabdomerstruktur und die Regelmäßigkeit der Rhabdomeranordnung nicht wesentlich beeinträchtigt (Franceschini, 1979). Passend dazu deutet auch die qualitative Betrachtung des *rh7<sup>0</sup>* ERGs darauf hin, dass die Abwesenheit von Rh7 keinen drastischen Einfluss auf die Phototransduktion hat. Trotz fehlendem Rh7 zeigen sich im ERG deutlich sichtbare Transienten sowie ein stark ausgeprägtes Rezeptorpotential. Fehlen hingegen Kernkomponenten der Phototransduktionskaskade wie Rh1, die TRP Kanäle oder die Phospholipase C<sub>β</sub>, so führt dies von stark anormalen Elektretinogrammen ohne Transienten oder ohne anhaltendes Rezeptorpotential bis hin zum vollständigen Ausbleiben eines Elektretinogrammes (Pearn et al., 1996; Wang et al., 2005; zusammengefasst in Vilinsky und Johnson, 2012).

Bei der genaueren quantitativen Analyse der ERGs zeigt sich jedoch ein Einfluss von Rh7 auf die Stärke der lichtinduzierten Depolarisation der Rezeptorzellen. So führt die Abwesenheit von Rh7 bei Belichtung mit Weißlicht im niedrigen und mittleren Intensitätsbereich nach 15-minütiger Dunkeladaptation zu einer größeren Steigung der Intensitäts-Response Kurven, die sich in einer signifikant erhöhten summierten Rezeptorpotentialamplitude äußert. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von Rh7 auf die Depolarisation der Rezeptorzellen im betrachteten Bereich von der Intensität abhängt und mit zunehmender Lichtintensität größer wird. Einen ähnlichen Einfluss auf die Steigung der Intensitäts-Response Kurven der Rezeptorpotentialamplitude hat die Pigmentierung der Komplexaugen. So zeigen die Intensitäts-Response Kurven von Fliegen ohne Augenpigmentierung bei Belichtung mit Blaulicht eine größere Steigung als die von Fliegen mit pigmentierten Augen. Grund hierfür ist, dass es bei fehlender Augenpigmentierung mit zunehmender Lichtintensität zur Rekrutierung einer größeren Anzahl von Rezeptorzellen kommt, die dann zum Rezeptorpotential des ERGs beitragen (Stark und Wassermann, 1972). Dieser Effekt der Augenpigmentierung auf die Steigung der Intensitäts-Response Kurven konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit bei Belichtung mit Weißlicht nicht bestätigt werden. Hier sorgt die

Anwesenheit der Pigmente bei Belichtung eher für eine Parallelverschiebung der Intensitäts-Response Kurven (Abb. 36).



**Abb. 36: Intensitäts-Response Kurven von  $yw^-; +; +$  und  $yw^+; +; +$  nach 1min und 15min Dunkeladaptation**

Abgebildet sind die bereits unter Punkt 3.2.3 und 3.2.4 gezeigten Intensitäts-Response Kurven von  $yw^-; +; +$  und  $yw^+; +; +$  nach jeweils 1min und 15min Dunkeladaptation. Sowohl die zunehmende Dunkeladaptation als auch die Anwesenheit der Augenpigmente scheint in einer Parallelverschiebung der Kurven entlang der x-Achse zu resultieren.

Verwendet man allerdings lange Blaulichtpulse hoher Intensität so zeigt sich kein Unterschied mehr zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $yw^-; +; +$  und  $yw^-; +; rh7^0$ . Allgemein ist die Interpretation des ERG Rezeptorpotentials bei hohen Lichtintensitäten relativ schwierig, da es im Verlauf der Belichtung nicht einfach zu einer kontinuierlichen Zunahme des Potentials kommt, sondern das Potential u.a. bedingt durch schnelle Adaptationsmechanismen einen komplexen Verlauf zeigt. Dieser äußert sich z.B. in einer im Verlauf der Belichtung eintretenden Reduzierung des Rezeptorpotentials (Belusic, 2011). Ein Beispiel für einen schnellen Adaptationsmechanismus der möglicherweise für eine Reduzierung des Rezeptorpotentials im Verlauf der Belichtung sorgt, ist die  $Ca^{2+}$  abhängige Hemmung der TRP Kanäle (Gu *et al.*, 2005). Demzufolge könnte der bei Verwendung langer Blaulichtpulse hoher Intensität fehlende Unterschied zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden von  $yw^-; +; +$  und  $yw^-; +; rh7^0$  darauf zurückzuführen sein, dass der bei  $rh7^0$  Fliegen im niedrigeren Intensitätsbereich gefundene stärkere Kationeneinstrom nun durch verstärkte Adaptationsmechanismen kompensiert wird.

Mittels des Aktionsspektrums konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Effekt von Rh7 auf die Rezeptorpotentialamplitude nicht nur durch Licht eines begrenzten Wellenlängenbereichs ausgelöst wird. Die Abwesenheit von Rh7 führt im gesamten Bereich von etwa 370-648nm zu einer deutlichen Empfindlichkeitssteigerung ohne dabei die Lage der Empfindlichkeitsmaxima im Aktionsspektrum zu beeinträchtigen. Da ein Mangel an Rh1 eine genau entgegengesetzte Wirkung auf das Aktionsspektrum hat, könnte dies ein Indiz dafür sein, dass Rh7 hemmend auf die Aktivierung der Phototransduktionskaskade und damit die Depolarisation der Rezeptorzellen durch Rh1 wirkt (Stephenson *et al.*, 1983; Schneuwly *et al.*, 1989).

Des Weiteren scheint der Effekt von Rh7 vom Adaptationszustand der Fliegen abzuhängen. So zeigt sich zwar nach 15min nicht jedoch nach 1min Dunkeladaptation ein Unterschied zwischen den summierten Rezeptorpotentialamplituden der im niedrigen und mittleren Intensitätsbereich bestimmten Intensitäts-Response Kurven von Knockout- und Kontroll-Fliegen. Dies würde nahe legen, dass Rh7 einen oder mehrere der zwischen 1min und 15min Dunkelheit ablaufenden Adaptationsprozesse beeinträchtigt. Zu diesen Prozessen zählen die im Dunkeln stattfindende, reversible Translokation der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins und der TRPL Kanäle vom Cytoplasma der Rezeptorzellen ins Rhabdomer (Cronin *et al.*, 2004; Cronin *et al.*, 2006). Bei Belichtung kommt es durch die Auswanderung der TRPL Kanäle aus dem Rhabdomer zu einer Reduzierung der ERG Rezeptorpotentialamplitude (Bähner *et al.*, 2002). Umgekehrt sollte die im Dunkeln stattfindende Rückwanderung somit in einer Erhöhung der Rezeptorpotentialamplitude resultieren. Durch die bei Belichtung stattfindende Wanderung von  $G_q\alpha$  aus dem Rhabdomer heraus wird die Wahrscheinlichkeit verringert, dass die Photonenabsorption durch das Rhodopsin in einer Depolarisation der Rezeptorzelle resultiert (Frechter *et al.*, 2007). Im Gegenzug erhöht die Einwanderung von  $G_q\alpha$  ins Rhabdomer im Dunkeln diese Wahrscheinlichkeit, was sich makroskopisch in einer gesteigerten ERG Rezeptorpotentialamplitude äußern sollte. Die Abwesenheit von Rh7 könnte demnach eine Beschleunigung eines dieser Prozesse oder auch beider Prozesse zur Folge haben. Dies ist jedoch fraglich, da eine längere und damit stärkere Dunkeladaptation eher in einer Parallelverschiebung der Intensitäts-Response Kurven bei Weißlicht resultiert. So zeigen sowohl die Intensitäts-Response Kurven von  $\bar{y}^{\bar{w}}; +; +$  als auch  $\bar{y}^{\bar{w}^{\dagger}}; +; +$  mit

zunehmender Dunkeladaptation eher eine Parallelverschiebung hin zu niedrigeren Intensitäten (Abb. 36). Die größere Steigung der Intensitäts-Response Kurve der  $rh7^0$  Fliegen unter Weißlicht nach 15-minütiger Dunkeladaptation im untersuchten Intensitätsbereich lässt sich somit nicht erklären. Dies deutet daraufhin, dass Rh7 möglicherweise selbst abhängig vom Adaptationszustand seine Wirkung entfaltet.

### 4.2.6 Das Elektretinogramm-Nachpotential

Ein wesentlicher Faktor, der die Geschwindigkeit bzw. das Ausmaß der Repolarisation des Nachpotentials bestimmt ist die Menge an gebildetem Metarhodopsin. So zeigt sich allgemein eine Zunahme des Nachpotentials mit steigendem MRh Gehalt in den Rhabdomeren (Belusic *et al.*, 2010).

Folglich könnte die 4s nach Ende des Blaulichtpulses gemessene, signifikant geringere summierte Depolarisation der  $rh7$  Knockout-Fliegen auf eine im Vergleich zur Kontrolle geringere Menge an gebildetem MRh zurückzuführen sein. Ursache dafür, dass aus einer Belichtung erhöhte MRh Mengen hervorgehen wäre beispielsweise ein insgesamt gesteigerter Gehalt an visuellem Pigment im Rhabdomer (Belusic *et al.* 2010). Aufgrund der unter Punkt 4.2.4 dargelegten Argumentation scheint dies jedoch wenig wahrscheinlich zu sein.

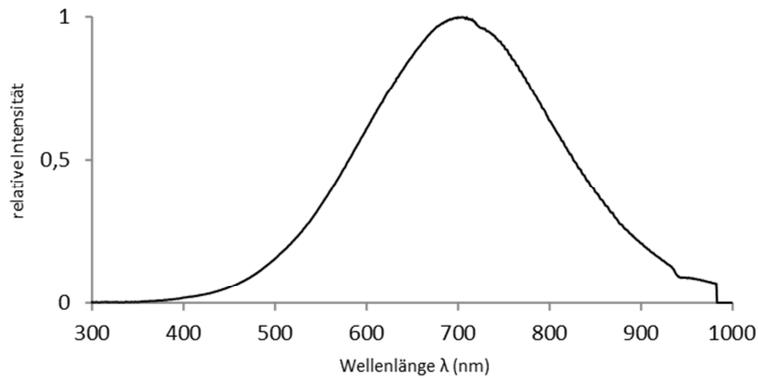
Zusätzlich zur Menge an MRh sind jedoch auch die Menge an Arr2 sowie die Translokation des Arrestins aus dem Cytoplasma ins Rhabdomer von dunkeladaptierten Fliegen wichtige Einflussfaktoren des ERG Nachpotentials. So zeigen Fliegen, die homozygot für ein hypomorphes  $arr2$  Allel sind, beispielsweise bereits bei geringeren Blaulichtintensitäten und damit einhergehend bei geringeren MRh Mengen ein maximales Nachpotential (Belusic *et al.*, 2010). Da der Verlauf der bestimmten Intensitäts-Response Kurven des Nachpotentials jedoch keinen Unterschied im Übergang zum maximalen Nachpotential zwischen  $y^{\bar{w}}; +; rh7^0$  und  $y^{\bar{w}}; +; +$  nahelegt, scheinen veränderte Mengen an Arr2 als Erklärung des 4s nach Ende des Lichtpulses gefundenen Depolarisationsunterschieds auszuschließen.

Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit von Arr2 ins Rhabdomer hinein wie sie z.B. bei *norpA<sup>P24</sup>* Fliegen, denen die Phospholipase C fehlt, auftreten sollten hingegen vermutlich umso weniger zum Tragen kommen je geringer die Menge an erzeugtem MRh und dementsprechend die Intensität des Blaulichts ist (Satoh *et al.*, 2010). Doch auch im Bereich niedrigerer Blaulichtintensitäten zeigt sich bedingt durch die scheinbare Parallelverschiebung der Intensitäts-Response Kurve des Nachpotentials durch fehlendes Rh7 keine Annäherung an die Kurve von  $\bar{y}^w; +; +$ .

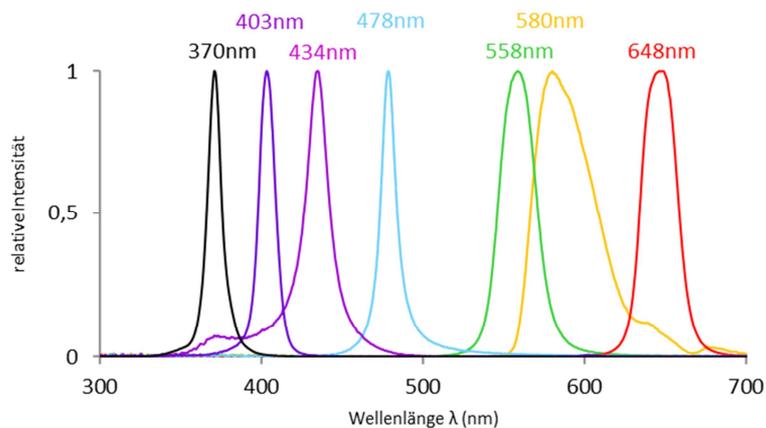
Des weiteren wäre es eventuell allerdings auch vorstellbar, dass Rh7 die Verteilung von Arr2 in der Rezeptorzelle beeinträchtigt. So wird von Satoh *et al.* (2011) vorgeschlagen, dass die bei dunkeladaptierten Fliegen gefundene 25%/75% Verteilung von Arrestin 2 durch eine niederaffine Bindung des Arrestins an einen noch unbekanntes Endomembran Bindepartner im Cytoplasma und an einen Bindepartner wie z.B. Myosin III im Rhabdomer zustande kommt (Liu *et al.*, 2008). Rh7 könnte für die Bindung von Arr2 an den cytoplasmatischen Bindepartner wichtig sein bzw. eventuell selbst als cytoplasmatischer Bindepartner agieren. In Abwesenheit von Rh7 würde sich dann ein höherer Anteil von Arr2 im Rhabdomer von dunkeladaptierten Fliegen finden. Dies hätte möglicherweise zur Konsequenz, dass *rh7<sup>0</sup>* Fliegen, wie im Experiment gezeigt, eine stets konstant geringere Depolarisation 4s nach Ende des Lichtpulses aufweisen als ihre Kontrolle ohne dabei beispielsweise die für die Induktion eines maximalen Nachpotentials nötige MRh Menge zu beeinflussen.

Ungeachtet dieser Interpretation könnte der gefundene Effekt von Rh7 auf das Nachpotential, der scheinbar in einer reinen Parallelverschiebung der Intensitäts-Response Kurve des Nachpotentials entlang der y-Achse besteht, jedoch auch auf einem systematischen Fehler beruhen. Um dies sowie die zuvor aufgestellte Hypothese zu überprüfen sind deshalb noch weitere Untersuchungen nötig.

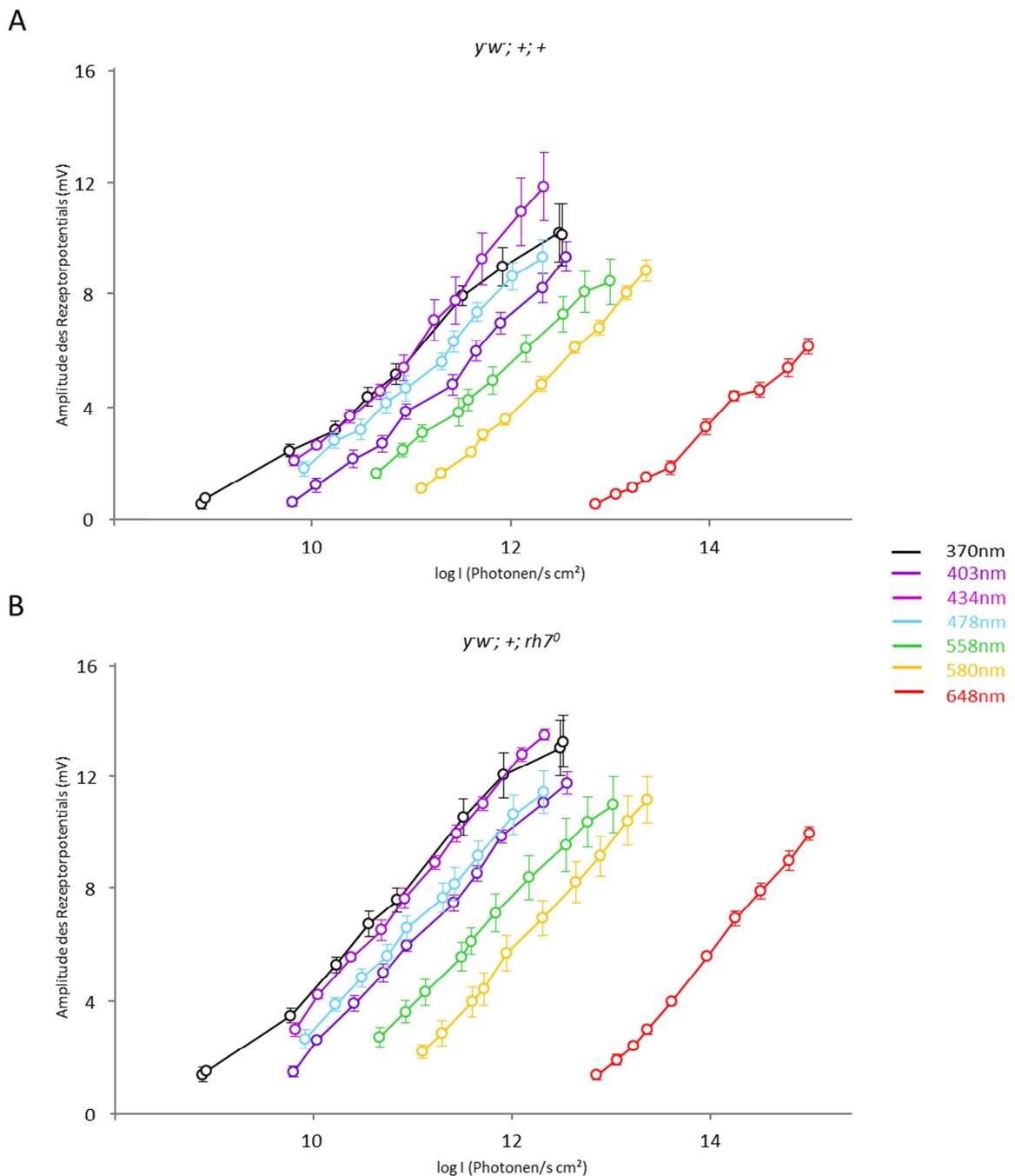
## 5. Anhang

**Abb. A1: Spektrum des zur ERG Aufzeichnung verwendeten Weißlichts**

Das Spektrum wurde inklusive KG Wärmeschutzfilter beim Austritt des Lichts aus dem Lichtleiter mittels des QE6500 Spektrophotometers gemessen. Die Intensität des Lichts betrug  $1,04\text{W/m}^2$ . Gezeigt ist die Intensität relativ zur maximalen Intensität bei  $\lambda = 700\text{nm}$  aufgetragen gegen die Wellenlänge.

**Abb. A2: Spektren des für die ERG Aufzeichnung verwendeten Farblichts**

Für die Erzeugung von Farblicht im visuellen Bereich wurden entsprechende Farbfilter zusätzlich zum KG Wärmeschutzfilter in den Strahlengang der Halogenlampe (Leitz) gebracht. Für die Belichtung mit UV-Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 370\text{nm}$ ) wurde die Halogenlampe inklusive KG Filter durch eine LED ersetzt. Die Messung der Spektren erfolgte beim Austritt des Lichts aus dem Lichtleiter mittels des QE6500 Spektrophotometers. Die Intensitäten sind jeweils relativ zur maximalen Intensität bei der angegebenen Wellenlänge ( $\lambda_{\text{max}}$ ) aufgetragen.



**Abb. A3: Intensitäts-Response Kurven für die Amplitude des Rezeptorpotentials von  $yw; +; +$  und  $yw; +; rh7^0$  bei Belichtung mit Farblicht**

Die Fliegen wurden für 15min dunkeladaptiert und dann mit Farblichtpulsen ( $t = 430\text{ms}$ ) steigender, mittlerer Intensität belichtet. Vor jedem Farblichtpuls wurde jeweils ein Weißlichtpuls ( $t = 410\text{ms}$ ) konstanter Intensität ( $I = 0,042 \text{ W/m}^2$ ) verabreicht, um einer substantiellen Verschiebung des Rh/MRh Verhältnisses im Belichtungsverlauf entgegenzuwirken. Der zeitliche Abstand zwischen den Pulsen betrug 20s. Abgebildet sind die einzelnen Intensitäts-Response Kurven von  $yw; +; +$  (A) und  $yw; +; rh7^0$  (B) die bei Belichtung mit Farblichtpulsen unterschiedlicher Wellenlänge aufgezeichnet wurden. Die Intensitäts-Response Kurven geben den Mittelwert von je 5 Fliegen inklusive Standardfehler wieder.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ et al. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Ahmad ST, Natochin M, Artemyev NO, O'Tousa JE (2007) The *Drosophila* rhodopsin cytoplasmic tail domain is required for maintenance of rhabdomere structure. *FASEB Journal* 21: 449-455

Bachleitner W (2008) Photorezeption in *Drosophila melanogaster*: Die Synchronisation der Inneren Uhr durch Mondlicht und die Anaylse von Rhodopsin 7 als neues Photopigment. Dissertation. Universität Regensburg. Regensburg

Bähner M, Frechter S, Da Silva N, Minke B, Paulsen R, Huber A (2002) Light-Regulated Subcellular Translocation of *Drosophila* TRPL Channels Induces Long-Term Adaptation and Modifies the Light-Induced Current. *Neuron* 34: 83-93

Bell ML, Earl JB, Britt SG (2007) Two Types of *Drosophila* R7 Photoreceptor Cells Are Arranged Randomly: A Model for Stochastic Cell-Fate Determination. *Journal of Comparative Neurology* 502: 75-85

Belusic G, Pirih P, Stavenga DG (2010) Photoreceptor responses of fruitflies with normal and reduced arrestin content studied by simultaneous measurements of visual pigment fluorescence and ERG. *Journal of Comparative Physiology* 196: 23-35

Belusic G (2011) ERG in *Drosophila*, Electroretinograms. *InTechOpen* DOI: 10.5772/21747

Bentrop J, Schwab K, Pak WL, Paulsen R (1997) Site-directed mutagenesis of highly conserved amino acids in the first cytoplasmic loop of *Drosophila* Rh1 opsin blocks rhodopsin synthesis in the nascent state. *EMBO Journal* 16: 1600-1609

Birkholz DA, Chou WH, Phistry MM, Britt SG (2009) Disruption of photoreceptor cell patterning in the *Drosophila Scutoid* mutant. *Fly* 3: 253-262

Borst A (2014) Fly visual course control: behavior algorithms and circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 590-599

Bownds D (1967) Site of Attachment of Retinal in Rhodopsin. *Nature* 216: 1178-1181

- Britt SG, Feiler R, Kirschfeld K, Zuker CS (1993) Spectral Tuning of Rhodopsin and Metarhodopsin In Vivo. *Neuron* 11: 29-39
- Buchner E (1976) Elementary Movement Detectors in an Insect Visual System. *Biological Cybernetics* 24: 85-101
- Cassill JA, Whitney M, Joazeiro CAP, Becker A, Zuker CS (1991) Isolation of *Drosophila* genes encoding G protein-coupled receptor kinases. *PNAS* 88: 11067-11070
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GTJ, Batschauer A, Ahmad M (2011) The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annual Reviews of Plant Biology* 62: 335-364
- Chou WH, Huber A, Bentreop J, Schulz S, Schwab K, Chadwell LV, Paulsen R, Britt SG (1999) Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* 126: 607-616
- Chyb S, Gompel N (2013) Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and Classical Mutants. *Academic Press*
- Cronin MA, Diao F, Tsunoda S (2004) Light-dependent subcellular translocation of G<sub>q</sub>α in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC. *Journal of Cell Science* 117: 4797-4806
- Cronin MA, Lieu MH, Tsunoda S (2006) Two stages of light-dependent TRPL-channel translocation in *Drosophila* photoreceptors. *Journal of Cell Science* 119: 2935-2944
- Dolezelova E, Dolezel D, Hall JC (2007) Rhythm Defects Caused by Newly Engineered Null Mutations in *Drosophila*'s *cryptochrome* Gene. *Genetics* 177: 329-345
- Dreesen TD, Johnson DH, Henikoff S (1988) The Brown Protein of *Drosophila melanogaster* Is Similar to the White Protein and to Components of Active Transport Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 8: 5206-5215
- Eng Ooi C, Moreira JE, Dell'Angelica EC, Poy G, Wassarman DA, Bonifacino JS (1997) Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant *garnet*. *EMBO Journal* 16: 4508-4518
- Fedele G, Edwards MD, Bhutani S, Hares JM, Murbach M, Green EW, Dissel S, Hastings MH, Rosato E, Kyriacou CP (2014) Genetic Analysis of Circadian Responses to Low Frequency Electromagnetic Fields in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics* 10: e1004804
- Feiler R, Harris WA, Kirschfeld K, Wehrhahn C, Zuker CS (1988) Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin leads to altered visual function. *Nature* 333: 737-741

Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismar D, Rubin GM, Smith DP, Socolich M, Zuker CS (1992) Ectopic Expression of Ultraviolet-Rhodopsins in the Blue Photoreceptor Cells of *Drosophila*: Visual Physiology and Photochemistry of Transgenic Animals. *Journal of Neuroscience* 12: 3862-3868

Fortini ME, Rubin GM (1990) Analysis of *cis*-acting requirements of the *Rh3* and *Rh4* genes reveals a bipartite organization to rhodopsin promoters in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 4: 444-463

Franceschini N (1979) Pupil and Pseudopupil in the Compound Eye of *Drosophila*. *Information Processing in the Visual System of Arthropods*. Springer-Verlag: 75-82

Franke RR, Sakmar TP, Graham RM, Khorana HG (1992) Structure and Function in Rhodopsin: Studies of the interaction between the Rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *Journal of Biological Chemistry* 267: 14767-14774

Frechter S, Minke B (2006) Light-regulated translocation of signalling proteins in *Drosophila* photoreceptors. *Journal of Physiology-Paris* 99: 133-139

Frechter S, Elia N, Tzarfaty V, Selinger Z, Minke B (2007) Translocation of G<sub>q</sub>α Mediates Long-Term Adaptation in *Drosophila* Photoreceptors. *Journal of Neuroscience* 27: 5571-5583

Gaumer S, Guénel I, Brun S, Théodore L, Mignotte B (2000) Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 7: 804-814

Gegeer R, Casselman A, Waddell S, Reppert SM (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454: 1014-1019

Goldsmith TH, Marks BC, Bernard GD (1986) Separation and identification of geometric isomers of 3-hydroxyretinoids and occurrence in insects. *Vision Research* 26: 1763-1769

Götz KG (1964) Optomotorische Untersuchungen des visuellen Systems einiger Augenmutanten der Fruchtfliege *Drosophila*. *Kybernetik* 2: 77-92

Gu Y, Oberwinkler J, Postma M, Hardie RC (2005) Mechanisms of Light Adaptation in *Drosophila* Photoreceptors. *Current Biology* 15: 1228-1234

Han J, Gong P, Reddig K, Mitra M, Guo P, Li HS (2006) The Fly CAMTA Transcription Factor Potentiates Deactivation of Rhodopsin, a G Protein-Coupled Light Receptor. *Cell* 127: 847-858

Hardie RC (2012) Phototransduction mechanisms in *Drosophila* microvillar photoreceptors. *WIREs Membr Transp Signal* 1:162–187. doi: 10.1002/wmts.20

Harris WA, Ready DF, Lipson ED, Hudspeth AJ, Stark WS (1977) Vitamin A deprivation and *Drosophila* photopigments. *Nature* 266: 648-650

- Heisenberg M (1971) Separation of Receptor and Lamina Potentials in the Electroretinogram of Normal and Mutant *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* 55: 85-100
- Heisenberg M, Buchner E (1977) The Role of Retinula Cell Types in Visual Behavior of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology* 117: 127-162
- Heisenberg M, Böhl K (1979) Isolation of Anatomical Brain Mutants of *Drosophila* by Histological Means. *Zeitschrift für Naturforschung* 34c: 143-147
- Heisenberg M, Wolf R (1984) *Vision in Drosophila*. Springer, New York
- Helfrich-Förster C, Edwards T, Yasuyama K, Wisotzki B, Schneuwly S, Stanewsky R, Meinertzhagen IA, Hofbauer A (2002) The Extraretinal Eyelet of *Drosophila*: Development, Ultrastructure, and Putative Circadian Function. *Journal of Neuroscience* 22: 9255-9266
- Hengstenberg R, Götz KG (1967) Der Einfluss des Schirmpigmentgehalts auf die Helligkeits- und Kontrastwahrnehmung bei *Drosophila*-Augenmutanten. *Kybernetik* 3: 276-285
- Hofbauer A, Buchner E (1989) Does *Drosophila* Have Seven Eyes. *Naturwissenschaften* 76: 335-336
- Hsiao HY, Johnston R, Jukam D, Vasiliasukas D, Desplan C, Rister J (2012) Dissection and Immunohistochemistry of Larval, Pupal and Adult *Drosophila* Retinas. *Journal of Visualized Experiments* 69: e4347
- Hu KG, Reichert H, Stark WS (1978) Electrophysiological Characterization of *Drosophila* Ocelli. *Journal of Comparative Physiology* 126: 15-24
- Hu X, Leming MT, Whaley MA, O'Tousa JA (2014) Rhodopsin coexpression in UV photoreceptors of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Journal of Experimental Biology* 217: 1003-1008
- Imamoto Y, Shichida Y (2013) Cone visual pigments. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837: 664-673
- Johnson EC, Pak WL (1986) Electrophysiological Study of *Drosophila* Rhodopsin Mutants. *Journal of General Physiology* 88: 651-673
- Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG (1988) Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *PNAS* 85: 8459-8463
- Kaushik R, Nawathean P, Busza A, Murad A, Emery P, Rosbash M (2007) PER-TIM Interactions with the Photoreceptor Cryptochrome Mediate Circadian Temperature Responses in *Drosophila*. *PLoS Biology* 5: 1257-1266

- Kastberger G (1990) The ocelli control the flight course in honeybees. *Physiological Entomology* 15: 337-346
- Katanosaka K, Tokunaga F, Kawamura S, Ozaki K (1998) N-linked glycosylation of *Drosophila* rhodopsin occurs exclusively in the amino-terminal domain and functions in rhodopsin maturation. *FEBS Journal* 424: 149-154
- Kirschfeld K, Franceschini N (1968) Ein Mechanismus zur Steuerung des Lichtflusses in den Rhabdomeren des Komplexauges von *Musca*. *Kybernetik* 6: 13-22
- Kirschfeld K, Franceschini N, Minke B (1977) Evidence for a sensitising pigment in fly photoreceptors. *Nature* 269: 386-390
- Kistenpfennig C (2012) Rhodopsin 7 and Cryptochrome – circadian photoreception in *Drosophila*. Dissertation. Universität Würzburg. Würzburg
- Koh K, Zheng X, Sehgal A (2006) Jetlag resets the circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* 312: 1809-1812
- Kumar JP, Ready DF (1995) Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* 121: 4359-4370
- Lee JC, Vijay Raghavan K, Celniker SE, Tanouye MA (1995) Identification of a *Drosophila* muscle development gene with structural homology to mammalian early growth response transcription factors. *PNAS* 92: 10344-10348
- Lee SJ, Xu H, Kang LW, Amzel LM, Montell C (2003) Light Adaptation through Phosphoinositide-Regulated Translocation of *Drosophila* Visual Arrestin. *Neuron* 39: 121-132
- Lee SJ, Xu H, Montell C (2004) Rhodopsin kinase activity modulates the amplitude of the visual response in *Drosophila*. *PNAS* 110: 11874-11879
- Lilliefors HW (1967) On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *Journal of the American Statistical Association* 62: 399-402
- Lindsley DL, Grell EH (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution. Washington, DC. Publication No. 627
- Lindsley DL, Zimm GG (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc., San Diego
- Liu CH, Satoh AK, Postma M, Huang J, Ready DF, Hardie RC (2008) Ca<sup>2+</sup> dependent Metarhodopsin inactivation mediated by calmodulin and NINAC Myosin III. *Neuron* 59: 778-789

- Lo MC, Pak WL (1981) Licht-induced Pigment Granule Migration in the Retinular Cells of *Drosophila melanogaster*. *Journal of General Physiology* 77: 155-175
- Mackay WJ, Reynolds ER, O'Donnel JM (1985) Tissue-specific and Complex Complementation Patterns in the Punch locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 111: 885-904
- Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD (1999) Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1419: 173-185
- Mackenzie SM, Howells AJ, Cox GB, Ewart GD (2000) Sub-cellular localization of the White/Scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 108: 239-252
- Mazzoni EO, Celik A, Wernet MF, Vasiliasukas D, Johnston RJ, Cook TA, Pichaud F, Desplan C (2008) *Iroquois Complex* Genes Induce Co-Expression of *rhodopsins* in *Drosophila*. *PLoS Biology* 6: e97
- Mazzotta G, Rossi A, Leonardi E, Mason M, Bertolucci C, Caccin L, Spolaore B, Martin AJM, Schlichting M, Grebler R, Helfrich-Förster C, Mammi S, Costa R, Tosatto SCE (2013) Fly cryptochrome and the visual system. *PNAS* 110: 6163-6168
- Minke B, Kirschfeld K (1979) The Contribution of a Sensitizing Pigment to the Photosensitivity Spectra of Fly Rhodopsin and Metarhodopsin. *Journal of General Physiology* 73: 517-540
- Montell C (1999) Visual Transduction in *Drosophila*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 231-268
- Morante J, Desplan C (2004) Building a projection map for photoreceptor neurons in the *Drosophila* optic lobes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 15: 137-143
- O'Tousa JE, Baehr W, Martin RL, Hirsh J, Pak WL, Applebury ML (1985) The *Drosophila ninaE* Gene Encodes an Opsin. *Cell* 40: 839-850
- Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A (1999) A Role for the Proteasome in the Light Response of the Timeless Clock Protein. *Science* 285: 1737-1741
- O'Tousa JE; Baehr W, Martin RL, Hirsh J, Pak WL, Applebury ML (1985) The *Drosophila ninaE* gene encodes an opsin. *Cell* 40: 839-850
- Ozturk N, Selby CP, Annayev Y, Zhong D, Sancar A (2010) Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *PNAS* 108: 516-521
- Ozturk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A (2014) Mechanism of Photosignaling by *Drosophila* Cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry* 289: 4634-4642

Pak WL, Grossfield J, White NV (1969) Nonphototactic Mutants in a Study of Vision of *Drosophila*. *Nature* 222: 351-354

Papatsenko D, Sheng G, Desplan C (1997) A new rhodopsin in R8 photoreceptors of *Drosophila*: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells. *Development* 124: 1665-1673

Papatsenko D, Nazina A, Desplan C (2001) A conserved regulatory element present in all *Drosophila rhodopsin* genes mediates Pax6 functions and participates in the fine-tuning of cell-specific expression. *Mechanisms of Development* 101: 143-153

Paulk A, Millard SS, van Swinderen B (2013) Vision in *Drosophila*: Seeing the World Through a Model's Eye. *Annual Review of Entomology* 58: 313-332

Pearn MT, Randall LL, Shortridge RD, Burg MG, Pak WL (1996) Molecular, Biochemical and Electrophysiological Characterization of *Drosophila norpA* Mutants. *Journal of Biological Chemistry* 271: 4937-4945

Peirson SN, Halford S, Foster RG (2009) The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 2849-2865

Peschel N, Chen KF, Szabo G, Stanewsky R (2009) Light-Dependent Interactions between the *Drosophila* Circadian Clock Factors Cryptochrome, Jetlag, and Timeless. *Current Biology* 19: 241-247

Pick B, Buchner E (1979) Visual Movement Detection Under Light- and Dark-Adaptation in the Fly, *Musca domestica*. *Journal of Comparative Physiology* 134: 45-54

Pollock JA, Benzer S (1988) Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. *Nature* 333: 779-782

Ready DF, Hanson TE, Benzer S (1976) Development of the *Drosophila* Retina, a Neurocrystalline Lattice. *Developmental Biology* 53: 217-240

Rister J, Pauls D, Schnell B, Ting CY, Lee CH, Sinakevitch I, Morante J, Strausfeld NJ, Ito K, Heisenberg M (2007) Dissection of the Peripheral Motion Channel in the Visual System of *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 56: 155-170

Salcedo E, Huber A, Henrich S, Chadwell LV, Chou WH, Paulsen R, Britt SG (1999) Blue- and Green-Absorbing Visual Pigments of *Drosophila*: Ectopic Expression and Physiological Characterization of the R8 Photoreceptor Cell-Specific Rh5 and Rh6 Rhodopsins. *Journal of Neuroscience* 19: 10716-10726

- Satoh AK, Xia H, Yan L, Liu CH, Hardie RC, Ready DF (2010) Arrestin translocation is stoichiometric to rhodopsin isomerization and accelerated by phototransduction in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 67: 997-1008
- Schmidt TM, Chen SK, Hattar S (2011) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends in Neuroscience* 34: 572-580
- Schneuwly S, Shortridge RD, Larrivee DC, Ono T, Ozaki M, Pak WL (1989) *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin. *PNAS* 86: 5390-5394
- Schwemer J (1989) Visual Pigments of Compound Eyes – Structure, Photochemistry, and Regeneration. *Facets of Vision*: 112-133
- Selby CP, Sancar A (2012) The Second Chromophore in *Drosophila* Photolyase/Cryptochrome Family Photoreceptors. *Biochemistry* 51: 167-171
- Senthilan PR, Piepenbrock D, Ovezmyradov G, Nadrowski B, Bechstedt S, Pauls S, Winkler M, Möbius W, Howard J, Göpfert MC (2012) *Drosophila* Auditory Organ Genes and Genetic Hearing Defects. *Cell* 150: 1042-1054
- Shen WL, Kwon Y, Adegbola AA, Luo J, Chess A, Montell C (2011) Function of Rhodopsin in Temperature Discrimination in *Drosophila*. *Science* 331: 1333-1336
- Shichida Y, Matsuyama T (2009) Evolution of opsins and phototransduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 2881-2895
- Shoup RJ (1966) The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology* 29: 223-249
- Stark WS (1972) The Effect of Eye Color Pigments on the Action Spectrum of *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology* 19: 999-1006
- Stark WS, Wassermann GS (1972) Transient and receptor potentials in the electroretinogram of *Drosophila*. *Vision Research* 12: 1771-1775
- Stark WS, Sapp R (1988) Eye color pigment granules in wild-type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Canadian Journal of Zoology* 66: 1301-1308
- Stark WS, Thomas CF (2004) Microscopy of multiple visual receptor types in *Drosophila*. *Molecular Vision* 10: 943-955
- Stavenga DG (1983) Fluorescence of Blowfly Metarhodopsin. *Biophysics of Structure and Mechanism* 9: 309-317

Stavenga DG, Franceschini N, Kirschfeld K (1984) Fluorescence of Housefly Visual Pigment. *Photochemistry and Photobiology* 40: 653-659

Stavenga DG, Arikawa K (2008) One Rhodopsin per Photoreceptor: *Iro-C* Genes Break the Rule. *PloS Biology* 6: e115

Stephenson RS, O'Tousa J, Scavarda NJ, Randall LL, Pak WL (1983) *Drosophila* mutants with reduced rhodopsin content. *The Biology of Photoreception. Symposia of the Society of Experimental Biology* 36: 477-501

Sullivan DT, Bell LA, Paton DC, Sullivan MC (1979) Purine Transport by Malpighian Tubules of Pteridine-Deficient Eye Color Mutants of *Drosophila Melanogaster*. *Biochemical Genetics* 17: 565-573

Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biology* 6: 213

Veleri S (2005) Analysis of the light-entrainment pathways for the circadian clock of *Drosophila melanogaster*. Dissertation. Universität Regensburg. Regensburg

Vilinsky I, Johnson KG (2012) Electroretinograms in *Drosophila*: A Robust and Genetically Accessible Electrophysiological System for the Undergraduate Laboratory. *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 11: A149-A157

Thompson P, Findlay JBC (1984) Phosphorylation of ovine rhodopsin. *Biochemical Journal* 220: 773-780

Townson MS, Chang BSW, Salcedo E, Chadwell LV, Pierce NE, Britt SG (1998) Honeybee Blue- and Ultraviolet-Sensitive Opsins: Cloning, Heterologous Expression in *Drosophila*, and Physiological Characterization. *Journal of Neuroscience* 18: 2412-2422

Veleri S, Rieger D, Helfrich-Förster C, Stanewsky R (2007) Hofbauer-Buchner Eyelet Affects Circadian Photosensitivity and Coordinates TIM and PER Expression in *Drosophila* Clock Neurons. *Journal of Biological Rhythms* 22: 29-42

Vogt K, Kirschfeld K (1983) Chemical Identity of the Chromophores of Fly Visual Pigment. *Naturwissenschaften* 71: 211-212

Vogt K, Kirschfeld K (1983) Sensitizing Pigment in the Fly. *Biophysics of Structure and Mechanism* 9: 319-328

Wang T, Jiao Y, Montell C (2005) Dissecting independent channel and scaffolding roles of the *Drosophila* transient receptor potential channel. *Journal of Cell Biology* 171: 685-694

Wang T, Montell C (2007) Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 454: 821-847

Wang X, Wang T, Ni JD, von Lintig J, Montell C (2012) The *Drosophila* visual cycle and *de novo* chromophore synthesis depends on *rdhB*. *Journal of Neuroscience* 32: 3485-3491

Wicks NL, Chan JW, Najera JA, Ciriello JM, Oancea E (2011) UVA Phototransduction Drives Early Melanin Synthesis in Human Melanocytes. *Current Biology* 21: 1906-1911

Xie B, Charlton-Perkins M, Mc Donald E, Gebelein B, Cook T (2007) Senseless functions as a molecular switch for color photoreceptor differentiation in *Drosophila*. *Development* 134: 4243-4253

Yao T, Wen H, Hua Wei T, JunHai H (2012) Phototransduction in *Drosophila*. *Science China Life Sciences*. 55: 27-34

Yasuyama K, Meinertzhagen IA (1999) Extraretinal Photoreceptors at the Compound Eye's Posterior Margin in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology* 412: 193-202

Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2008) Cryptochrome Is Present in the Compound Eyes and a Subset of *Drosophila*'s Clock Neurons. *Journal of Comparative Neurology* 508: 952-966

Yoshii T, Ahmad M, Helfrich-Förster C (2009) Cryptochrome Mediates Light-Dependent Magnetosensitivity of *Drosophila*'s Circadian Clock. *PLoS Biology* 7: 813-819

Zuker CS, Cowman AF, Rubin GM (1985) Isolation and Structure of a Rhodopsin Gene from *D. melanogaster*. *Cell* 40: 851-858

## 7. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für die Detektion von Licht ist im gesamten Tierreich die Absorption von Photonen durch photorezeptive Proteine, die sogenannten Opsine und in geringerem Ausmaß die Typ 1 Cryptochrome. Die Taufliege *Drosophila melanogaster* besitzt sechs eingehend charakterisierte, auch als Rhodopsine bezeichnete Opsine (Rh1-Rh6) und ein Cryptochrom (CRY). Neben den Ocellen und den Hofbauer-Buchner Äuglein werden die Rhodopsine in erster Linie in den Photorezeptorzellen der Komplexaugen, den Hauptorganen der Lichtperzeption exprimiert, wo sie der Vermittlung der visuellen Wahrnehmung dienen. Basierend auf Sequenzvergleichen wurde im Jahr 2000 ein neues Protein namens Rh7 zur Gruppe der *Drosophila* Opsine hinzugefügt. Bis heute fehlt allerdings jeglicher experimentelle Beleg für die photorezeptive Funktion dieses Proteins.

Im Gegensatz dazu wird Cryptochrom in erster Linie in einigen Uhrneuronen des *Drosophila* Gehirns exprimiert, wo es diesen Neuronen die Fähigkeit zur Lichtdetektion verleiht und das Photoentrainment der inneren Uhr lenkt. Neueren Untersuchungen zufolge spielt CRY allerdings auch bei der visuellen Wahrnehmung der Augen eine Rolle.

Die vorliegende Arbeit zielte nun darauf ab die potentielle Funktion von Rh7 als neuen Photorezeptor in *Drosophila* sowie die Rolle von CRY bei der visuellen Lichtperzeption zu untersuchen.

Die Aufnahmen der Elektroretinogramme (ERGs) von transgenen Fliegen, die Rh7 anstelle von oder zusammen mit dem dominanten Photorezeptor Rh1 in den Komplexaugen exprimieren, zeigen, dass Rh7 die Phototransduktionskaskade bei Belichtung mit Weißlicht nicht aktivieren kann. Die Abwesenheit von Rh7 sorgt allerdings trotzdem für eine Beeinträchtigung der lichtinduzierten Antwort der Rezeptorzellen im Komplexauge. So zeigen die Intensitäts-Response Kurven der ERG Rezeptorpotentialamplitude von *rh7* Knockout-Fliegen unter Weißlicht niedriger und mittlerer Intensität nach einer anfänglichen Dunkeladaptation von 15min eine insgesamt, im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Rezeptorpotentialamplitude. Der Verlauf dieser Kurven deutet außerdem darauf hin, dass die Zunahme der Rezeptorpotentialamplitude mit steigender Lichtintensität größer wird. Zudem

zeigt das Aktionsspektrum für die Rezeptorpotentialamplitude der *rh7* Knockout-Fliegen, dass diese Empfindlichkeitszunahme im gesamten Bereich von 370-648nm auftritt. Diese Beeinträchtigung scheint jedoch zu fehlen, wenn die Fliegen vor Experimentbeginn nur 1min dunkeladaptiert wurden, oder wenn intensives Blaulicht zur Belichtung verwendet wird. Des weiteren ist auch das 4s nach Ende des Lichtpulses im ERG gemessene Nachpotential bei fehlendem Rh7 reduziert.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Rh7, wenn auch nicht als Photorezeptor, bei Belichtung mit Weißlicht niedriger und mittlerer Intensität die Lichtantwort in den Rezeptorzellen des Komplexauges in Abhängigkeit von Intensität und Adaptationszustand beeinflusst und dass dieser Einfluss scheinbar nicht durch Licht eines eng begrenzten Wellenlängenbereichs induziert wird. Des weiteren legt die Untersuchung des ERG Nachpotentials nahe, dass Rh7 möglicherweise für eine normale Beendigung der Lichtantwort benötigt wird. Die allgemeine Funktion von Rh7 als Photorezeptor in *Drosophila* sowie die Eigenschaften der endogenen Funktion von Rh7 werden diskutiert.

Unabhängig davon wird in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt, dass Fliegen ohne CRY zwar nach 15-minütiger, nicht jedoch nach 1-minütiger Dunkeladaptation bei Belichtung mit Weißlicht niedriger Intensität eine insgesamt geringere ERG Rezeptorpotentialamplitude aufweisen. Dies könnte auf eine Beeinträchtigung der Dunkeladaptationsprozesse bei Abwesenheit von CRY hindeuten.

## 8. Summary

Throughout the animal kingdom light detection is based on the absorption of photons by photoreceptive proteins, the so called opsins and to a minor degree the type 1 cryptochromes. The fruit fly *Drosophila melanogaster* possesses six well characterized opsins, also referred to as rhodopsins (Rh1-Rh6) and one cryptochrome (CRY). Besides the ocelli and the Hofbauer-Buchner eyelet, the rhodopsins are predominantly expressed in the photoreceptor cells of the compound eye, the major light receptive organ of the fly, where they mediate visual perception. Based on sequence comparisons a new protein, called Rh7, was added to the group of *Drosophila* opsins in the year 2000. But to date there is no experimental evidence for the photoreceptive function of this protein.

By contrast cryptochrome is predominantly expressed in some clock neurons of the *Drosophila* brain, where it confers light sensitivity to these neurons and guides the photoentrainment of the endogenous clock. But recent publications also envisage a role for CRY in visual perception.

The present thesis now aimed to investigate the putative function of Rh7 as a new photoreceptor in *Drosophila* as well as the role of CRY in visual perception.

Recordings of the electroretinogram (ERG) of transgenic flies, that express Rh7 instead of or together with the major photoreceptor Rh1 in the compound eye, show that Rh7 can not activate the phototransduction cascade under white-light. Nevertheless, the absence of Rh7 impairs the light induced response of the receptor cells in the compound eye. Thus, the irradiance-response curves for the ERG receptor potential of *rh7* knockout-flies show an overall increased amplitude of the receptor potential compared to controls upon illumination with white-light in the low- and mid-intensity range and after an initial dark adaptation of 15min. The curve shape also indicates that the gain in amplitude gets bigger with increasing light intensity. In addition the action spectrum for the receptor potential of *rh7* knockout-flies demonstrates that this increase in sensitivity covers the whole range from 370-648nm. However this impairment seems to be absent when flies were only allowed to dark adapt for

1min before the experiment or when intense blue light is used for illumination. Moreover also the ERG afterpotential measured 4s after lights-off is reduced in absence of Rh7.

Taken together these results indicate that Rh7, even though it might not work as a photoreceptor under white-light, alters the light response of the receptor cells in the compound eyes under low- and mid-intense white-light in an intensity and adaptation dependent manner and that this alteration seems not to be caused by light of a limited spectral range. Furthermore the analysis of the ERG afterpotential indicates that Rh7 may also be required for normal light response termination. The general function of Rh7 as a photoreceptor in *Drosophila* as well as the characteristics of the endogenous function of Rh7 are discussed.

Independently the present thesis also demonstrates that flies lacking CRY show a decreased ERG receptor potential amplitude upon illumination with low-intensity white-light when 15min but not when 1min of dark adaptation preceded the recording. This may indicate an impairment of the dark adaptation process without cryptochrome.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchung der Rolle von Rhodopsin 7 und Cryptochrom im Sehprozess von *Drosophila melanogaster*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Lebenslauf



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Förster danken, dass ich meine Doktorarbeit an ihrem Lehrstuhl und unter ihrer Betreuung machen durfte. Danke für deine stete Unterstützung, die lehrreichen, wissenschaftlichen Diskussionen, in denen wir unter anderem versuchten die Funktion von Rhodopsin 7 zu ergründen sowie für deinen ansteckenden, wissenschaftlichen Enthusiasmus.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Rössler und Dr. Robert Kittel für den im Zuge meiner Betreuung stattfindenden, regelmäßigen, wissenschaftlichen Austausch und die daraus hervorgehenden Ideen. Danke Herr Prof. Dr. Rössler auch für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Prof. Dr. Erich Buchner und Reinhard Wolf danke ich dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mir bei so manchem Problem weitergeholfen haben.

Vielen Dank an Konrad Öchsner und Hans Kaderschabek, die für jedes technische Problem eine Lösung parat haben und ohne die so manches Experiment gar nicht erst möglich wäre.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Christian Wegener, Dr. Mareike Selcho, Dr. Dennis Pauls, Dr. Christiane Luibl, Dr. Dirk Rieger, Dr. Pamela Menegazzi, Dr. Pingkalai Senthilan, Dr. Nikolai Peschel, Dr. Koustubh Vaze sowie Marie, Irina, Robin und allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für eine lehrreiche, schöne Zeit und ein tolles Arbeitsklima. Gesonderter Dank gilt Susanne Clemens-Richter und Matthias für das Anfertigen der Schnitte bzw. die Hilfe bei der Messung der Optomotor-Response.

Auch der „Graduate School of Life Sciences“ der Universität Würzburg möchte ich für die finanzielle Förderung, die zur Verfügung gestellten Mittel sowie das tolle Kursangebot danken.

Zu guter Letzt noch vielen Dank an Verena und an meine Familie dafür, dass sie mich unterstützt haben und stets für mich da waren.