

Untersuchungen zum Farbsehen und Farbenlernen
der Honigbiene (*Apis mellifera*):
vom Photorezeptor zum Verhalten

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von
Claudia Niggebrügge
aus Aachen

September 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Randolph Menzel
2. Gutachterin: Prof. Dr. Dorothea Eisenhardt

Disputation am: 27. November 2008

INHALT

1	EINLEITUNG	8
1.1	Das visuelle System der Bienen	10
1.2	Sehpigmente und Phototransduktion	12
1.3	RNA Interferenz	16
1.4	Zielstellungen der vorliegenden Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	RNA Interferenz: Herstellung doppelsträngiger RNA-Moleküle	21
2.1.1	<i>Extraktion von Gesamt-RNA</i>	21
2.1.2	<i>Erststrang cDNA-Synthese</i>	22
2.1.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	23
2.1.4	<i>Transformation</i>	23
2.1.5	<i>Präparation der Plasmid-DNA (Alkalische Lyse / Miniprep)</i>	24
2.1.6	<i>Agarose-Gel-Elektrophorese</i>	25
2.1.7	<i>Präparation der Plasmid-DNA (Alkalische Lyse / Midiprep)</i>	26
2.1.8	<i>In Vitro Transkription</i>	27
2.1.9	<i>Injektion</i>	28
2.2	In situ Hybridisierung	30
2.3	Evaluierung der mRNA Menge: Real Time PCR	31
2.3.1	<i>Versuchstiere</i>	31
2.3.2	<i>Extraktion von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese</i>	32
2.3.3	<i>Real-Time PCR</i>	32
2.3.4	<i>Auswertung</i>	33
2.4	Evaluierung der Protein Menge: SDS PAGE und Western Blot	34
2.4.1	<i>Tiere / Präparation / Behandlung der Präparate</i>	34
2.4.2	<i>SDS PAGE und Western Blot</i>	35
2.4.3	<i>Antikörper</i>	36
2.4.4	<i>Auswertung</i>	36
2.4.5	<i>Tageszeitliche Abhängigkeit der LWOP-Protein-Menge</i>	36
2.4.6	<i>Lösungen und Puffer</i>	37
2.5	Evaluierung der physiologischen Inhibition: Elektoretinogram	38
2.5.1	<i>Tiere</i>	39

2.5.2	<i>Setup</i>	39
2.5.3	<i>Reizgebung</i>	39
2.5.4	<i>Versuchsverlauf</i>	41
2.5.5	<i>Auswertung</i>	42
2.6	Verhaltensversuche: Konditionierung der Proboscis Extension Response (PER) mit visuellen Stimuli	43
2.6.1	<i>Versuchstiere</i>	44
2.6.2	<i>Versuchsaufbau</i>	44
2.6.3	<i>Verwendete Stimuli</i>	44
2.6.4	<i>Konditionierung</i>	47
2.6.5	<i>Auswertung</i>	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	RNA Interferenz: Überprüfung der Methode	49
3.1.1	<i>Datenbankgestützte Untersuchung der Spezifität der dsRNA-Sequenz</i>	49
3.1.2	<i>Injektion eines Farbstoffs in die Retina</i>	49
3.1.3	<i>In-situ Hybridisierung</i>	51
3.2	RNA Interferenz: Effekte der Injektion von dsLWOP auf Menge der mRNA	52
3.2.1	<i>Validierung der Methode</i>	52
3.2.2	<i>Effekte der dsLWOP-Injektionen</i>	54
3.2.3	<i>RNAi: Effekt auf Menge der mRNA - Zusammenfassung</i>	59
3.3	RNA Interferenz: Effekt der Injektion von dsLWOP auf Menge des Proteins	59
3.3.1	<i>Evaluation des LW-Opisin Antikörpers</i>	59
3.3.2	<i>Tageszeitliche Oszillationen der LW-Opisin Menge</i>	62
3.3.3	<i>Wirkung von RNAi auf die Proteinmenge</i>	65
3.3.4	<i>RNAi: Effekt auf Menge des Proteins - Zusammenfassung</i>	68
3.4	RNA Interferenz: Effekt der Injektion von dsLWOP auf die physiologischen Eigenschaften der Retina	68
3.4.1	<i>Normalisierte Reizantworten</i>	69
3.4.2	<i>Form der Reizantworten</i>	73
3.4.3	<i>Behandlungs- und tageszeitabhängige Ausprägung der transienten Komponenten</i>	76
3.4.4	<i>Kennlinien der On-, Off- und sustained Komponenten</i>	80

3.4.5	<i>RNAi: Effekt auf die physiologischen Eigenschaften der Retina - Zusammenfassung</i>	85
3.5	Klassische Konditionierung visueller Stimuli	85
3.5.1	<i>Absolute Konditionierung verschiedenfarbiger Stimuli</i>	85
3.5.2	<i>Absolute Konditionierung gleichfarbiger, unterschiedlich heller Stimuli</i>	87
3.5.3	<i>Differentielle Konditionierung gleichfarbiger, unterschiedlich heller Stimuli</i>	88
3.5.4	<i>Differentielle Konditionierung verschiedener Farben</i>	89
3.5.5	<i>Gedächtnis</i>	93
3.5.6	<i>Extinktion</i>	94
3.5.7	<i>Klassische Konditionierung visueller Stimuli - Zusammenfassung</i>	95
4	DISKUSSION	96
4.1	Die Wirkung von RNA Interferenz auf LW-Opsin mRNA- und Proteinmenge	96
4.1.1	<i>Verwendung eines für die Hummel entwickelten Antikörpers zur Detektion des LW-Opsin Proteins in der Honigbiene</i>	96
4.1.2	<i>Einfluss von Licht und Tageszeit auf LW-Opsin Menge</i>	97
4.1.3	<i>Limitierende Faktoren der Hemmung durch RNA Interferenz</i>	101
4.1.4	<i>Einfluss von Licht und Tageszeit auf die Wirkung der RNA Interferenz auf die LW-Opsin Menge</i>	103
4.1.5	<i>Zusammenhang zwischen LW-Opsin Menge und Empfindlichkeit der Photorezeptoren</i>	104
4.2	Die Wirkung von RNA Interferenz auf die physiologischen Eigenschaften der Retina	105
4.2.1	<i>Empfindlichkeit der Analysemethode für Änderungen in der Rezeptorantwort</i>	106
4.2.2	<i>Die Relation der ERG-Komponenten zueinander und zu Strukturen des visuellen Systems</i>	109
4.2.3	<i>Der Einfluss der Tageszeit auf die Form des ERGs</i>	110
4.3	Klassische Konditionierung visueller Stimuli in fixierten Bienen	112
4.3.1	<i>Einfluss des antennalen Inputs auf die visuelle Konditionierung fixierter Bienen</i>	113
4.3.2	<i>Reizgeneralisierung und Art des Trainings</i>	115
4.3.3	<i>Extinktion</i>	119

4.4 Ausblick	120
ZUSAMMENFASSUNG	123
ABSTRACT	125
LITERATUR	127
ABKÜRZUNGEN	146
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	147
DANKSAGUNG	150
LEBENS LAUF	151

1 EINLEITUNG

Arthropoden kommen in den verschiedensten Habitaten vor und haben unzählige Lebensstile verwirklicht. Sie leben im Wasser oder an Land, sind aktiv während des Tages oder bei Nacht, finden ihre Nahrung in farbigen Blüten oder fliegender Beute. Visuelle Stimuli gehören dabei zu den wichtigsten Reizen um das Verhalten der Umwelt anzupassen. Dementsprechend divers sind die realisierten optische Apparate: sie besitzen einfache Becheraugen, einkammrige Linsenaugen, Appositions- oder Superpositionsaugen (Land & Nilsson 2002). Aber Augen sind nur das erste Relais zur visuellen Perzeption; Informationen wie Farbe, Intensität, Bewegung oder Polarisation müssen aus den visuellen Stimuli extrahiert, in einen neuronalen Code umgewandelt und verarbeitet werden. Ebenso unterschiedlich können daher auch die neuronalen Strukturen gestaltet sein, die diese Kodierung, Verschaltung und Auslesung der für das Tier relevanten Information vornehmen.

Aufgrund der großen Vielfalt der Lebensweisen und der daraus resultierenden Anpassungen der visuellen Systeme bieten sich verschiedene Spezies als Modelle für die unterschiedlichen Phänomene an und die jahrzehntelange Forschung und stetige Entwicklung neuer Methoden hat so zu einem breiten Wissen über Aufbau und Funktion der visuellen Systeme der Arthropoden geführt. Beginnend mit der Beobachtung des Verhaltens sowohl unter natürlichen also auch experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, welche optischen Reize wahrnehmbar und relevant sind (von Frisch 1914, Ilse 1928, siehe Kelber et al. 2003). Mit molekularbiologischen Methoden wurden die Bestandteile der photorezeptiven Moleküle, Chromophore und Opsine, sowie andere Komponenten der Phototransduktion charakterisiert (siehe Gärtner 2000, Hardie 2001). Elektrophysiologische Untersuchungen der Photorezeptoren zeigten, welchen Anteil des natürlichen Spektrums die verschiedenen Arten wahrnehmen können (siehe Menzel & Backhaus 1991, Briscoe & Chittka 2001). Ableitungen von Zellen der optischen Loben und anderer Neuropile gaben Aufschluss darüber, wo und wie visuelle Informationen oder einzelne Eigenschaften visueller Stimuli (u. a. Farbe, Intensität, Bewegung, Polarisation) kodiert werden (siehe Menzel 1979, Douglass & Strausfeld 2003, Homberg 2004, Morante & Desplan 2004). Mit histologischen Methoden wurden die

Projektionsmuster und –ziele dieser visuell aktivierbaren Zellen aufgedeckt (Strausfeld 1971a, 1971b, Mobbs 1985, Ehmer & Gronenberg 2002).

Doch sind es meist nicht einzelne Neurone, die Verhalten generieren, sondern Netzwerke von Zellen. Das Verständnis der Grundprinzipien, die der Arbeitsweise neuronaler Netzwerke zugrunde liegen, ist eine der großen Herausforderungen in der Untersuchung der Funktionsweise visueller Systeme. Methoden wie opto-physiologische Messungen („calcium imaging“), die zum Beispiel zur Untersuchung der olfaktorischen Kodierung in den Antennalloben von Insekten genutzt wird (Galizia et al. 1997), lassen sich im visuellen System aufgrund der Anregung der verwendeten Farbstoffe durch Licht nur begrenzt realisieren. Die extrazelluläre simultane Ableitung von mehreren Neuronen eines Neuropils („multi-unit recording“; Buzsáki 2004), also im Idealfall von mehreren Komponenten eines Verhalten generierendes Netzwerks, birgt den Nachteil, dass einzelne Zellen nicht benannt und reproduzierbar in mehreren Tieren stimuliert werden können. Das Wissen um die Funktionsweise und Anatomie der Einheiten des visuellen Systems (Rezeptoren, Interneurone, visuelle Bahnen) ist für solche Untersuchungen unumgänglich.

Als besonders geeignet für die Erforschung eines visuellen Systems erweist sich die Honigbiene *Apis mellifera*. Wegen ihres komplexen Sozialverhaltens (Seeley 1995), ihrer Fähigkeit, schnell und robust verschiedene Stimuli zu lernen und sensorische Gedächtnisse zu bilden (Menzel & Müller 1996) sowie ihrer hoch entwickelten Sinnesleistungen (Farbsehen: siehe Menzel & Backhaus 1991; Olfaktion: siehe Galizia & Menzel 2000) und kognitiven Leistungen (siehe Giurfa & Menzel 2003) ist sie ein klassisches Invertebraten-Modellsystem für Verhaltens- und Neurobiologen. Das trichromatische Sehsystem erlaubt es ihr, neben achromatischen Stimuli wie Bewegungsreizen oder Intensitätsunterschieden in der Beleuchtung auch Farben wahrzunehmen (von Frisch 1914, Daumer 1956, von Helversen 1972). Die spektralen Empfindlichkeiten ihrer Photorezeptortypen sowie deren quantitatives Vorkommen in der Retina sind bekannt (Menzel & Blakers 1976, Peitsch et al. 1992, Wakakuwa et al. 2005), nachgeschaltete Neurone der optischen Loben und ihre Projektionen elektrophysiologisch und anatomisch mittlerweile gut charakterisiert (Menzel 1974, Kien & Menzel 1977a, b, Ribi 1974, 1975, Ribi & Scheel 1981, Mobs

1985, Hertel & Maronde 1987, de Souza et al. 1992, Ehmer & Gronenberg 2002, Yang et al. 2004). Klassische Verhaltensexperimente mit frei fliegenden oder laufenden Bienen haben gezeigt, welche visuellen Signale von den Tieren genutzt und gelernt werden und welchen Einfluss der Verhaltenskontext ausübt (Daumer 1958, Menzel 1968, Kaiser & Liske 1974, von Helversen & Edrich 1974, Menzel & Greggers 1985, Lehrer 1994, Giurfa et al. 1997). Die klassische Konditionierung fixierter Tiere erwies sich dagegen als schwierig und wenig robust (Masuhr & Menzel 1972), im Gegensatz zu der klassischen olfaktorischen Konditionierung, in der schon die einmalige Paarung eines Duftes mit einer Belohnung zu Lernen und Gedächtnis führen kann (Vareschi 1971, Bitterman et al. 1983, siehe auch Menzel 1999).

1.1 Das visuelle System der Bienen

Das Appositionsauge der Honigbiene besteht aus ca. 5000 Ommatidien mit jeweils neun Photorezeptorzellen. Deren lichtempfindlicher Teil, das Rhabdomer, wird durch Mikrovillissäume geformt, in deren Membran sich die photorezeptiven visuellen Pigmente befinden. Die Rhabdomere aller Photorezeptoren eines Ommatidiums liegen eng beieinander und bilden das Rhabdom mit Lichtleitereigenschaften (Varela & Porter 1969, Snyder et al. 1973, Skrzipek & Skrzipek 1971, 1974). Es gibt drei verschiedene Photorezeptortypen in der Retina, bezeichnet als S-, M- und L-Rezeptoren (für short, medium, long wavelength), die jeweils maximal empfindlich sind im UV-, Blau- und Grün-Spektrum des Lichts. Der für grünes (langwelliges) Licht empfindliche Photorezeptor (Grün-Rezeptor oder L-Rezeptor) ist der am häufigsten vertretene Typ in der Retina der Honigbiene (sechs von neun Photorezeptoren pro Ommatidium; Wakakuwa et al. 2005). Die Axone der Retinulazellen sind in so genannten Cartridges auf Interneurone im ersten visuellen Ganglion, der Lamina, oder durch das äußere optische Chiasma auf Zellen im zweiten visuellen Ganglion, der Medulla, verschaltet. Von dort und vom dritten visuellen Ganglion, der Lobula, die von der Medulla durch das innere optische Chiasma getrennt ist, projizieren visuelle Interneurone in das Protocerebrum, den Pilzkörper und in die visuellen Loben der kontralateralen Gehirnhälfte (Mobbs 1985, Gronenberg 1986, Hertel & Maronde 1987, Maronde 1991, Ehmer & Gronenberg 2002, Paulk et al. 2008).

Der L-Rezeptor ist wegen seiner Rolle in der parallelen Kodierung von chromatischen und achromatischen visuellen Stimuli ein interessantes Untersuchungsobjekt. Das Farbsehen in der Honigbiene wird durch Gegenfarbkodierung erreicht (Menzel & Backhaus 1991, Backhaus 1991, Vorobyev & Brandt 1997), das heißt, die Signale der drei verschiedenen Photorezeptortypen werden verrechnet, indem sie spezielle Zellen der optischen Loben auf antagonistischen Weise de- oder hyperpolarisieren (Kien & Menzel 1977a, b, Hertel 1980, Riehle 1981, Yang et al. 2004). Achromatisches Sehen hingegen ist unabhängig von der spektralen Zusammensetzung visueller Stimuli, aber empfindlich für Änderungen in der Intensität. Achromatische Kodierung basiert auf der Summation von Rezeptorsignalen mehrerer oder eines Photorezeptortyps. In der Honigbiene sind zum Beispiel die S-Rezeptoren involviert in der Navigation anhand des Polarisationsmusters des Himmels (Wehner & Rosset 1985), Bewegung wird durch den L-Rezeptor kodiert (Kaiser & Liske 1974, Lehrer et al. 1988, Lehrer 1993).

Auch im Kontext der Futtersuche und anderer visueller Verhaltensweisen, wie Kanten-, Muster- und Objekterkennung, optomotorische Reaktion, spielt der L-Rezeptor eine wichtige Rolle, so auch bei der Detektion und Diskrimination von Objekten. Diese erfolgt in Abhängigkeit von der Größe bzw. Nähe dieser Objekte alternativ mit dem chromatischen oder dem L-Rezeptor-basierten achromatischem System. Verhaltensversuche haben gezeigt, dass große bzw. nahe Objekte mit einem Sehwinkel über $\sim 15^\circ$ mit dem chromatischen System wahrgenommen werden, während zur Erkennung und Unterscheidung von Objekten mit einem Sehwinkel zwischen $\sim 5^\circ$ (dem Detektionslimit) und $\sim 15^\circ$ ein achromatischer Kontrast vorhanden sein muss (Lehrer & Bischof 1995, Giurfa et al. 1996, 1997, Giurfa & Vorobyev 1998). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die achromatische Information durch Neurone/Detektoren mit rezeptiven Feldern vermittelt wird, die sich durch einen Zentrum-Umfeld-Antagonismus auszeichnen und somit verstärkt auf Kanten reagieren (Giurfa et al. 1996, Giurfa & Vorobyev 1998, Hempel de Ibarra et al. 2001, Hempel de Ibarra & Giurfa 2003). Um welche Zellen es sich dabei handeln oder in welchen Neuropilen diese lokalisiert sein könnten, ist nicht bekannt.

Das Empfindlichkeitsmaximum des L-Rezeptors der Honigbienen-Arbeiterin liegt im Bereich um $\sim 540\text{nm}$, er ist aber über das ganze für die Biene sichtbare Spektrum

erregbar (Peitsch et al. 1992). Es ist daher nicht möglich, das Auge mit visuellen Stimuli zu reizen, ohne dass der L-Rezeptor angeregt wird. In den Verhaltensversuchen, in denen die größenabhängige Verwendung des achromatischen Systems für die Detektion und Diskrimination visueller Stimuli gezeigt wurde, konnte daher immer nur mit einem Kontrast der L-Rezeptor-Erregung gearbeitet werden. Für die genauere Untersuchung der Detektions- und Diskriminationsmechanismen, denen das achromatische System zu Grunde liegt, wäre es wünschenswert, die Population der L-Rezeptoren im Ganzen „ausschalten“ zu können. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Funktionsweise der L-Rezeptoren zu manipulieren, indem die Menge an funktionalem photorezeptiven visuellen Pigment mit Hilfe der molekularbiologischen Methode RNA Interferenz reduziert wurde.

1.2 Sehpigmente und Phototransduktion

Der erste Schritt in der optischen Wahrnehmung besteht in der Absorption eines Photons durch ein visuelles Pigment. Dieser primäre Rezeptor für den physikalischen Lichtreiz besteht aus dem Chromophor, einem Vitamin A Aldehyd (Retinal) oder einem seiner Derivate (3,4-Didehydro-, 3-Hydroxy oder 4-Hydroxy-Retinal), sowie einem Protein der Opsin-Familie. Opsine gehören zu der Superfamilie der G-Protein gekoppelten heptahelicalen Transmembranproteine. Retinal (bzw. sein Derivat) ist in der 11-cis-Konformation über eine protonierte Schiffbase mit einem Lysinrest in der siebten Transmembranhelix des Opsins verbunden. Die Absorption eines Lichtquanten durch den Chromophor führt zu einer Isomerisierung von 11-cis zur all-trans Form und damit zu einer Konformationsänderung. Dadurch wird ein G-Protein aktiviert und die für die Phototransduktion verantwortliche Kaskade ausgelöst (siehe Gärtner 2000, Terakita 2005).

Das spektrale Absorptionsmaximum von Retinal liegt im UV/Blau-Bereich (~ 440nm), die Absorption des visuellen Pigments wird moduliert durch die Protonierung der Schiffbase (~ 60nm) sowie die Interaktion verschiedener polarer oder geladener Seitenketten des Opsins mit der Schiffbase (Kochendoerfer et al. 1999, Briscoe 2001). Obwohl der Chromophor der lichtabsorbierende Teil des Moleküls ist, werden die spektralen Empfindlichkeiten der verschiedenen visuellen Pigmente eines Tieres

von den Opsinen bestimmt (da bis auf wenige Ausnahmen alle visuellen Pigmente den selben Chromophor beinhalten (Gleadal et al. 1989, Seki et al 1989)).

Neben einigen strukturell und funktionell wichtigen und daher konservierten Sequenzen in den Opsingenen (zum Beispiel der Chromophor-Bindungsstelle in der siebenten Helix) ist die Ähnlichkeit in der sekundären und tertiären Struktur zwischen den visuellen Pigmenten von Vertebraten und Invertebraten eher genereller Natur. Gemeinsame Eigenschaften wie die heptahelicale Struktur, Hydrophobie oder die Disulfidbrücken-Bildung von zwei Cysteinen zur Stabilisierung sind Merkmale aller G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Opsine der Photorezeptoren von Vertebraten und Invertebraten unterscheiden sich hinsichtlich des Orts und der Art der Glykolisierung, der Position des Gegenions der protonierten Schiffbase und anderen wichtigen Motiven ihrer Gene (Gärtner 2000, Terakita et al. 2004, Velarde et al. 2005, Plachetzki et al. 2007). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass es im gemeinsamen Vorfahr von Deuterostomiern und Protostomiern zwei Hauptabstammungslinien der Opsine gegeben haben muss. Aus einer gingen die visuellen Opsine der Invertebraten sowie das Melanopsin der Vertebraten hervor, aus der anderen die visuellen Opsine der Vertebraten, pineales Opsin, sog. Vertebrate Ancient Opsin sowie das Pteropsin der Insekten (Bellingham et al. 2002, Velarde et al. 2005).

Vertebraten und Invertebraten unterscheiden sich auch in den Phototransduktionsmechanismen (siehe Yarfiz & Hurley 1994, Shichida & Yamashita 2003). Die Photo-konvertierung von Rhodopsin zu Metarhodopsin aktiviert bei Wirbeltieren das G-Protein Transducin durch den Austausch von GTP mit GDP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Diese Untereinheit löst sich darauf vom visuellen Pigment und bindet an/aktiviert eine cGMP-Phosphodiesterase (PDE), wodurch die Konzentration von cGMP in der Zelle abnimmt. Dies führt zu der Schließung der für den Dunkelstrom verantwortlichen cGMP gesteuerten Kationen-Kanäle und somit zu einer Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle.

Bei den rhabdomerischen Photorezeptorzellen von Wirbellosen aktiviert ein Gp-Protein die Phospholipase C- β 4 (PLC- β 4), welche die Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) katalysiert. Dies führt über einen noch nicht vollständig geklärten

Mechanismus zu einer Öffnung von Kationen-Kanälen und somit der Depolarisation der Photorezeptorzelle.

Daneben finden sich Differenzen zwischen Vertebraten und Invertebraten von allem im Schicksal des Rhodopsins nach seiner Aktivierung. Die Absorption von Licht führt wie erwähnt zu einer Konformationsänderung des Opsins und somit zu einer katalytischen Aktivierung des G-Proteins und der Transduktionskaskade. Während sich bei Vertebraten der Chromophor in seiner all-trans-Konformation vom Opsin löst und in einer anderen Zelle enzymatisch in die 11-cis Form rekonvertiert wird, bleibt die Bindung zwischen Protein und Chromophor bei Invertebraten bestehen. Bei Wirbeltieren kommt es als Resultat der Lichtabsorption zum Bleichen des Farbstoffs. Das in all-trans Retinal und Opsin hydrolysierte Rhodopsin wird im retinalen Pigmentepithel durch die Dunkel-Regeneration wieder hergestellt, indem es zu einer enzymatischen Isomerisation des all-trans Chromophors in die 11-cis Form und einer spontanen Verbindung mit dem Opsin kommt (Bridges et al. 1983, siehe Lamb & Pugh 2004).

Das Rhodopsin der Invertebraten wird durch die Absorption von Licht nicht gebleicht sondern in das relativ stabile Photoprodukt Metarhodopsin umgewandelt, wobei sich Opsin und Chromophor nicht voneinander lösen. Das Empfindlichkeitsmaximum des Metarhodopsins liegt im langwelligen Bereich und die Beleuchtung mit langwelligem Licht führt zu einer Rekonvertierung zu Rhodopsin (Photoregeneration; siehe Hamdorf & Schwemer 1975). (Dies ist die Ursache für die anhaltende Depolarisierung, die im Elektroretinogram (ERG) von *Drosophila* nach Beleuchtung mit blauem Licht gemessen wird und durch langwelliges Licht aufgehoben wird (Prolonged Depolarizing Afterpotential (PDA), Hamdorf & Razmjoo 1977)). Im Dunkeln zerfällt das Metarhodopsin (mit einer viel kürzeren Halbwertszeit als Rhodopsin (Schwemer 1984)) und das all-trans Retinal löst sich vom Opsin. Eine Photoisomerase assoziiert mit dem Chromophor und katalysiert die Isomerisation von all-trans Retinal zu 11-cis-Retinal bei Beleuchtung (Honigbiene: Schwemer et al. 1984); das Vorhandensein des Chromophors in der 11-cis Konformation ist, zumindest bei Fliegen, essentiell für die Biosynthese des Opsins (Smith & Goldsmith 1991, Schwemer 1984). Dieses Recycling des all-trans Retinals ist wesentlich langsamer als die Rekonvertierung im visuellen Pigment (Photoregeneration).

In der Retina der Honigbiene werden drei verschiedene visuelle Opsine exprimiert, ihre genetische Sequenz ist bekannt: Uvop (empfindlich für kurzwelliges (UV) Licht; GeneBank ID 406127), Blop (mittelwelliges (blaues) Licht; GeneBank ID 406128) (Townson et al. 1998), Lop 1/LW Rh (langwelliges (grünes) Licht; GeneBank ID 413961) (Chang et al. 1996). Außerdem wird ein Paralog des für langwelliges Licht empfindlichen Opsins, Lop 2, in den Ocellen exprimiert (GeneBank ID 768250; Velarde et al. 2005). Jeder Photorezeptortyp exprimiert jeweils nur eines dieser Opsingene: von den neun Photorezeptoren im Ommatidium exprimieren sechs die mRNA für langwellig-empfindliches Opsin, zwei Rezeptoren exprimieren entweder beide Uvop oder beide Blop oder jeweils eine Uvop und die andere Blop. Die neunte, distale Zelle des Ommatidiums ist wahrscheinlich für UV-Licht empfindlich, wie elektrophysiologische Experimente annehmen lassen (Menzel & Snyder 1974). Vermutlich bildet die für polarisiertes Licht empfindliche dorsale Region des Auges (Labhart 1980) eine Ausnahme von dieser Verteilungs-Regel.

Opsine spielen auch im nicht-visuellen Kontext eine Rolle: bei Vertebraten ist das retinale Melanopsin der Lichtsensor für die endogene Uhr (Hattar et al. 2002), außerdem beeinflussen bei Nicht-Säugetern pineale Opsine die zirkadiane Rhythmik (Max et al. 1995, Su et al. 2006). Bei Insekten ist die Kalibrierung der zirkadianen Rhythmik durch Licht nicht einheitlich. In *Drosophila*, dem Invertebraten-Modellsystem für zirkadiane Rhythmik (siehe Helfrich-Förster 2005, Rosato et al. 2006), wird der benötigte Lichtinput durch das Protein Cryptochrome vermittelt (Emery et al. 1998). Dieses liegt aber in der Honigbiene in der zu Vertebraten homologen Form vor (Rubin et al. 2006), welche keine photorezeptive Funktion erfüllt (Griffin et al. 1999, Yuan et al. 2007). Diese Funktion könnte möglicherweise das den visuellen und pinealen Opsinen der Vertebraten verwandte Pteropsin erfüllen (Velarde et al. 2005). Pteropsin ist ein nicht-visuelles Opsin, welches im Gehirn der Honigbiene in einem Zellcluster an der Basis der Medulla exprimiert wird, einer Region, die eine wichtige Rolle in der Koordination endogener Uhren von Insekten spielt (Helfrich-Förster et al. 1998). In der selben Region liegen Zellen, die den Pigment Dispersing Factor (PDF) exprimieren, der ebenfalls in die zirkadiane Rhythmik involviert ist (Bloch et al. 2003).

1.3 RNA Interferenz

Die experimentelle Arbeit mit der Honigbiene wird durch den Umstand limitiert, dass sich bei dieser gezielte genetische Mutationen zur Funktionsanalyse spezifischer Gene nicht einfach hervorrufen lassen. Dagegen lässt sich die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* vergleichsweise einfach genetisch manipulieren, so dass sie sich zu einem der am häufigsten verwendeten Modellsysteme der Invertebraten entwickelt hat (Arias 2008). Es stellt sich jedoch heraus, dass es nicht nur wegen ihres begrenzten Verhaltensrepertoires von großer Wichtigkeit ist, die Phylogenie und Funktion von Genen auch in anderen Insektenarten zu studieren. Neuere Studien zeigen, dass die Drosophiliden genetisch oftmals einen Sonderweg einschlagen. So findet sich in Vertretern dieser Gattung zum Beispiel nicht das den visuellen Opsinen der Vertebraten verwandte Insekten-Pteropsin (Velarde et al. 2005). Auch Sequenz und Funktion der für zirkadiane Rhythmik wichtigen Gene *timeless* und *cryptochrome* unterscheiden sich stark zwischen *Drosophila melanogaster* und *Apis mellifera*. Die entsprechenden Gene von letzterer sind näher mit denen von Säugern verwandt oder verloren gegangen (Rubin et al. 2006, Yuan et al. 2007, Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006).

Als Erfolg versprechende Methode zur gezielten und spezifischen Regulierung oder Ausschaltung von Genen hat sich die Methode der RNA Interferenz (RNAi) etabliert (Fire et al. 1998, Hannon 2002, Meister & Tuschl 2004). Exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch eine zelleigene Ribonuclease („Dicer“) in 21-23 Nucleotid (nt) große Fragmente zerschnitten und aufgespalten. Der antisense-Strang dieser Fragmente verbindet sich als „Führ-Strang“ mit Proteinen der Argonaut-Familie und anderen Komponenten zu einem Komplex (RNA induced silencing complex, RISC) welcher an die genau komplementäre mRNA der Zelle bindet und diese zerstört (siehe Hammond 2005, Sontheimer 2005). Somit wird ein Gen gezielt aus- bzw. stummgeschaltet, indem seine Translation verhindert wird. Bei dieser Ausschaltung von Genen handelt es sich um einen natürlichen Prozess eukaryotischer Zellen, die dadurch über eine Art Immunantwort zum Beispiel gegen Viren verfügen (Fritz et al. 2006). Aber auch endogene kurze RNAs („small RNAs“) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, zum Beispiel als microRNAs (miRNA), 21-24 nt große nicht-kodierende RNA, die die Expression durch Störung der Translation oder

durch verstärkten Abbau von mRNA regulieren (Lee & Ambros 2001, Pillai et al. 2007), oder bei der epigenetischen, prätranskriptionalen Regulation durch Modifikation von Histonen und der Bildung von Heterochromatin (Lippman & Martienssen 2004). Obwohl der Genregulierung durch small RNA unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen, deuten starke Ähnlichkeiten in Struktur, Biogenese und Funktion auf einen gemeinsamen Ursprung hin.

RNAi ist also gleichzeitig ein zellendogener Funktionsmechanismus eukaryotischer Zellen zur vielfältigen Kontrolle der Genexpression und zum Schutz vor Viren, Transposons und Retroelemente (Bagasra & Prilliman 2004, Fritz et al. 2006) als auch eine wissenschaftliche Methode um spezifisch die Funktion von Genen zu untersuchen oder die Genexpression zu therapeutischen Zwecken zu hemmen. Durch die gewebespezifische Einbringung von viralen oder Plasmidvektoren, die fortwährend doppelsträngige short hairpin RNA (shRNA) exprimieren, können stabile transgene Individuen geschaffen werden (Leung & Whittaker 2005).

Beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* kann eine wirksame Stummschaltung von Genen durch die Injektion oder das Füttern von dsRNA bzw. von dsRNA-exprimierenden Bakterien erreicht werden. Diese Inhibition durch RNAi ist vererbbar auf die erste Generation (F1) (Fire et al. 1998, Timmons et al. 2001). Bei anderen Organismen ist die Anwendung dieser Methode nicht so problemlos. Bei Säugern ruft die Einbringung von langer dsRNA in Zellen eine Interferonantwort hervor, eine zelluläre dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) wird aktiviert und verursacht unspezifische RNA Zerstörung und die Hemmung der Proteinsynthese (Williams 1997). Die Interferonantwort wird nicht hervorgerufen, wenn kurze (19-25 nt) siRNA in die Zelle eingebracht wird (Elbashir et al. 2001). Allerdings ist durch Dicer zerschnittene dsRNA wirksamer bei der Stummschaltung von Genen als siRNA (Kim et al. 2005).

Bei Säugern und Dipteren kann überdies keine andauernde und systemische Wirkung von RNAi beobachtet werden (ohne Hilfsmittel wie virale oder Plasmid-Vektoren, Caplen et al. 2001, Elbashir et al. 2001, Lu & Woodle 2008). Für die zell-interne Amplifikation von siRNA, also der wiederholten Synthese von sekundärer siRNA, wird die RNA-abhängige RNA Polymerase benötigt (Sijen et al. 2001); die

Gene hierfür finden sich in vielen Pflanzen- und Pilzarten, bei Metazoen aber nur im Genom von *Caenorhabditis elegans* und einem primitiven Chordaten, jedoch nicht in dem von Wirbeltieren und Insekten (Vienne et al. 2003, Tomoyasu et al. 2008).

Einen essentiellen Anteil an der systemischen Verbreitung von dsRNA hat das Membranprotein SID-1 (Feinberg & Hunter 2003), wahrscheinlich ein Transmembranprotein, welches die Aufnahme der dsRNA in Zellen ermöglicht. Dieses wird bei Dipteren nicht exprimiert (Wyder et al. 2007), bei der Honigbiene konnte jedoch ein homologes Gen gefunden werden, welches mit dem systemischen Effekt von RNAi in Zusammenhang steht (Aronstein et al. 2006).

Bei der Honigbiene wurde die RNAi-Methode mittlerweile häufig erfolgreich eingesetzt, um die Funktion von Genen bzw. die Rolle bestimmter Genprodukte in verschiedenen Entwicklungs- und Verhaltenskontexten zu untersuchen. Ziele waren dabei unter anderem Gene, die für die Entwicklung wichtig sind (Beye et al. 2002, Maleszka et al. 2007, Kucharski et al. 2008), Neurotransmitter bzw. deren Rezeptoren (Farooqui et al. 2003, 2004, Franz 2006, Rößler 2006), für das Immunsystem wichtige Gene (Schlüns & Crozier 2007) und das Eidotter-Vorläuferprotein Vitellogenin, welches vor allem im Sozialverhalten eine Rolle spielt (Amdam et al. 2003, 2006, Nelson et al. 2007).

Lange doppelsträngige RNA (150-500 bp) wurden in Larven oder adulte Tiere injiziert, entweder intraabdominal in die Hämolymphe oder direkt im Gehirn appliziert. Die wirksame Menge an dsRNA lag dabei in Abhängigkeit von Zielgen und Injektionsort im ein- bis zweistelligen µg Bereich.

Die Wirkung der RNAi wurde auf unterschiedliche Weise untersucht. Die Hemmung von während der Entwicklung exprimierten Genen führte zum Beispiel zu ungewöhnlichen Phänotypen oder unvollständiger Entwicklung, der Effekt von RNAi auf Neurotransmitter-Rezeptoren konnte in Lernversuchen oder durch Vergleiche von sensorischen Schwellen belegt werden. Neben diesen kausalen Belegen für die Wirksamkeit der Methode wurden zum Nachweis einer Herunterregulierung auch mRNA- und Proteinmengen der Zielgene gemessen.

1.4 Zielstellungen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die RNA Interference Methode auf das für langwelliges Licht empfindliche Opsin (LW-Opsin) der Honigbiene angewandt. Der L-Rezeptor spielt wie ausgeführt eine Schlüsselrolle in der Prozessierung verschiedenartiger visueller Information. Die Manipulation des Proteins, welches am Anfang der Transduktionskette steht, verspricht daher neue Einsichten in die Kodierung und Verarbeitung visueller Stimuli. Mit dem LW-Opsin ist überdies ein Gen das Ziel von RNAi, dessen Expression sowohl zirkadianer Rhythmik unterliegt als auch von der photischen Umgebung abhängig ist (Sasagawa et al. 2003). Inwiefern die natürliche Schwankung in der Menge eines Genprodukts bzw. deren Induktion den Effekt der RNAi positiv oder negativ beeinflusst, ist unbekannt. Neben der Nutzung der RNAi als Werkzeug zur Manipulation eines sensorischen Systems wird durch die Berücksichtigung und gezielte Variation zirkadianer Faktoren die Eignung der Methode RNAi im visuellen System der Honigbiene selbst zum Untersuchungsobjekt. Die Anwendung verschiedener experimenteller Methoden erlaubt eine umfassende Charakterisierung des RNAi-Effekts auf unterschiedlichen Ebenen, von der Hemmung der mRNA des Zielgens, über den Effekt auf die Proteinmenge bis zu dem Einfluss auf die Physiologie des sensorischen Systems. Außerdem wird ein Verhaltensparadigma entwickelt um die visuelle Leistung bei fixierten Tieren überprüfen zu können.

Im Einzelnen werden folgende Aspekte experimentell untersucht:

- Die durch RNAi erreichte Hemmung der LW-Opsin Expression wird quantifiziert. Die Reduktion der mRNA wird mit Hilfe einer Real-Time PCR evaluiert, die des Proteins im Western Blot. Es wird untersucht, welche externen Faktoren einen Einfluss auf die Herunterregulierung des Opsins ausüben, welche Eigenschaften der doppelsträngigen RNA den Effekt ermöglichen und welchen zeitlichen Verlauf die Hemmung nimmt.
- Unabhängig von der Behandlung mit RNAi wird der tageszeitliche Verlauf der LW-Opsin Proteinmenge mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers charakterisiert. Der Einfluss von natürlicher Oszillation / quantitativer Variation eines Proteins auf die Stärke des RNAi-Effekts wird diskutiert.

- Die physiologische Relevanz der RNAi-Behandlung wird elektrophysiologisch anhand des Summenpotentials der Retina (Elektroretinogramm, ERG) untersucht. Dabei werden verschiedene Komponenten des Signals analysiert und ebenfalls mit der natürlichen Licht- und Tageszeitabhängigen Rhythmik des visuellen Systems korreliert.
- Parallel zu den molekularbiologischen und elektrophysiologischen Versuchen mit RNAi-behandelten Tieren wird ein visuelles Lernparadigma für fixierte Tiere erarbeitet. Dabei wird der Schwerpunkt auf die Abhängigkeit der Diskrimination visueller Stimuli von ihren chromatischen und achromatischen Eigenschaften sowie des Konditionierungsparadigmas gelegt.

2 MATERIAL UND METHODEN

In dieser Arbeit wurden klassische molekularbiologische, proteinbiochemische, elektrophysiologische sowie Verhaltensmethoden angewandt und angepasst. Man kann die Beschreibung der experimentellen Arbeiten in drei große Abschnitte entsprechend der eingesetzten Methoden einteilen: molekularbiologische (RNA-Interferenz, mRNA- und Proteinnachweis; Kapitel 2.1 - 2.4), elektrophysiologische (Retinogramme; Kapitel 2.5) und verhaltensbiologische (visuelle PER-Konditionierung; Kapitel 2.6).

2.1 RNA Interferenz: Herstellung doppelsträngiger RNA-Moleküle

Die Sequenzen der Gene, die für die Opsine der drei verschiedenen Photorezeptortypen im Auge der Honigbiene kodieren, sind bekannt, das gesamte Genom der Honigbiene ist seit 2006 entschlüsselt (The Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006). Es konnte daher eine 266 bp lange Sequenz des für langwelliges Licht empfindlichen Opsins (LWOP) zur Herstellung doppelsträngiger RNA gewählt werden, welche eine größtmögliche Spezifität aufwies, also möglichst unähnlich zu den Sequenzen der anderen Opsine oder anderer Gene war. Dabei wurde mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al. 1990) sichergestellt, dass es keine 21 bp lange Sequenz gibt, die zu 100% mit anderen Regionen des Genoms übereinstimmt.

Mit Hilfe spezifischer Primer wird aus cDNA in einer PCR die gewünschte Sequenz vervielfältigt und mit einem Promotor gekuppelt. Die erhaltene Sequenz wird in einen Vektor ligiert, welcher wiederum zur Transformation kompetenter Zellen genutzt wird. Die präparierte Plasmid-DNA wird durch eine In Vitro Transkription in einzelsträngige RNA überschrieben. Durch Hybridisierung mit der komplementären Einzelstrang-RNA (ssRNA) wird die gewünschte Doppelstrang-RNA hergestellt (dsRNA).

2.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus dem Gehirn der Honigbiene wurde nach der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Gewebe von mehreren Tieren wurde in Reaktionsgefäße mit 800µl eiskaltem Trizol (Invitrogen) überführt, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat zur Extraktion von RNA.

Während das chaotrope Salz Guanidiniisothiocyanat Proteine (u. a. RNAsen) denaturiert und inaktiviert, entfernt das Phenol die Proteine und löst kleinere DNA-Fragmente auf.

Die Gehirne wurden mit einem Teflonstößel und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert. Der nach Zentrifugation des Lysats (10 min, 12000 g, 4°C) entstandene Überstand wurde vom Pellet getrennt. Nach der Trennung der Phasen durch Chloroform (0.2 ml/1 ml Trizol, gute Durchmischung (Vortex), Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4°C)) wurde der Überstand mit der Gesamt-RNA wiederum abgenommen und in einem neuen Gefäß mit Isopropylalkohol (0.5 ml/ml Trizol) gefällt. Das nach weiterer Zentrifugation (10 min, 12000 g, 4°C) entstandene Pellet enthielt die Gesamt-RNA und wurde mit 75% Ethanol gewaschen und nach einer letzten Zentrifugation in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst.

2.1.2 Erststrang cDNA-Synthese

Durch reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die so gewonnene Gesamt-RNA in cDNA umgewandelt. Dazu wurde das SuperScript First-Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen nach Herstellerangaben benutzt. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde durch Absorptionsspektrophotometrie ermittelt, indem die optische Dichte (OD) einer Probe bei 260 nm gemessen wurde; nach dem Beer-Lambert Gesetz ist die Konzentration der RNA (in µg/ml) = 40mal die gemessene Absorption bei 260 nm.

2 µg der Gesamt-RNA wurden mit 1 µl 10 mM dNTPmix, 1 µl Oligo(dT)-Primer und Millipore-Wasser auf 10 µl aufgefüllt, 5min lang bei 65°C inkubiert (denaturiert) und dann 2 min lang auf Eis abgekühlt (Primer-Hybridisierung). Zu dieser Lösung wurden 2 µl RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor hinzugefügt, gemischt und 2 min lang bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl des Enzyms SuperScript II RT erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C (50 min). Die Reaktion wurde 15 min lang bei 70°C terminiert und auf Eis gekühlt. Verbliebene RNA wurde mit 1 µl RNaseH entfernt (20 min, 37°C).

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese cDNA wurde nun verwendet um in einer PCR mit Hilfe spezifischer Primer die gewünschte Sequenz des LWOP zu isolieren und zu amplifizieren.

Ein PCR-Ansatz bestand aus 2 µl Produkt der reversen Transkription, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 0.5 µl 50 mM dNTPs, 1 µl TaqPolymerase (alles Fermentas) und jew. 1 µM Primer LD und LRT7 bzw. LR und LDT7 (s. u.). Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt:

Folgende Temperatur-Zyklen wurden während der PCR durchlaufen:

Initialisierung	3 min	95 °C
Amplifikation 25 Wiederholungen	30 sek	95 °C
	1 min	55 °C
	1 min	72 °C
Endphase	10 min	72 °C

Tabelle 2.01: PCR Programm für die Amplifizierung der gewünschten LWOP-Sequenz.

Die dabei eingesetzten Primer hatten folgende Sequenzen:

LD	5'-cggcaccgattacttcaacaga-3'
LR	5'-caagccataaaccataaagagatt-3'
LD-T7	5'-taatacgactcactatagggcgacggcaccgattacttcaacaga-3'
LR-T7	5'-taatacgactcactatagggcgacaagccataaaccataaagagatt-3'

Die mit dem T7-Promotor modifizierten Sequenzen von LD-T7 und LR-T7 erlaubten die spätere Verwendung der T7-Polymerase während der RNA-Synthese.

2.1.4 Transformation

Die PCR Produkte wurden in einen Vektor, das Plasmid pCR-4-TOPO (Invitrogen), per T/A-Cloning ligiert. Dazu wurde 1 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Salzlösung, 3 µl sterilem Wasser und 1 µl der Vektor-TOPOIsomerase Mischung vermengt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Die Lösung wurde auf Eis überführt und jeweils 2 µl davon mit chemisch kompetenten Zellen (E. coli TOPO 10 OneShot, Invitrogen) vermengt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde die Kultur für 30 sek einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und danach sofort wieder abgekühlt. Nach Zugabe

von 250 µl S.O.C.-Mediums (2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glukose, pH 7.0) wurden die Bakterien für 30 min bei 37°C geschwenkt und daraufhin auf Amp⁺-Agarplatten (10 g Tryptophan, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 15 g Agar pro Liter H₂O dest., 1 µg Ampicilin/ml) ausgestrichen.

Über Nacht bei 37°C gewachsene Klone wurden am nächsten morgen einzeln entnommen und in 5 ml flüssiges Amp⁺-LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl pro Liter H₂O dest., pH 7.0, 1 µg Ampicilin/ml) überführt und für weitere 24 Stunden inkubiert. 1.7 ml der Kultur wurden mit 0.3 ml Glycerol vermengt und bei -80°C gelagert.

dsLWOP	1	-----CGGCACCGATTACTTCAACAGAGGATTATTATCTGCTTCTTACCT	
AmLop1	653	GGTAATATGACCGCTTGCGGCACCGATTACTTCAACAGAGGATTATTATCTGCTTCTTACCT	
AmBlOp	978	GGCTTTCTCACCACCTTGTTTCGTTTCGATTTCCCT-TACGGACGACGAGGATACGAAGGTCTTTCG	
AmUVOp	610	GGCTTTCTTACCAGTTGTTCTTTTCGATTATCT-GACTGACACTAATGAAATACGAATTTTTTG	
		TGTTGCTTCTCTCCGATCGTCTGAGAATCAAACACT---AGTGCCGAATGTAAATTGGCCA	
		TGTTGCTTCTCTCCGATCGTCTGAGAATCAAACACT---AGTGCCGAATGTAAATTGGCCA	
		CGTGAAGTCATTAGTATCGAATCAAGACAAGGAGAGA---AGCGCCGAAGTGAGAAATCGCAA	
		CGTCGACAGTTTACGAAGTAATGCGAATACAAGTTCTCAAAGTGCTGAAATTCGTATAGCAA	
		AAGTTGCTCTTATGACAATCTCTTTATGGTTTATGGCTTG	266
		AAGTTGCTCTTATGACAATCTCTTTATGGTTTATGGCTTG	936
		AAGTAGCATTACCATCTTTTCCCTTTTCCTTCTAGCTTG	1262
		AGGCTGCCATCACAATTTGCTTCTTATATGTTCTTTCATG	897

Abbildung 2.01: cDNA-Sequenz zur Herstellung doppelsträngiger RNA (dsLWOP, in orange), sowie ClustalW-Andordnung von komplementären Teilen der drei Opsine der Retina der Honigbiene (AmLop1 (sensitiv im langwelligen Bereich), AmBlOp (mittelwelliger Bereich), AmUVOp (kurzwelliger Bereich)). In rot Sequenzen der Primer (ohne T7-Promotor), in schwarz Übereinstimmungen mit dsLWOP-Sequenz.

2.1.5 Präparation der Plasmid-DNA (Alkalische Lyse / Miniprep)

Die Präparation der in den Klonen enthaltenen Plasmid-DNA erfolgte zunächst mit dem Plasmid Mini-Kit der Firma Qiagen. Jeweils 2 ml der Bakterienkultur wurden

durch Zentrifugation (5 min, 6000 g, RT) pelletiert und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wurde in 0.3 ml Resuspensions-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, RNase A 1:10) gelöst. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 0.3 ml des Lyse-Puffers (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde die Lösung neutralisiert (0.3 ml 3.0 M Kalium-Azetat, pH 5.0). Nach 5 min auf Eis und anschließender Zentrifugation (10 min, 21000 g, RT) wurde die Lösung in eine equilibrierte Säule (4 ml 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol, 0.15% Triton X-100) gegeben und zwei Mal mit 2 ml Waschpuffer (1.0 M NaCl, 50mM Mops pH 7.0, 15% Isopropanol) gewaschen. Dadurch werden RNA, Proteine, Lösungen und Unreinheiten mit kleinem Molekulargewicht entfernt, während die Plasmid-DNA im Säulengranulat haften bleibt. Diese wurde daraufhin eluiert (0.8 ml 1.25 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8.5, 15% Isopropanol) und mit 0.56 ml Isopropanol gefällt (und somit konzentriert und entsalzt). Die Isopropanol-DNA Lösung wurde 30 min zentrifugiert (15000 g, RT) und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 15000 g, RT) wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend 10 µl Millipore Wasser resuspendiert.

2.1.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Der Erfolg der Insertion wurde mit einem enzymatischen Verdau der Klone auf einem Ethidium-Bromid-Agarosegel überprüft. 5 µl der Kultur wurden mit *EcoRI* verdaut (30 min, 37°C), mit 1 µl 6x Bromophenolblau vermischt und auf ein 2%iges Agarosegel (50 ml 1x TBE (10.8 g Tris, 5.5 g Borsäure und 4 ml EDTA pro Liter, pH 8.3), 1 g Agarose (Invitrogen), 1 Tropfen 0.07% Ethidumbromid (biomol)) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE benutzt, die Spannung betrug 130 V. Die Nucleinsäuren wurden im Spannungsfeld der Größe nach aufgetrennt und konnten unter UV-Licht mit dem DNA-Größenstandard (MassRuler DNA-Ladder Mix, Fermentas) verglichen werden. Bei erfolgreicher Insertion wurde neben der Plasmid-DNA noch ein Fragment gefunden, welches die erwartete Größe des Inserts aufwies.

Zur Überprüfung der Orientierung des inserierten PCR-Produktes wurde eine weitere PCR durchgeführt und dabei die Priming-Stellen für den M13 Promotor in der Sequenz des Vektors genutzt. Jede cDNA-Probe wurde zwei mal analysiert, entweder mit dem selben M13-Primer und verschiedenen LWOP-Primern (LD oder LR), oder mit den selben LWOP-Primern und verschiedenen M13-Primern (M13 fwd oder

M13 rev; s.u.). 0.5 µl der auf 10 ng/µl verdünnten cDNA-Proben wurden mit 0.25 µl dNTPs, 0.2 µl Polymerase, 5 µl PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), 0.5 µl M13 Primer und 0.5 µl LWOP-Primer vermischt und mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Abfolge der Temperaturzyklen sowie die verwendeten LWOP-Primer sind dieselben wie in Abschnitt 2.1.3 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*.

Die M13-Primer (TIB Molbiol) hatten folgende Sequenz:

M13 fwd	5'-gtaaaacgacggccag-3'
M13 rev	5'-caggaaacagctatgac-3'

Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben durch Agarose-Gel-Elektrophorese untersucht.

Die Inserts wurden überdies sequenziert (AGOWA) um ihre Integrität zu überprüfen. Bestätigte sich die erfolgreiche Insertion der gewünschten Sequenz wurde weitere DNA im größeren Maßstab präpariert.

2.1.7 *Präparation der Plasmid-DNA (Alkalische Lyse / Midiprep)*

Die Präparation der in den Klonen enthaltenen Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen. 30 µl der in Glycerin bei -80°C konservierten Klone wurden entnommen und in 30 ml LB-Medium mit Ampicilin (1:1000) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (300rpm) inkubiert. Die Flüssigkeit wurde zentrifugiert (15 min, 6000 g, 4°C) und das Pellet in 4 ml Resuspensions-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, RNase A 1:10) gelöst. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 4 ml des Lyse-Puffers (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde die Lösung neutralisiert (4 ml 3.0 M Kalium-Azetat, pH 5.0). Nach 15 min auf Eis und anschließender Zentrifugation (30 min, 21000 g, 4°C) wurde die Flüssigkeit gefiltert und somit bakterielle Proteine und Membranen sowie bakterielle DNA entfernt. Die Lösung wurde anschließend in eine equilibrierte Säule (4 ml 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol, 0.15% Triton X-100) gegeben und zwei Mal mit 10 ml Waschpuffer (1.0 M NaCl, 50 mM Mops pH 7.0, 15% Isopropanol) gewaschen. Dadurch werden RNA, Proteine, Lösungen und Unreinheiten mit kleinem

Molekulargewicht entfernt, während die Plasmid-DNA im Säulengranulat haften bleibt. Diese wurde daraufhin eluiert (5 ml 1.25 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8.5, 15% Isopropanol) und mit 3.5 ml Isopropanol gefällt (und somit konzentriert und entsalzt). Die Isopropanol-DNA Lösung wurde 30 min zentrifugiert (15000 g, 4°C) und das Pellet mit 900 µl 70% Ethanol gewaschen. Der Waschvorgang wurde ein Mal wiederholt und das Pellet nach Trocknung in 20 µl Millipore Wasser resuspendiert.

2.1.8 *In Vitro* Transkription

Die so gewonnene cDNA wurden mittels eines Restriktionsenzym (PmeI, Fermentas) eine Stunde lang bei 37°C verdaut um das Plasmid zu linearisieren (2 µg cDNA, 0.2 µl Enzym (entspricht 2u), 2 µl 10x Puffer, mit Millipore-Wasser auf 20 µl aufgefüllt) und dann mit dem T7 Ribomax Express-System (Promega) in RNA umgewandelt. Dazu wurden zunächst 8 µl der linearisierten cDNA-Lösung mit 10 µl 2x Ribomax Express T7 Puffer und 2 µl T7 Enzym-Mix (T7 RNA Polymerase, Ribonuclease Inhibitor, Pyrophosphatase) 45 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde nach Zufügen von 1 µl RNase-freier DNase und weiterer Inkubation (15 min bei 37°C) mit 179 µl Millipore-Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde gereinigt (Beimischung von 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol, Vortex 1 min, Zentrifugation (2 min, 21000 g, RT); Transfer der oberen wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß, Beimischung von 200 µl Chloroform, Vortex 1 min, Zentrifugation (2 min, 21000 g, RT); Wiederholung des letzten Schritts) und ausgefällt (Beimischung von 20 µl 3 M Natrium-Azetat pH 5.6 und 500 µl 95% Ethanol, 5 min auf Eis, dann 10 min Zentrifugation bei 21000 g). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in ca. 8 µl 1x PBS resuspendiert.

Die Konzentration der so erhaltenen einzelsträngigen RNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.1.2 *Erststrang cDNA-Synthese*) und ihre Integrität mittels eines Ethidium-Bromid-Agarosegels beurteilt.

Die Hybridisierung der RNA wurde durch die Mischung der komplementären einzelsträngigen RNA zu gleichen Teilen, die Erhitzung für 15 min auf 68°C und die nachfolgende Abkühlung auf 37°C (innerhalb einer halben Stunde) sowie 30minütiger Inkubation bei 37°C erreicht. Die Konzentration dieser doppelsträngigen RNA wurde wiederum photometrisch überprüft und mit PBS auf die gewünschte

Konzentration eingestellt (10-20 µg/µl). Die Integrität und Größe der RNA-Fragmente wurde mit einem Ethidium-Bromid-Agarosegel überprüft (siehe Abb. 2.02).

Einzel- und doppelsträngige RNA wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

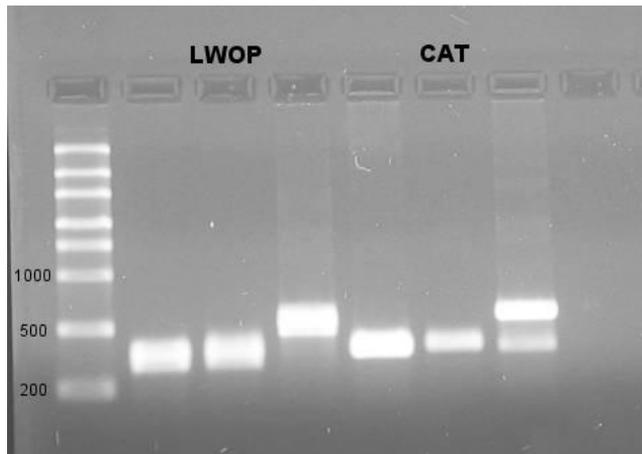


Abbildung 2.02: Ethidium-Bromid-Agarosegel. Links: RNA-Leiter; Zeile 2 und 3: ssRNA (LDT7, LRT7), Zeile 4: dsLWOP, Zeile 5/6: ssCAT (CAT D/CAT R), Zeile 7: dsCAT. Bei der Hybridisierung von dsCAT wurde offensichtlich ein Überschuss an ssCAT R verwendet (da Banden in der Größe von ssRNA und dsRNA vorhanden sind); in solchen Fällen wurde die Hybridisierung wiederholt.

Da unspezifische Effekte bei der Injektion doppelsträngiger RNA auftreten können (Oates et al. 2000, Ma et al. 2006), wurden bei jedem Versuch parallel Kontrolltiere mit doppelsträngiger RNA injiziert, die einer Sequenz der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) entspricht. CAT ist ein prokaryotisches Enzym das nicht in eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Folgende Primersequenzen wurden dabei für die Herstellung von dsCAT mit Hilfe eines die CAT-Sequenz beinhaltenden pBlue-Bac-Vektors (pBlueBac4.5/V5-His CAT, Invitrogen) verwendet:

CAT-D 5'-gtatggcaatgaaagacggtgagc -3'
 CAT-R 5'-tgaaaacgggggcgaagaagt -3'

Die resultierende dsCAT-Sequenz war 293 bp groß und wurde wie für die Herstellung von dsLWOP beschrieben präpariert und in RNA transkribiert.

2.1.9 Injektion

Die doppelsträngige RNA wurde direkt in die Retina injiziert. Dazu wurden Kapillaren aus Borosilikat-Glas (äußerer Durchmesser 1.0 mm, innerer Durchmesser 0.58 mm, wpi) mittels eines Pullers (Flaming/Brown Micropipette Puller, Mod. P-97, Sutter

Instruments Co.) zu Injektionskanülen gezogen. Diese Mikropipetten wurden auf der Außenseite im Abstand von einem Millimeter markiert, so dass während der Injektion die Menge der verabreichten Flüssigkeit ungefähr abgeschätzt werden konnte (das Volumen eines Zylinders mit $r = 0.29 \text{ mm}$ und $h = 1 \text{ mm}$ beträgt $0,264 \text{ mm}^3$, also 264 nl). Nach Befüllung mit dsRNA-Lösung wurde die Kanüle dann in einem Mikro-manipulator befestigt und mit einem Druckluft-Injektor ((Pneumatic PicoPump PV820, wpi) verbunden.

Die zu injizierende Biene im Halter wurde unter einem Binokular fixiert, ihr rechtes Auge mit einer Akkupunktur-nadel zentral perforiert. Die Injektionskanüle wurde mit Hilfe des Mikromanipulators ca. 150 nm tief in die Retina eingeführt. Nach etwa einer halben Minute wurde mit der Injektion der dsRNA begonnen, es wurden pro Tier ca. 250 nl injiziert. Es wurde notiert, ob während oder nach der Injektion Flüssigkeit aus dem Injektionsloch austrat (ob es sich dabei um die injizierte Flüssigkeit oder um endogene Flüssigkeit aus dem Auge des Versuchstieres handelte konnte nicht ermittelt werden).

Nach der Injektion wurde die Injektionsnadel vorsichtig entfernt und die Biene für ca. fünf Minuten unter einer Lampe (Highlight 3001, Olympus) platziert um die Aufnahme der injizierten Lösung durch die Photorezeptoren zu erleichtern (Wunderer et al 1989).

Während der Injektion wurde darauf geachtet, abwechselnd Kontroll- und LWOP-RNA zu injizieren um eine Verfälschungen der Ergebnisse durch einen möglichen Einfluss von Tageszeit und/oder Adaptationsstatus auf die LWOP-Menge ausschließen zu können.

Die Injektionstechnik wurde vor Beginn der Versuche mit dsRNA mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 Dextran (3% in PBS) getestet. Ca. 250 nl der Lösung wurden wie oben beschrieben direkt in die Retina injiziert (150 nm unter der Cornea) und das entsprechende Auge fünf Minuten lang von einer Kaltlichtlampe direkt angestrahlt. Nach einer Stunde wurde die Kopfkapsel der Biene geöffnet und oberflächlich Luft-säcke und Drüsen entfernt. Das Tier wurde daraufhin dekapitiert und der Kopf 24 Stunden lang in Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS) bei 4°C inkubiert.

Nach der Fixierung wurde das Gehirn komplett aus der Kopfkapsel herauspräpariert, in PBS gewaschen (2x 10 min) und mit einer Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 99%, 2x

100%, jew. 10 min) dehydriert. Die Präparate wurden daraufhin in Methylsalicylsäure aufgeklärt und höchstens eine Woche bei 4 °C aufbewahrt.

Der Erfolg der Färbung sowie deren Ausbreitung im Gehirn wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops überprüft (Leica TCS SP2).

2.2 In situ Hybridisierung

Das Vorkommen von mRNA mit der von mir für RNAi-Experimente genutzten Sequenz wurde mit Hilfe einer In situ Hybridisierung überprüft. Durch In Vitro-Transkription wird dabei mit Digoxigenin-UTP markierte RNA einer bestimmten Sequenz generiert. Diese hybridisiert im Gewebe mit der komplementären mRNA und kann durch ein Enzym visualisiert werden.

Für die Generierung von sense- und antisense-Sonden wurden PCR-Produkte genutzt, die mit Hilfe der Primer LDT7 und LRT7 gewonnen wurden (siehe Abschnitt *2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*). Den Herstellerangaben für das DIG-labelling-Kit (Roche) folgend wurden 100 ng der jeweiligen PCR-Produkte mit 2 µl 10x DIG RNA labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer und 2 µl T7-RNA-Polymerase gemischt, mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt und zwei Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) terminiert. Die Integrität der Sonden wurden auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft, die Effizienz der Markierung mit einem spot-assay bestätigt.

Apis mellifera Sammlerinnen wurden direkt am Stock gefangen, die Gehirne herauspräpariert und 30 Minuten lang fixiert (4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS). Die Präparate wurden gewaschen (PBS, 3x 10 Minuten) und über Nacht bei 4 °C in 30%iger Sucrose-PBS-Lösung inkubiert um die spätere Bildung von Eiskristallen im Gewebe zu vermeiden.

Am nächsten Tag wurden die Präparate in Gewebekleber (Jung-Medium, Leica, Germany) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von den Gehirnen wurden 14 µm dicke Cryoschnitte angefertigt und auf Superfrost plus Objektträgern (Menzel Glas, Germany) gesammelt. Die Schnitte wurden bei 37 °C getrocknet und 10 Minuten lang nachfixiert (4% PFA in 1x PBS). Die Präparate wurden eine Stunde lang bei 65 °C in Hybridisierungslösung (vor-)inkubiert (5x SSC, 50% Formamid, 50 µg/ml Heparin, 0.1% Tween-20), anschließend die sense oder antisense-Sonde hinzugefügt, bei 70 °C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und dann über Nacht bei

62°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte abgeschwämmt (5x SSC), gewaschen (3x 20 min mit 0.2x SSC, 62°C, 10 min mit 1x PBS + 0.1% TritonX100 bei RT) und eine Stunde lang in 2% BSA in PBSTr geblockt. Die Präparate inkubierten über Nacht bei 4°C in Blocking-Lösung, der ein mit Alkaliner Phosphatase gekoppelter anti-Digoxigenin Antikörper (Verdünnung 1:1000; Roche) beigefügt wurde. Am nächsten Tag wurden die Schnitte gewaschen (3x 30 min mit 1x PBS + 0.1% TritonX100) und mit Detektionspuffer zunächst 10 Minuten lang equilibriert (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) und dann unter Zugabe von 1 mM Levimasol und NBT-BCIP entwickelt. Die gefärbten Schnitte wurden am Konfokal-Mikroskop ausgewertet.

2.3 Evaluierung der mRNA Menge: Real Time PCR

Die Menge der LW-Opisin mRNA nach Injektion von dsLWOP unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurde mit Hilfe einer Real Time PCR quantifiziert. Dazu wird zunächst Gesamt-RNA aus dem Hirngewebe der Versuchstiere isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Mit spezifischen Primern werden dann die cDNA des Zielgenes sowie eines oder mehrerer so genannter housekeeping-Gene in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. (Bei den Housekeeping-Genen handelt es sich um Gene, deren Expression stabil ist und nicht von den experimentellen Bedingungen beeinflusst wird und die als interne Kontrolle zur relativen Quantifizierung herangezogen werden.) Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher in die DNA interkaliert, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt, kann während einer Real time PCR die eingesetzte cDNA („template“) quantifiziert werden. Die Zunahme der amplifizierten DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Durch eine doppelte Normalisierung kann die Menge der Ziel-mRNA in der Versuchstiergruppe relativ zur Kontrollgruppe bestimmt werden.

2.3.1 Versuchstiere

Frei fliegende Sammlerinnen wurden im Sommer direkt am Stock bzw. im Winter im Flugraum abgefangen und nach kurzer Anästhesie auf Eis in Plastikröhrchen gespannt. Vor der Injektion doppelsträngiger RNA (dsLWOP bzw. dsCAT für die Kontrollgruppe) wurden sie mindestens einen Tag lang in einem klimatisierten Raum

in einem konstanten Licht-Dunkel-Zyklus (12h/12h; Tageslichtspektrumlampe (Arcadia Birdlamp, UK)) gehalten und mit Neopol (Eiweiß-Zuckerfutter) gefüttert.

2.3.2 Extraktion von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Die Versuchstiere wurden in definierten Zeitabständen nach der Injektion auf Eis kurz anästhesiert und dann dekapitiert. Durch einen Schnitt in der Kopfcuticula wurden rasch Drüsen und Luftsäcke entfernt und das gesamte Gehirn oder die Hälfte entnommen. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte wie im Abschnitt 2.1.1 *Extraktion von Gesamt-RNA* beschrieben.

Die gewonnene Gesamt-RNA wurde wie im Abschnitt 2.1.2 *Erststrang cDNA Synthese* beschrieben in cDNA umgewandelt. Statt der Oligo(dT)-Primer wurden in diesem Fall 2 µl zufällige Hexamerprimer verwendet

2.3.3 Real Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde das ABI Prism 7900 Sequence Detection System von Applied Biosystems verwendet. Das Reaktionsgemisch für die Real-Time-PCR setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl SybrGreen (Applied Biosystems), 0.6 µl Primer D, 0.6 µl Primer R, 1.8 µl H₂O und 2 µl cDNA.

Folgende Primer wurden verwendet:

LWL fwd	5'-cggcaccgattacttcaacaga-3'
LWL rev	5'-caagccataaaccataaagagatt-3'
rp49 fwd	5'-aaactggcgtaaacctaaaggat-3'
rp49 rev	5'-cagttggcaacatatgacgagt-3'
GAPDH fwd	5'-taattgttagcacctcttgct-3'
GAPDH rev	5'-agcagtaacagcatgaacagta-3'

Bei dem ribosomalen Protein rp49 (GB10903) sowie der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; GB14798 (GAPDH-ähnlich)) handelt es sich um standardmäßig als Housekeeping-Gene bei der Real-Time PCR und anderen Expressionsstudien verwendete Gene (Ben-Shahar et al. 2003, Caplen et al. 2000, Scharlaken et al. 2008).

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen:

Initialisierung	10min	95 °C
Amplifikation 40 Wiederholungen	15sek	95 °C
	40sek	56 °C
Endphase	15sek	95 °C
	15sek	56 °C
	15sek	95 °C

Tabelle 2.02: PCR Programm für die Amplifizierung während der Real Time PCR.

2.3.4 Auswertung

Nach der PCR liegen für jeden Ansatz eine Schmelzkurve sowie Fluoreszenzwerte für alle 40 Zyklen vor. Die gewonnenen Daten wurden mit der Software SDS (Applied Biosystems) ausgewertet. Zunächst wurde die Schmelzkurven der einzelnen Ansätze visuell überprüft, um die versehentliche Detektion von Primer-Dimeren ausschließen zu können. Anschließend wurden die Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit vom Zyklus dargestellt und starke Ausreißer (kein Anstieg der Fluoreszenz oder starke Schwankungen) aussortiert. Die von der Software automatisch gelegte Grundlinie wurde im linearen Darstellungsmodus ebenfalls visuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Im logarithmischen Darstellungsmodus wurde daraufhin der Schwellenwert gesetzt indem darauf geachtet wurde, dass er sich in der geometrischen Phase der Amplifikation (über dem Background und unter der linearen Phase sowie dem Plateau) befindet. Daraufhin wurde für jeden Ansatz der Zyklus bestimmt, bei dem dieser Schwellenwert überschritten wurde („threshold cycle“, Ct).

Eine Verdünnungsreihe von Proben unbehandelter Tiere diente zur Ermittlung der Effizienz der jeweiligen Primer. Dabei wird für jeden Primer der jeweilige Ct über der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen und die Steigung der resultierenden Kurve berechnet. Die Effizienz wird mit der Formel $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$ berechnet (Pfaffl 2001).

Eine mögliche natürliche Schwankung der mRNA-Expression des LW-Opsins sowie der zwei Housekeeping-Gene wurde durch den Vergleich von linker und rechter Gehirnhälfte von insgesamt fünf nicht injizierten Tieren untersucht.

Die gewonnenen Ct wurden mit Hilfe einer speziell für die statistische Analyse von Genexpression entwickelten Software („REST 2005“, Corbett Research) untersucht.

Die Software benutzt dabei Randomisierungs- und Bootstrapping-Algorithmen um die potentielle Veränderung der Genexpression zu quantifizieren und statistisch zu validieren (Pfaffl et al. 2002).

2.4 Evaluierung der Protein Menge: SDS PAGE und Western Blot

Nach Untersuchung der Wirkung der doppelsträngigen RNA auf mRNA-Ebene wurde der Erfolg der Interferenz auf Proteinebene überprüft. Durch Gel-Elektrophorese aufgetrennte Proteine (SDS PAGE) werden auf eine Membran übertragen (Western Blot) und dort mit spezifischen Antikörpern angefärbt (Immunfärbung). Die entstehenden Chemiluminiszenz-Signale sind quantifizierbar.

2.4.1 Tiere / Präparation / Behandlung der Präparate

Frei fliegende Sammlerinnen wurden im Sommer direkt am Stock bzw. im Winter im Flugraum abgefangen und nach kurzer Anästhesie auf Eis in Metallröhrchen gespannt. Vor der Injektion doppelsträngiger RNA wurden sie ca. drei Tage lang in einem klimatisierten Raum in einem konstanten Licht-Dunkel-Zyklus (LD; 12h/12h; Tageslichtspektrumlampe (Arcadia Birdlamp, UK) gehalten und mit Neopol gefüttert. Die Injektion der Moleküle erfolgte wie in Abschnitt 2.1.9 *Injektion* beschrieben. Bis zu der Präparation wurden die Tiere in ihrem gewohnten Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Insgesamt wurden verschiedene Gruppen untersucht, die sich jeweils in dem Injektionszeitpunkt sowie der Zeitspanne zwischen Injektion und Präparation unterschieden.

Die in Metallröhrchen eingespannten Tiere wurden für einige Minuten auf Eis gelegt und somit betäubt. Dann wurde rasch ein Loch in die Kopfcuticula zwischen Ocellen, Antennen und Augen geschnitten und dadurch Luftsäcke und Drüsen entfernt. Die Retina und die optischen Ganglien wurden mit einer scharfen Pinzette vom restlichen Gehirn getrennt und inklusive Cuticula in ein Reaktionsgefäß mit 32 µl eiskaltem Homogenisationspuffer überführt. Die Probe wurde daraufhin sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Präparate wurden in einem Glashomogenisator für eine Minute mit einem Teflonstößel zermahlen und nach Entfernung der festen Augencuticula fünf Minuten lang in einem Ultraschallbad weiter homogenisiert. Diese Probe wurden dann mit 8 µl 5xSDS-PAGE Probenpuffer (nach Lämmli (1970)) aufgefüllt und vor der Trennung

der Proteine durch eine Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für fünf Minuten auf 40 °C erwärmt.

2.4.2 SDS PAGE und Western Blot

Es wurden je 5 µl der Proben (entspricht ca. 1/8 optischer Lobus) auf das Polyacrylamid-Gel (10%, Durchmesser 0.75 mm) aufgetragen, als Referenz diente der Molekulargewichtsmarker peqGOLD Prestained Protein-Marker III (peqLab, Erlangen). Die Elektrophorese erfolgte in einer peqLab-Elektrophoreseapparatur (Modell 45-1010-i) bei einer Spannung von 100 – 200 V und einer Stromstärke von maximal 65 mA. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die beiden unteren Banden des Proteinmarkers herausgelaufen waren.

Der Western Blot erfolgte in Semi-Dry-Transfer-Puffer bei einer Stromstärke von 3 mA/cm² für 90 Minuten. Hierbei wurden die durch die SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

Die Membranen wurde nach dem Blotten eine Stunde lang mit 3% Magermilch in 1x PBS-T (0,1% Tween 20) blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper (anti-LWOP) in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (jeweils 10 min) eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit Meerrettich Peroxidase konjugiertem sekundärem Antikörper (anti Kaninchen IgG, Sigma) in der Verdünnung 1:10000 in Blockierlösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die mit dem Antikörper-Konjugat markierten Proteine mit Hilfe einer ECL-Reaktion (Chemolumineszenz-Lösung; Perkin Elmer) detektiert und mit einer CCD-Kamera (Fujifilm LAS 1000) registriert.

Danach wurden die Antikörper von der Membran entfernt („stripping“) um die Detektion des als Referenzproteins verwendeten α -Tubulins zu ermöglichen. Dazu wurde die Membran 30 Minuten lang bei 60 °C mit Abkochlösung gespült und anschließend drei Mal 10 Minuten lang bei 20 °C mit PBS-T gewaschen.

Die Immunfärbung des α -Tubulin wurde wie oben beschrieben durchgeführt; die Verdünnung des ersten Antikörpers betrug 1:10000, die des zweiten Antikörpers (anti-Maus Peroxidase, Sigma) ebenfalls 1:10000.

2.4.3 Antikörper

- anti LWOP
- polyklonaler Antikörper
 - entwickelt in Kaninchen
 - benutztes Peptid: Ac-CTSTVSGTTTVADNEKSNA-OH
 - Sequenz spezifisch für *Bombus spec.* LWOP
 - überlassen von A. Briscoe, University of California
- anti α -Tubulin
- monoklonaler Antikörper
 - entwickelt in Maus
 - erkennt das ~60kDa große Tubulin-Protein aller eukaryotischen Zellen (Epitop im Carboxyl-Terminus)
 - Anti- α -Tubulin Mouse (DM1A), Calbiochem

2.4.4 Auswertung

Opsin- und Tubulingehalt der Proben wurden mit Hilfe einer Bildanalysesoftware quantifiziert (MultiGauge 3.0, fujifilm). Die Stärke der Chemilumineszenz-Emission wird als relative Dichtewerte, von der CCD-Kamera als lineare Daten registriert, gemessen. Die Menge an α -Tubulin sollte von der Injektion doppelsträngiger RNA unabhängig sein und wurde daher als Referenz benutzt, das heißt, für jede Probe wurde der Quotient von Opsin/ α -Tubulin errechnet und somit eine relative Quantifizierung durchgeführt. Mit einem Mann-Whitney-U Test wurden diese relativen Mengen zwischen Versuchstiergruppen verglichen (Sachs 1992).

2.4.5 Tageszeitliche Abhängigkeit der LWOP-Protein-Menge

Für die Untersuchung der Opsinmenge in Abhängigkeit von der Tageszeit bzw. von vorausgegangener Illumination wurden Tiere einer Kohorte benutzt, die also gleich alt waren (in diesem Fall 28 Tage). Die Tiere wurden drei Tage vor dem Versuch am Einflugsloch ihres Stockes abgefangen und zunächst in kleinen Holzkisten in einem klimatisierten Raum gehalten. Zwischen sechs und 18 Uhr wurden sie mit einer Tageslichtlampe beleuchtet (Arcadia Birdlamp Compact), zwischen 18 und 6 Uhr befanden sie sich in kompletter Dunkelheit. Morgens und abends wurden sie mit jeweils drei Tropfen Neopol (30%) gefüttert. 24 Stunden vor Beginn des Versuchs wurden die Tiere kurz auf Eis anästhesiert und in Metallröhrchen gespannt.

Der Versuch begann am dritten Tag nach dem Abfangen um 10 Uhr früh. Alle vier Stunden wurden rasch vier Bienen wie oben beschrieben präpariert. Der Versuch endete am nächsten Tag wiederum um 10 Uhr. Während des Versuchs wurde das oben beschriebene Lichtregime beibehalten.

Obwohl es keinen Hinweis darauf gibt, dass die α -Tubulinmenge einer zirkadianen Rhythmik unterliegt und in Studien zur zirkadianen Rhythmik in *Drosophila* als Referenzgen genutzt wurde (Zhang et al. 2000), wurde in diesem Versuch ein Bradford-Test benutzt um die Proteinmengen der einzelnen Proben zu bestimmen und die gleiche Proteinmenge auf die Elektrophoresegele zu beladen.

Die tageszeitlichen Schwankungen in der Proteinmenge wurden mit einer Kruskal-Wallis-ANOVA auf ihre Signifikanz überprüft.

2.4.6 Lösungen und Puffer

10x PBS	1.37 M NaCl
	2.7 mM KCl
	100 mM Na_2HPO_4
	20 mM KH_2PO_4
Homogenisationspuffer	1x PBS pH 7.4
	2 mM EDTA
	2 mM EGTA
	Complete Protease Inhibitor (Roche)
5x Probenpuffer (SDS-PAGE)	0.225 M Tris-Cl
	50% Glycerol
	5% SDS
	0.05% Bromophenol Blau
	0.25 M DTT
2.5x Trenngelpuffer	1.875 M Tris-Cl
	0.25% SDS
5x Sammelgelpuffer	0.3 M Tris-Cl
	0.5% SDS

Trenngel 10%	33% Acrylamid 30% 40% Trenngelpuffer 0.09% Temed 0.09% APS
Sammelgel	17.2% Acrylamid 30% 20% 5x Sammelgelpuffer 0.12% Temed 0.09% APS
5x Elektrophoresepuffer	0.5 M Tris 1.92 M Glycin 0.5% SDS
Semi-Dry Transfer Puffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 10% Methanol
Blockierungs-/Inkubationslösung	1x PBS 0.1% Tween 20 3% Magermilchpulver
“Stripping”lösung für Western Blots	2 ml 5x Sammelgelpuffer 0.4 g SDS 0.06 g DTT 18 ml H ₂ O
Bradford Reagenz	100 mg Coomassie Blau 50 ml Ethanol 100 ml 85% Phosphorsäure mit 1 l H ₂ O dest. auffüllen

2.5 Evaluierung der physiologischen Inhibition: Elektretinogram

Die funktionelle Inhibition der L-Rezeptoren wurde anhand der extrazellulär gemessenen Reaktion der Retina auf verschiedene farbige Lichtstimuli untersucht. Das als Elektretinogram bezeichnete Summenpotential der Photorezeptorschicht (und teilweise von Neuronen der Lamina) soll dabei Aufschluss über die Empfindlichkeit des visuellen Systems geben.

2.5.1 Tiere

Die Tiere wurden drei Tage vor Injektion doppelsträngiger RNA am Stock abgefangen. Es wurde durch Auswahl der Abfangzeit (vor 10 Uhr oder nach 16 Uhr) sowie Beobachtung des Verhaltens der Bienen am Stock darauf geachtet, dass es sich bei den Versuchstieren um Sammlerinnen handelte. Die Tiere wurden zwei Tage lang gruppenweise in kleinen Holzkisten in einem klimatisierten Raum gehalten und zweimal täglich mit Neopol (30%) gefüttert. Ca. 24 Stunden vor der Injektion wurden die Bienen nach kurzer Anästhesie durch Kälte in Metallröhrchen gespannt und ihr Kopf sowie die Antennen mit Wachs fixiert. Das linke Auge, welches später nicht beleuchtet wurde, wurde nach der Injektion mit lichtundurchlässiger schwarzer Farbe abgemalt. Während der gesamten Zeit vor und während des Versuchs waren die Tiere einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt; die Beleuchtung wurde dabei von einer Tageslichtlampe (Arcadia Birdlamp) erzeugt und erfolgte zwischen 6 und 18 Uhr.

2.5.2 Setup

Potentiale wurden mit mit Bienenringer gefüllten Glaskapillarelektroden in Silber/Silberchloridhalbzellen differentiell abgeleitet. Die Ableitung der Potentiale erfolgte in einem Faraday'schen Käfig. Das Versuchstier war über das Messingröhrchen, in dem es fixiert war, geerdet. Die Signale wurden über einen differentiellen Verstärker (ISO-DAM, wpi) geleitet und insgesamt 100fach verstärkt. Nach Eliminierung des 50 Hz Rauschens (Humbug, Quest Scientific) wurde das Signal über ein Analog/Digital-Wandler (Micro 1401, CED, Cambridge) digitalisiert und registriert. Die Datenaufnahme und -speicherung erfolgte mit Hilfe des Programms Spike 2 (CED, Cambridge). Dabei wurden parallel die Potentialänderung der Retina (mit einer Samplingrate von 10 kHz) sowie die Aktivierung der Reizapparatur aufgenommen.

2.5.3 Reizgebung

Die Reizgebung erfolgte mit drei in ihren spektralen Eigenschaften unterschiedlichen LEDs, deren Aktivierungsdauer und Intensität über eine Monoflopschaltung und nachfolgenden Widerständen geregelt wurde. Spektrale Eigenschaften sowie die Intensität des emittierten Lichtes wurden über ein Spektrometer gemessen (SD2000,

Ocean Optics, USA, kalibriert auf eine Tungsten-Halogen Lichtquelle (LS-1-Cal, ebenfalls Ocean Optics)). Die Farben der LEDs wurden so gewählt, dass die dominante Wellenlänge den Empfindlichkeitsmaxima der drei Photorezeptortypen der Honigbiene entsprachen (UV, Blau und Grün für das menschliche Auge; Abb. 2.03). Pro LED wurden drei Intensitätsstufen genutzt (Abb. 2.04). Da die spektralen Empfindlichkeitsfunktionen der drei Photorezeptortypen der Honigbiene bekannt sind (Peitsch et al. 1992), lässt sich der von diesen absorbierte Photonenstrom Q_i mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$Q_i = \int_{300}^{700} I(\lambda)R(\lambda)S_i(\lambda)d\lambda$$

i steht für die unterschiedlichen Photorezeptortypen (in diesem Fall S-, M- oder L-Rezeptoren), λ für die Wellenlänge, $I(\lambda)$ ist die spektrale Intensitätsverteilung des beleuchtenden Lichtes, $R(\lambda)$ die des reflektierten Lichtes und $S_i(\lambda)$ die spektrale Sensitivitätsfunktion des Rezeptors i .

Die Reizung erfolgte jeweils für 241ms und wurde simultan zum gemessenen ERG durch den A/D-Wandler registriert (siehe oben).

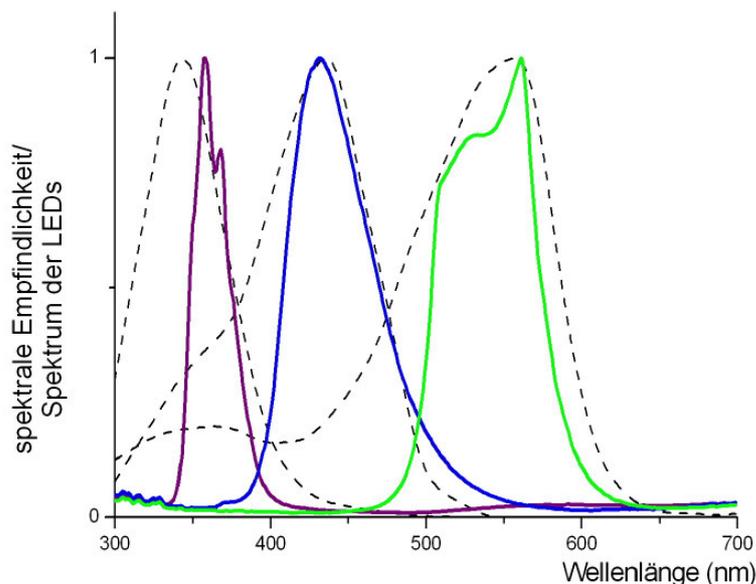


Abbildung 2.03: Emittiertes Spektrum der drei verwendeten LEDs (höchste Intensität; kompakte Linien) verglichen mit der spektralen Empfindlichkeit der drei Photorezeptortypen der Honigbiene (gestrichelte Linien).

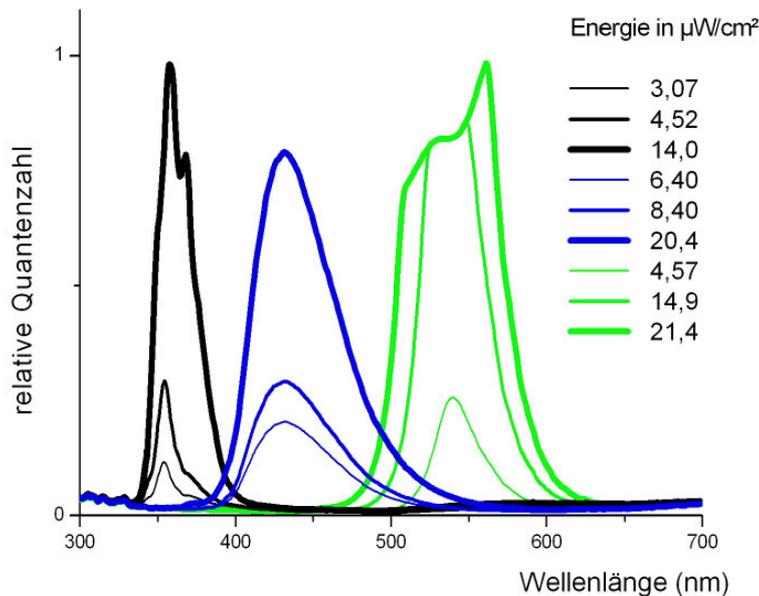


Abbildung 2.04: Emittierte relative Quantenzahl der drei verwendeten LEDs für jede Intensitätsstufe.

2.5.4 Versuchsverlauf

Die Injektion der doppelsträngigen RNA (siehe Abschnitt 2.1.9 *Injektion*) erfolgte in einem engen Zeitfenster zwischen 6 und 8 Uhr morgens. Ungefähr die Hälfte der Tiere wurde mit dsLWOP, die andere Hälfte mit dsCAT (Kontrolle) injiziert. Für die Ableitung wurde einzelnen Versuchstieren die Ableitelektrode unter schwacher Beleuchtung in das durch die Injektion entstandene Loch in der Cuticula des rechten Auges eingeführt, die Referenzelektrode knapp unterhalb des linken, abgemalten Auges. Daraufhin wurde der Raum komplett verdunkelt und die digitale Aufnahme des Retinapentials gestartet.

Nach fünfminütiger Dunkeladaptation begann die Reizgebung. Die Beleuchtung startete immer mit der grünen gefolgt von der UV und der blauen LED. Das Auge wurde für jede Intensität, beginnend mit der niedrigsten, mit drei im Abstand von 20 Sekunden aufeinander folgenden Lichtblitzen gereizt. Nach einer Minute wurde zur jeweils nächst höheren Lichtintensität übergegangen. Zwischen der Reizung mit verschiedenen LEDs lagen zwei Minuten.

Um den zeitlichen Verlauf einer möglichen Inhibition des Grünrezeptors zu charakterisieren wurden die Ableitungen 12 und 24 Stunden (+/- eine Stunde) nach

der Injektion durchgeführt, also am Abend des Injektionstages und am darauf folgenden Morgen. Die Versuche erfolgten in vier Blöcken in vier aufeinander folgenden Wochen.

2.5.5 Auswertung

Da die Ableitungen in totaler Dunkelheit durchgeführt wurden war es nicht möglich, die Qualität der Aufnahmen während des Experiments zu überprüfen. Daher wurden die Aufnahmen zunächst visuell auf Störungen untersucht und teilweise verworfen.

Bei einem typischen ERG kommt es direkt nach Stimulationsbeginn zu einem kurzzeitigen starken Abfall der Spannung (On-Antwort), die Reizantwort pendelt sich daraufhin meist auf einem Plateauwert ein. Nach Beendigung der Stimulierung fällt die Spannung wiederum kurz ab (Off-Antwort) bevor sie zur Ausgangsspannung zurückkehrt. Diese drei Komponenten (On- und Off-Antwort, Plateau) sowie die sog. sustained-Antwort, definiert als Spannung 1ms vor Ende der Stimulation, wurden zur Analyse der ERGs vermessen.

Da die absoluten Potentialänderungen zwischen den Tieren stark variieren können, ist es notwendig, die Werte zu normalisieren. Daher wurde jede Reizantwort auf die Reizantwort bei Stimulation mit der höchsten UV-Intensität normiert. Dabei diente die dreimalige Stimulation mit jeder Farb-/Intensitäts-Kombination der einfachen Eliminierung von gestörten Signalen bei der Auswertung indem immer nur der mediane Wert verwendet wurde. Für jedes Tier bzw. die verschiedenen Gruppen konnte so für jede LED-Farbe eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden.

Es wurde außerdem untersucht, ob eine Korrelation zwischen absorbiertem Photonenstrom und Antwort besteht.

Neben dieser klassischen Auswertung von ERGs wurde auch die Form der Reizantworten untersucht. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Potentialkurven normiert, indem das Potential zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns als Null und zum Ende der Stimulation (also 241ms später) als -1 definiert wurde und die gemessenen Potentiale dazwischen und bis 150 ms nach der Stimulation entsprechend angepasst werden. Dies erlaubt den direkten Vergleich der Form des ERGs als Antwort auf verschiedene Beleuchtungsfarben und -stärken innerhalb der Aufnahme eines Tieres sowie zwischen Aufnahmen verschiedener Tiere.

Diese normierten Kurven wurden auch genutzt, um die transienten Komponenten zwischen den Gruppen zu vergleichen. Dazu wurden verschiedene Maße ausgewählt, um diese On- und Off-Antworten zu charakterisieren. Es wurden die Integrale über die ersten 100 ms nach Beginn des Stimulus, über die Zeitspanne 26-76 ms nach Beginn des Stimulus sowie über die ersten 100 ms nach Beendigung des Stimulus ermittelt. Außerdem wurden die Minima der normalisierten Verläufe berechnet, sowohl für die Dauer des Stimulus als auch für die Zeitspanne 100 ms nach Beendigung der Beleuchtung, sowie der Zeitpunkt, zu dem ein Potential erreicht wird, welches 75% des Endpotentials entspricht.

Die Kennlinien der sustained-, On- und Off-Antworten wurden ermittelt, indem zunächst für jede Versuchsgruppe die (gemittelten) Kennlinien der sustained-Antwort erstellt wurden. Der Faktor, um welchen diese Potentiale bei steigender Intensität zunahmen, wurde berechnet. Mit diesem Faktor wurden die entsprechenden mittleren Verlaufskurven multipliziert. Als On-Antwort wurde das Minimum innerhalb der ersten 100 ms nach Beginn der Stimulation definiert, als Off-Antwort das Minimum innerhalb der ersten 100ms nach Beendigung des Stimulus.

Da die Stichproben zu klein waren um sie verlässlich auf Normalverteilung prüfen zu können, wurden für die statistische Auswertung ausschließlich der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test verwendet. Eine potentielle Korrelation zwischen absorbiertem Photonenstrom und relativer Reizantwort wurde zusätzlich mit einem Spearman-Rank-Test überprüft (Sachs 1992).

2.6 Verhaltensversuche: Konditionierung der Proboscis Extension Response (PER) mit visuellen Stimuli

Die Injektion von Molekülen machte es notwendig, ein Verhaltenstest für fixierte Tiere zu entwickeln. Die Konditionierung des Ausstrecken der Proboscis („proboscis extension response“, PER) wird häufig zur Untersuchung olfaktorischer Wahrnehmung verwendet (siehe Menzel 1999). Die Nutzung dieses Verhaltenstest im visuellen Kontext machte eine Anpassung in der Methode erforderlich.

2.6.1 Versuchstiere

Die Versuche fanden im Winter 2006/2007 statt. Milde Temperaturen erlaubten es, Honigbienen der Rasse *Apis mellifera carnica* L. direkt aus dem Stock zu holen. Die Tiere wurden daraufhin durch kurze Kühlung auf Eis leicht betäubt und in Metallröhrchen eingespannt. Ca. 20 Stunden vor Beginn des Experiments wurden die Bienen ad libitum mit 30% Zuckerlösung gefüttert, zwei Stunden vor der Konditionierung wurden die letzten Segmente der Antennen, die Flagellen, mit einer feinen Schere entfernt.

2.6.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau bestand aus einem aus weißem Druckerpapier gefertigtem geschlossenem Zylinder mit 7 cm Durchmesser und einer 5 x 5 cm großen seitlichen Öffnung, die die Handhabung und Beobachtung der Versuchstiere erlaubte. Der visuelle Stimulus wurde durch eine Kaltlichtlampe (Highlight 3001, Olympus, Deutschland) erzeugt, die von hinten die seitliche Wand des Zylinders gegenüber der Öffnung beleuchtete und somit einen diffusen Lichtfleck schuf. Farbe und Intensität dieses Stimulus wurden durch zwischengeschobene Farb- und Graufilter (e-colour+, Rosco, GB) verändert. Während des Versuchs wurde die jeweilige Biene so in dem Zylinder platziert, dass der Lichtfleck hauptsächlich mit dem rechten Auge wahrgenommen wurde.

Der Versuchsaufbau befand sich in einem klimatisierten und leicht abgedunkelten Raum. Die Versuchstiere wurden vor dem Versuch und zwischen den einzelnen Konditionierungsschritten und Tests mit einer Lampe mit Tageslichtspektrum und für Bienen unauflösbare Flickerfrequenz (Arcadia Birdlamp Compact, Arcadia, GB) beleuchtet.

2.6.3 Verwendete Stimuli

Die spektrale Strahlungsstärke der Lichtstimuli wurde mit einem Spektrometer gemessen (SD2000, Ocean Optics, USA, kalibriert auf eine Tungsten-Halogen Lichtquelle (LS-1-Cal, Ocean Optics, USA)) und in relative Quanten umgerechnet (Abb. MM_05). Für jeden der drei Rezeptortypen der Honigbiene wurden daraufhin relative Rezeptorerregungen ermittelt. Der von einem Photorezeptor absorbierte Photonenstrom Q_i („Quantum catch“) berechnet sich mit:

$$Q_i = \int_{300}^{700} I(\lambda)R(\lambda)S_i(\lambda)d\lambda$$

i steht für die unterschiedlichen Photorezeptortypen (in diesem Fall S-, M- oder L-Rezeptoren), λ für die Wellenlänge, $I(\lambda)$ ist die spektrale Intensitätsverteilung des beleuchtenden Lichtes, $R(\lambda)$ die des reflektierten Lichtes und $S_i(\lambda)$ die spektrale Sensitivitätsfunktion des Rezeptors i (für die Biene ermittelt von Peitsch et al. 1992) (Wysszecki & Stiles 1982).

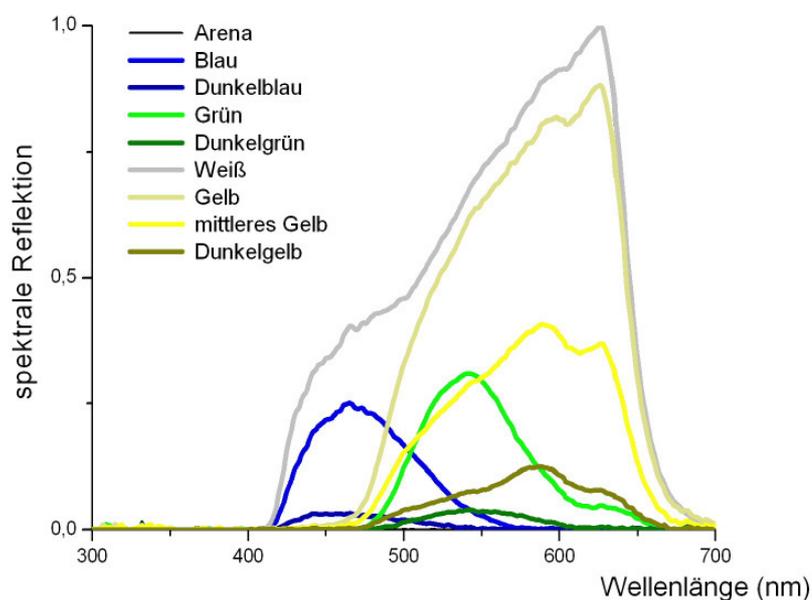


Abbildung 2.05: Spektrale Reflektion der für die PER-Konditionierung verwendeten Stimuli.

Um Ähnlichkeiten bzw. Unähnlichkeiten zwischen belohnten und unbelohnten bzw. zwischen trainierten und getesteten Stimuli zu ermessen, wurden für jedes Farbpaar verschiedene Dimensionen der Lichtstimuli ausgewertet (Tab. 2.03).

Der Farbabstand ΔS im spektralen Wahrnehmungsraum der Biene als Maß für Farbähnlichkeit wurde mit Hilfe des Receptor Noise Limited Modells (RNQ) von Vorobyev et al. (2001) berechnet. Dieses Modell geht von einer Kodierung der Farben mit zwei chromatischen Gegenfarbenmechanismen, der logarithmischen Transformation der absorbierten Photonenströme in Rezeptorsignale und einer Limitierung der Diskrimination durch Rezeptorrauschen aus. Im RNQ-Modell wird eine Veränderung

des Rezeptorrauschens mit steigender Lichtintensität entsprechend dem Rose de Vries-Gesetzes (quadratische Abhängigkeit des Signal-Rauschen-Verhältnis) angenommen. Das elektrophysiologisch gemessene Signal-Rauschen-Verhältnis der Bienen-Photorezeptoren (Peitsch et al. 1992) bildet die Grundlage des Modells für die Biene. Es konnte in mehreren Studien korrekte Voraussagen über Detektions- und Diskriminationsleistungen von Bienen machen (Hempel et al. 2000, Niggebrügge & Hempel 2003). Ein Farbabstand von 2.3 gilt als unterscheidbar für Bienen.

Als Maß für die Intensität eines Stimulus wird der L-Rezeptor-Kontrast herangezogen, auf ihm basiert das achromatische System, welches für Objekt- und Mustererkennung genutzt wird (Giger & Srinivasan 1996, Giurfa et al. 1997, Giurfa & Vorobyev 1998, Hempel de Ibarra et al. 2001). Außerdem wurde die summierte Erregung aller drei Photorezeptortypen berechnet, welche unter anderem die phototaktische Verhaltensantwort steuert (Menzel & Greggers 1985). Sowohl L-Rezeptor-Kontrast als auch summierte Rezeptorerregung wurden auf den intensivsten Stimulus, weißes Licht ohne Filter, normalisiert (relativer Kontrast).

Chromatische Eigenschaften		Achromatische Eigenschaften		
Stimulus Paare	ΔS	Stimulus	Relativer Photonenstrom	
			L-Rezeptor	Alle Rezeptoren
Blau – Grün	25.8	Weiß	1	1
Blau – Gelb	24.1	Gelb	0.81	0.69
Blau – Weiß	11.4	Grün	0.28	0.24
Blau – Dunkelblau	1.6	Blau	0.13	0.21
Gelb – Weiß	13.6	Dunkelgelb	0.11	0.09
Gelb – Dunkelgelb	6.0	Dunkelgrün	0.04	0.03
Gelb – Grün	5.8	Dunkelblau	0.02	0.03
Gelb – Dunkelgrün	5.1	Arena	0.002	0.005
Dunkelgelb - Blau	24.5			
Dunkelgelb - Grün	11.8			
Grün – Dunkelgrün	10.9			

Tabelle 2.03: Chromatische und achromatische Eigenschaften der zur PER-Konditionierung benutzten Stimuli. Linke Spalten: Farbabstand (ΔS) zwischen Stimuluspaaren, rechte Spalten: achromatische Eigenschaften (L-Rezeptor-Kontrast sowie Summe aller Rezeptoren), normiert auf hellsten Stimulus (Weiß).

2.6.4 Konditionierung

Jede Trainingseinheit begann mit der Platzierung des Tieres im Zentrum des Papierzylinders. Nach ca. 15-20 Sekunden Akklimatisierung wurde der konditionierte Stimulus (conditioned stimulus, CS), der farbige Lichtreiz, sieben Sekunden lang präsentiert. Der unkonditionierte Stimulus (unconditioned stimulus, US), die Belohnung, bestand aus 50%igem Zuckerwasser und wurde vier Sekunden nach Einschalten des CS mit einem Zahnstocher direkt auf die Proboscis appliziert; die Biene durfte das Zuckerwasser drei Sekunden lang trinken (Abb. 2.06). Es wurde sowohl notiert, ob die Biene den Rüssel bei der Präsentation des CS vor Applikation des US ausstreckte (Proboscis extension response, PER) als auch ob sie auf die Berührung mit dem Zuckerwasserstäbchen reagierte. Bienen, die in drei aufeinander folgenden Trainingseinheiten kein Zuckerwasser tranken, wurden aus dem Experiment entfernt.

Zwischen zwei Trainingseinheiten lagen 12 ± 2 Minuten (Inter trial interval, ITI). Die Tiere wurden entweder absolut (zehn Stimulus-Belohnung Paarungen) oder differentiell konditioniert. Bei der differentiellen Konditionierung wurden zehn belohnte (CS+) abwechselnd mit zehn unbelohnten Stimuli (CS-) präsentiert, immer beginnend mit einem CS+. Die differentielle Konditionierung dauerte also doppelt so lange wie die absolute, die Anzahl und Dauer der Belohnungen war aber gleich.

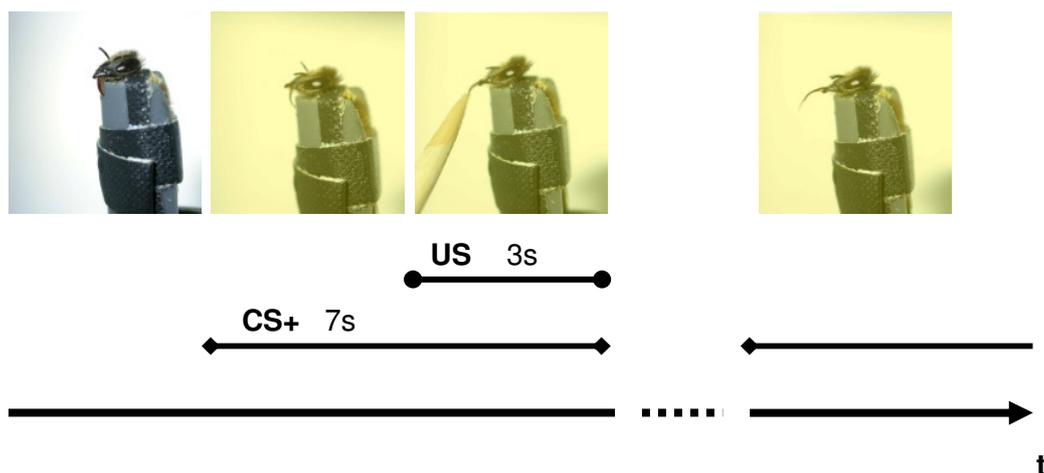


Abbildung 2.06: Schematische Darstellung der PER-Konditionierung; Bienen werden 7 Sekunden lang mit dem CS+ konfrontiert (farbiges Licht) bevor sie 3 Sekunden lang den US (Zuckerwasser) bekommen. Bei erfolgreicher Konditionierung reicht der CS+ allein, um das Herausstrecken des Rüssels zu provozieren.

Nach der letzten Trainingseinheit wurden die Bienen mit mehreren neuen Stimuli konfrontiert. Diese Stimuli wurden nicht belohnt, der zeitliche Abstand der Präsentationen entsprach dem ITI des jeweiligen Experimentes. Die Reihenfolge dieser Teststimuli wurde zwischen Tieren randomisiert.

Das Mittelzeitgedächtnis wurde geprüft indem zwei Gruppen von Bienen mit einem gelben CS+ absolut konditioniert wurden (drei bzw. sieben Mal) und eine Stunde nach dem letzten Trainingstrial mit diesem Stimulus erneut getestet wurden.

Auch Extinktion, also die Abnahme einer konditionierten Antwort nach mehrmaligem unbelohntem Präsentieren des zuvor belohnten CS, wurde untersucht. Zwei Gruppen von Tieren wurden zunächst mit einem gelben Stimulus trainiert (drei bzw. sieben Mal), dann wurde ihnen dieser CS mehrmals ohne Belohnung präsentiert. Die Zeitspanne zwischen den Präsentationen entsprach dabei dem vorher verwendeten ITI.

2.6.5 Auswertung

Der prozentuale Anteil der Bienen, die innerhalb der ersten vier Sekunden auf einen Stimulus reagieren, wurde für jedes Trainingsdurchgang berechnet und ergab die PER-Rate für die Akquisition (während des Trainings) und die unbelohnten Tests.

Als „gelernt“ wurde ein Stimulus definiert, wenn sich die Anzahl antwortender Bienen zwischen der ersten und der letzten Trainingseinheit signifikant voneinander unterschied, belegt mit dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen (α -level: 0.05). Dieser Test wurde auch genutzt um Unterschiede zwischen letzter Trainingseinheit und Tests oder, bei differentieller Konditionierung, zwischen den letzten CS+ und CS-Präsentationen zu untersuchen (Generalisierung, Diskrimination).

Die Unterschied in Generalisierung auf unbelohnte Teststimuli wurde innerhalb einer Gruppe mit dem McNemar χ^2 -Test untersucht (α -level 0.05), zwischen zwei Gruppen mit einem G-Test nach Woolfe (Maximum-Likelihood χ^2 -Statistik, α -level 0.05). Bei Verwendung derselben Daten in mehreren Tests wurden die χ^2 -Schranken nach dem Bonferroni-Verfahren korrigiert (Sachs 1992).

3 ERGEBNISSE

3.1 RNA Interferenz: Überprüfung der Methode

3.1.1 Datenbankgestützte Untersuchung der Spezifität der dsRNA-Sequenz

Die 266 bp große Sequenz, die für die Induktion der RNAi gewählt wurde, wurde durch einen Abgleich mit der Genom-Datenbank für die Honigbiene (NCBI, Honey Bee Genome Resources) auf ihre Spezifität hin überprüft. Die Parameter wurden dabei so gewählt, dass speziell nach kurzen komplementären Nukleotidsequenzen gesucht wurde. Außer dem Gen für das LW-Opsin wurden sieben weitere Sequenzen im *Apis mellifera*-Genom gefunden, die Übereinstimmungen mit der gewählten Sequenz aufwiesen. Diese waren jedoch höchstens 18 bp groß und daher mit großer Wahrscheinlichkeit zu kurz um die RNAi-Maschinerie zu aktivieren (Elbashir et al. 2001). Die Resultate für das als Kontrolle genutzte Gen CAT, welches in Eukaryoten nicht exprimiert wird, waren ähnlich: es wurden insgesamt neun Sequenzen im Honigbienen-Genom gefunden, die Übereinstimmungen mit der gewählten 293 bp großen CAT-Sequenz aufwiesen, die aber wiederum höchstens 18 bp groß waren.

Die in diesen Experimenten injizierte dsRNA kann daher wahrscheinlich ausschließlich die mRNA des LW-Opsins herunterregulieren (dsLWOP) bzw. löst keinen spezifischen Effekt aus (dsCAT). Nicht völlig ausschließen kann man allerdings die Möglichkeit von off-target Effekten, also die unspezifische Wirkung auf die Genexpression durch die Einbringung von doppelsträngiger RNA in einen Organismus (Aagaard & Rossi 2007).

3.1.2 Injektion eines Farbstoffs in die Retina

Um zu überprüfen, ob und wie sich bei einer direkten Injektion in das Auge einer Honigbiene die Lösung verteilt, wurde der Farbstoff Alexa Fluor 488 – Dextran genutzt. Er wurde direkt durch die Cornea in die zentrale Retina des rechten Auges injiziert; die Injektionskanüle wurde 150 nm tief eingeführt und die injizierte Menge betrug ca. 250 nl. Nach der Injektion wurde das injizierte Auge mit hoher Intensität beleuchtet, um die Aufnahme der Lösung in die Photorezeptoren zu ermöglichen (Wunderer et al. 1989). Diese Behandlung resultierte in der Anfärbung der drei

rechten optischen Loben (Lamina, Medulla, Lobula) eine Stunde nach Injektion (Abb. 3.01).

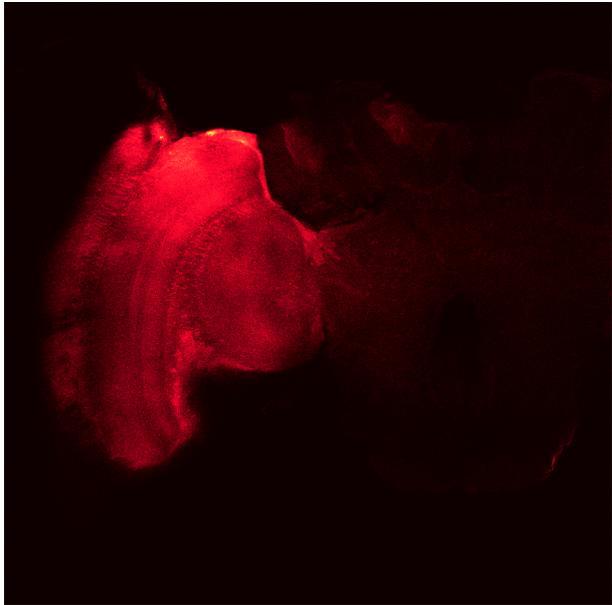


Abbildung 3.01: Anfärbung der optischen Loben mit 3% Alexa Fluor 488 – Dextran, Aufnahme mit konfokalem Mikroskop, vollständiges Gehirn, 1 h nach Injektion von 250 nl in rechte Retina. 10fache Vergrößerung, Luftobjektiv.

Die vergrößerte Darstellung zeigt, dass sich Farbstoff in Zellen direkt unterhalb der Basalmembran akkumuliert hat (Abb. 3.02). Die Retina selbst wird durch die corneale Pigmentschicht verdeckt.

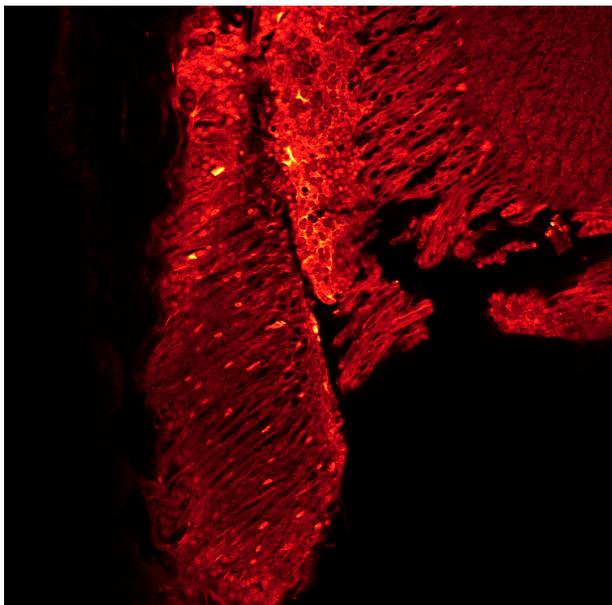


Abbildung 3.02: Anfärbung der optischen Loben mit 3% Alexa Fluor 488 – Dextran, Teilausschnitt optische Loben 1 h nach Injektion von 250 nl. 40fache Vergrößerung, Immersionsobjektiv.

Da diese Injektionsmethode offensichtlich zu einer guten Verteilung führte, wurde sie zur Injektion der doppelsträngigen RNA verwendet.

3.1.3 *In situ* Hybridisierung

Die mRNA-Sequenz, die nachfolgend zur Herstellung doppelsträngiger LW-Op sin RNA verwendet wurde, wurde ebenfalls für die Herstellung einer Sonde zur In situ Hybridisierung in Schnitten des Honigbienenengehirns genutzt. Durch die Spezifität der Sequenz (siehe Abschnitt 3.1.1 *Datenbankgestützte Untersuchung der Spezifität der dsRNA-Sequenz*) sollten nur Zellen angefärbt werden, die LW-Op sin mRNA exprimieren.

Detektion fand ausschließlich in der Retina statt (Abb. 3.03a, b). Die Färbung beginnt einige μm unter der Oberfläche der Retina, wo sich Corneazellen und der Kristallkegel befinden. Die Anfärbung ist sehr dicht, trotzdem ist gut zu erkennen, dass longitudinal geschnittene Zellen angefärbt wurden, die bis zur Basalmembran reichen.

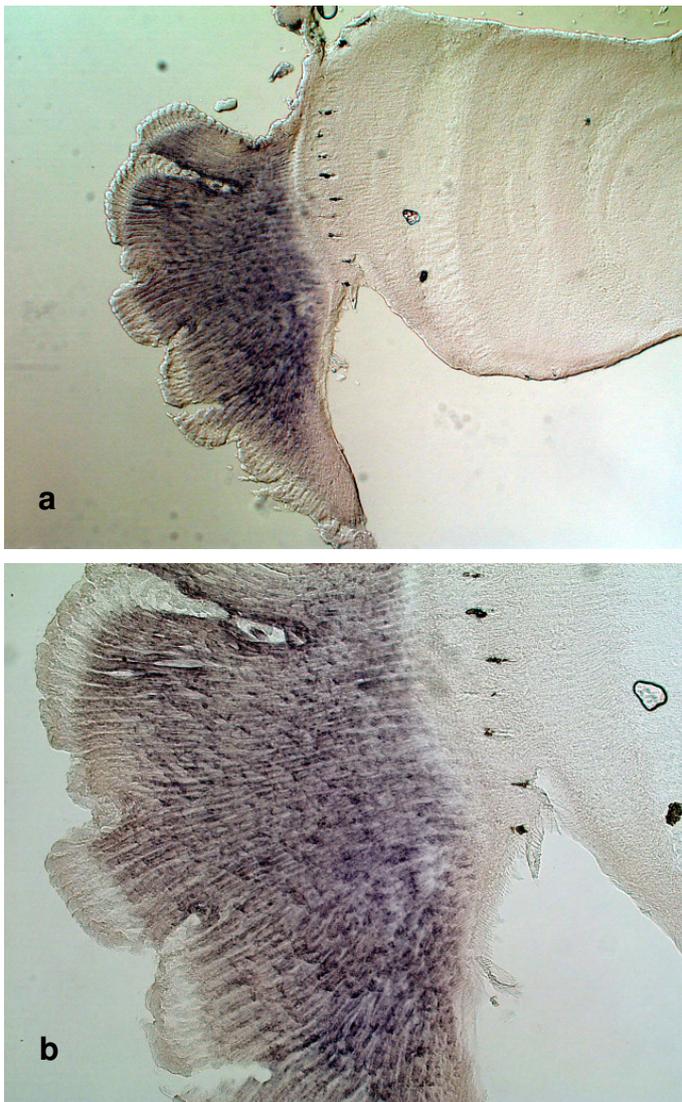


Abbildung 3.03a, b: In situ Hybridisierung, antisense Sonde, Aufnahme der optischen Loben mit konfokalem Mikroskop, Sagittalschnitt durch ganzes Gehirn. a) rechte optische Loben, 10fache Vergrößerung; b) rechte Retina, 40fache Vergrößerung.

Die Kontrollbehandlung mit der sense-Sonde, die nicht mit der LW-Opisin mRNA hybridisieren kann, weist keine Anfärbung auf (Abb. 3.04).

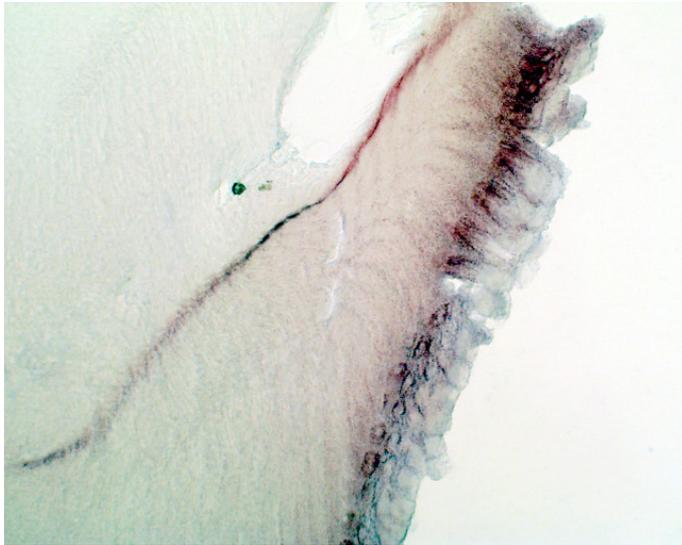


Abbildung 3.04: Kontrolle der In-situ Hybridisierung, sense Sonde, Aufnahme der Retina mit konfokalem Mikroskop; 40fache Vergrößerung.

3.2 RNA Interferenz: Effekte der Injektion von dsLWOP auf Menge der mRNA

Der Effekt der Injektion doppelsträngiger RNA mit einer 266bp langen Sequenz des LW-Opisins wurde zunächst auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden mehrere Versuchs- und Injektionsprotokolle durchgeführt, die sich in mehreren potentiell wichtigen Faktoren (u. a. Inkubationszeit, injizierte Menge) voneinander unterschieden. Nach der Präparation der injizierten Versuchstiere wurde die LW-Opisin mRNA Menge mit Hilfe einer Real Time PCR ermittelt. Die relative Menge wurde durch eine doppelte Normalisierung berechnet; zunächst wurde für jede Probe die LWOP-Menge in Relation zu der mRNA-Menge der beiden Housekeeping-Gene rp49 und GAPDH gesetzt, deren Expression durch die Behandlung nicht beeinflusst sein sollte. In einem zweiten Schritt wurden diese Werte der dsLWOP-injizierten Tiere auf die der Kontrolltiere normalisiert, die identischen Versuchskonditionen ausgesetzt waren, aber mit einer doppelsträngigen RNA-Lösung injiziert wurden, deren Sequenz nicht durch eukaryotische Zellen exprimiert wird (dsCAT).

3.2.1 Validierung der Methode

Zunächst wurde die Qualität der Real Time PCR untersucht. Kommt es während der Amplifizierung zur Hybridisierung von Primern miteinander statt mit dem komplementären DNA-Strang, so steigt die Fluoreszenz ebenfalls an und das

Ergebnis der Quantifizierung wird verfälscht. Um dies auszuschließen, werden Schmelzkurven der PCR-Produkte am Ende der Amplifizierung erstellt, die Auskunft darüber geben, bei welcher Temperatur die DNA-Doppelhelix schmilzt, da die kurzen Primer Dimere eine andere Schmelztemperatur als die zu amplifizierende DNA haben.

Die Auswertung der Schmelzkurven ergab für jede der amplifizierten cDNAs (LWOP, rp49, GAPDH), dass sich während der Amplifikation keine Primer Dimere gebildet hatten, der gemessene Anstieg in Fluoreszenz während der 40 Zyklen ist somit einzig auf die Amplifikation der Ziel-DNAs zurückzuführen.

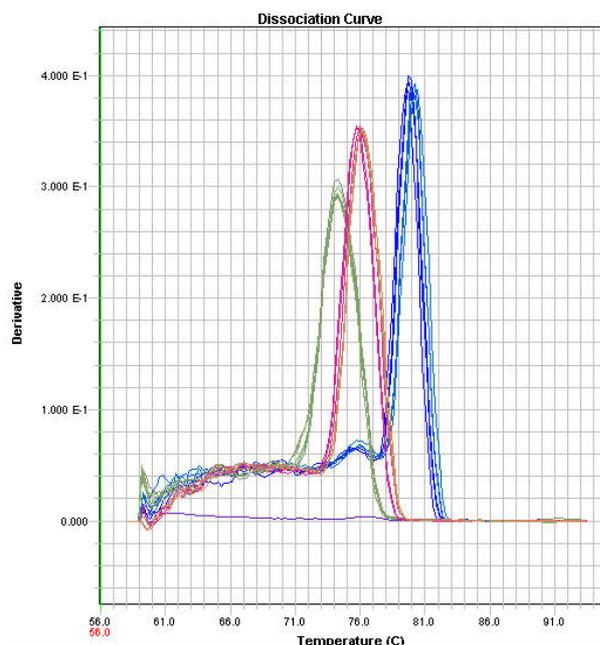


Abbildung 3.05: Schmelzkurvenanalyse nach Real Time PCR; dargestellt sind die Schmelzkurven für GAPDH (grün), rp49 (rot) und LWOP (blau).

Anhand von Verdünnungsreihen wurden die Primer-Effizienzen ermittelt (LWOP: 2.0; rp49: 1.65; GAPDH: 1.76) um die mRNA-Menge rechnerisch bestimmen zu können.

Ferner wurde untersucht, ob Präparation oder weitere Behandlung der Proben ein künstliches Ungleichgewicht in gemessener mRNA-Menge erzeugen können. Der Vergleich der mRNA-Menge zwischen den Gehirnhälften von fünf Bienen, von denen die Probe mit den rechten Hirnhälften arbiträr als Kontrollprobe definiert wurde, zeigte, dass die Unterschiede minimal waren, sowohl für das Zielgen LWOP als auch für die beiden Houskeepinggene rp49 und GAPDH (Abb. 3.06).

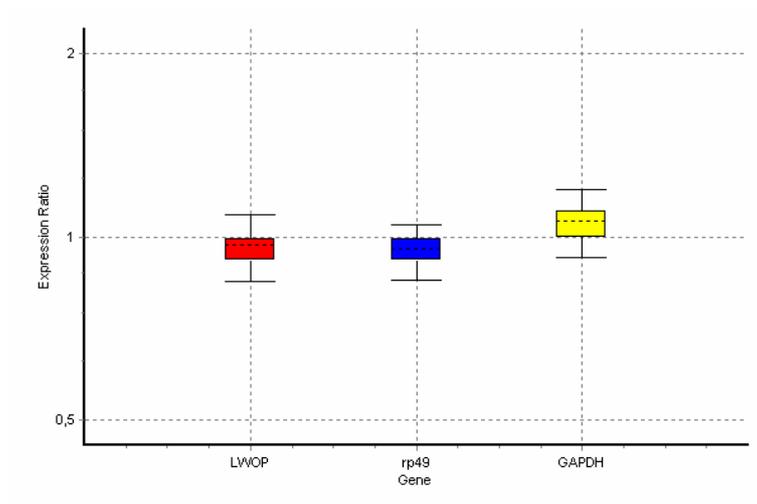


Abbildung 3.06: Vergleich der relativen Expression von Ziel- und Housekeeping-Genen in Proben von linker und rechter Gehirnhälfte; die Werte der rechten Gehirnhälfte wurden dabei als 1 definiert. Kasten repräsentiert das Interquartilintervall, die unterbrochene Linie die mediane (relative) Genexpression, Fehlerbalken Minimum und Maximum.

3.2.2 Effekte der dsLWOP-Injektionen

Insgesamt wurden neun Versuchsreihen durchgeführt, die sich in verschiedenen Parametern voneinander unterschieden (siehe Tabelle 3.01). Variiert wurden die Anzahl der Injektionen, die Zeit zwischen Injektion und Präparation, die Tageszeit von Injektion und Präparation sowie die Menge der injizierten dsRNA. In zwei Versuchsgruppen wurden überdies die Gehirne in injizierte und nicht-injizierte Seite unterteilt (Gruppen a und i).

Die Auswertung der Versuchsreihen zeigte zwei Mal eine statistisch signifikante Reduktion der LWOP-Expression in dsLWOP injizierten Tieren ($p < 0.05$) sowie zwei Mal eine Reduktion mit einem Signifikanzniveau $p < 0.1$ (Abb. 3.07). Nur in einem Fall (Versuchsgruppe a, nicht behandelte Gehirnseite) überschritt die relative LWOP-Expression den Wert der Kontrollgruppe; diese erhöhte Expression war aber statistisch nicht signifikant.

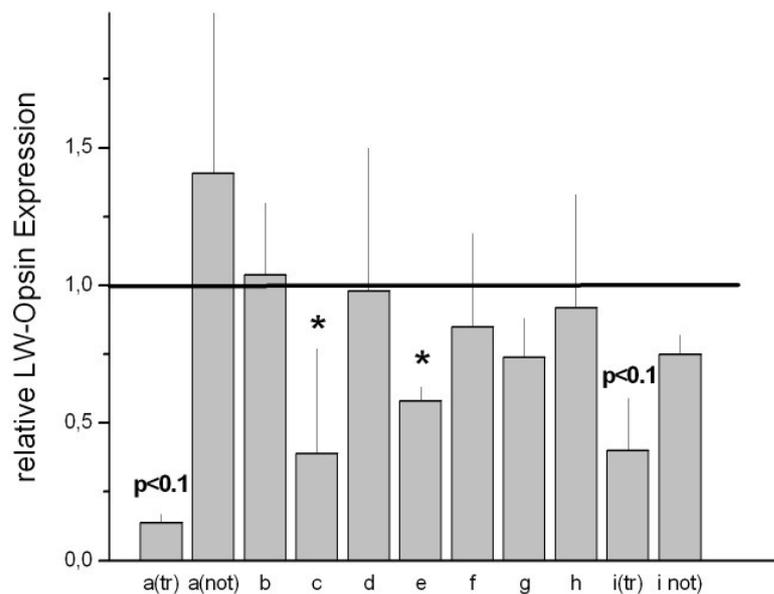


Abbildung 3.07: Übersicht über die relative LW-Opisn mRNA Expression in allen neun Versuchsreihen. Bezeichnung der Gruppen bezieht sich auf die in Tabelle 3.01 verwendeten Bezeichnungen. Fehlerbalken = Standardfehler, * = $p < 0.05$.

Gruppe	Anzahl Inj.	Zeit zwischen 1. Inj. & Präp. (h)	Zeit zwischen letzter Inj. & Präp. (h)	insg. inj. Menge (μ g)	Tageszeit 1. Injektion	Tageszeit 2. Injektion	Tageszeit 3. Injektion	Tageszeit Präp.	rel. LW-Opisn Expr.	Standard Fehler
a _{tr}	1	7		2.5	08:30-10:00			14:30-16:00	0.14	0.11-0.17
a _{no}									1.41	0.97-2.08
b	1	8		2.5	09:00-11:00			17:00-18:00	1.04	0.78-1.27
c	1	8		5	08:00-13:00			17:00-19:00	0.39	0.19-0.77
d	1	12		2.5	19:30-20:30			07:30-09:30	0.98	0.73-1.55
e	2	32	8	5	08:00-10:30	08:00-10:30		16:30-18:00	0.58	0.55-0.63
f	1	32		5	08:00-13:00			17:00-20:30	0.85	0.60-1.19
g	1	54		2.5	08:30-12:00			13:30-15:30	0.74	0.60-0.87
h	3	56	8	7.5	08:00-10:30	08:00-10:30	08:30-10:00	16:00-18:00	0.92	0.51-1.3
i _{tr}	2	56	29-36	5	08:30-14:00	08:30-12:30		17:30-20:00	0.4	0.31-0.59
i _{no}									0.75	0.71-0.82

Tabelle 3.01: Übersicht über die verwendeten Versuchsgruppen, variierte Faktoren (Anzahl und Zeitpunkt von Injektionen, injizierte dsRNA Menge, Zeitpunkt Präparation) und relative LWOP mRNA Expression. Bei den Gruppen a und i wurden die Gehirne in „behandelte“ (tr) und „unbehandelte“ (no) Seite unterteilt (hellgraue Zeilen). Die Gruppen c und f sowie die Gruppen e und h wurden jeweils gleichzeitig injiziert aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten präpariert (c/f) bzw. unterschiedlich oft zusätzlich injiziert (e/h). Hervorgehoben sind die Gruppen mit signifikant reduzierter LW-Opisn Expression (c und e, $p < 0.05$).

Es kam zu einer signifikanten Reduktion der LW-Opsin Expression in folgenden Fällen:

Die Injektion von insgesamt 5µg dsRNA führte in den Versuchsgruppen c und e zu einer signifikanten Reduktion der LW-Opsin Expression auf ca. 39 bzw. 58% (Abb. 3.08). Dabei wurde die Gruppe e zwei Mal mit 250nl dsRNA-Lösung mit einer Konzentration von 10µg/µl injiziert, die Gruppe c nur ein Mal mit 250nl einer doppelt konzentrierten Lösung injiziert. Zum Vergleich die Versuchsgruppe b, die wie die Tiere der Gruppe c nur ein Mal injiziert und nach acht Stunden präpariert wurde; diesen Versuchstieren wurde aber nur 2.5µg dsRNA appliziert und es kommt zu keiner signifikanten Reduktion.

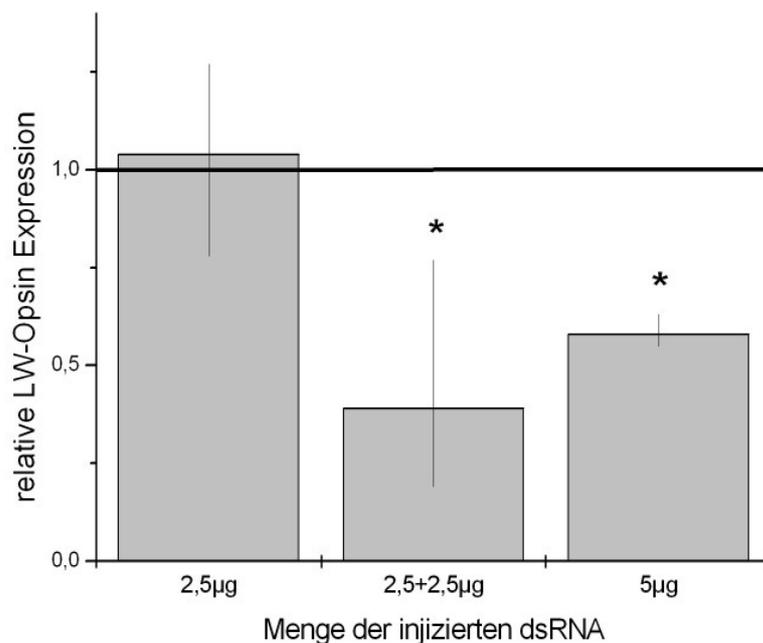


Abbildung 3.08: Einfluss der injizierten dsRNA-Menge auf die LW-Opsin mRNA Expression. Die abgebildeten Gruppen entsprechen den Versuchsgruppen b (links), e (Mitte) und c (rechts) der Tabelle 3.01. * = $p < 0.05$.

Ein zweiter wichtiger Faktor ist die Inkubationszeit der dsRNA. Acht Stunden nach der Injektion lässt sich eine signifikante Reduktion der LW-Opsin Expression beobachten (Gruppe c), 24 Stunden später ist die Expression der LW-Opsin mRNA in

einer parallel injizierten Gruppe nicht mehr signifikant unterschiedlich von der der Kontrollgruppe (Versuchsgruppe f) (Abb. 3.09).

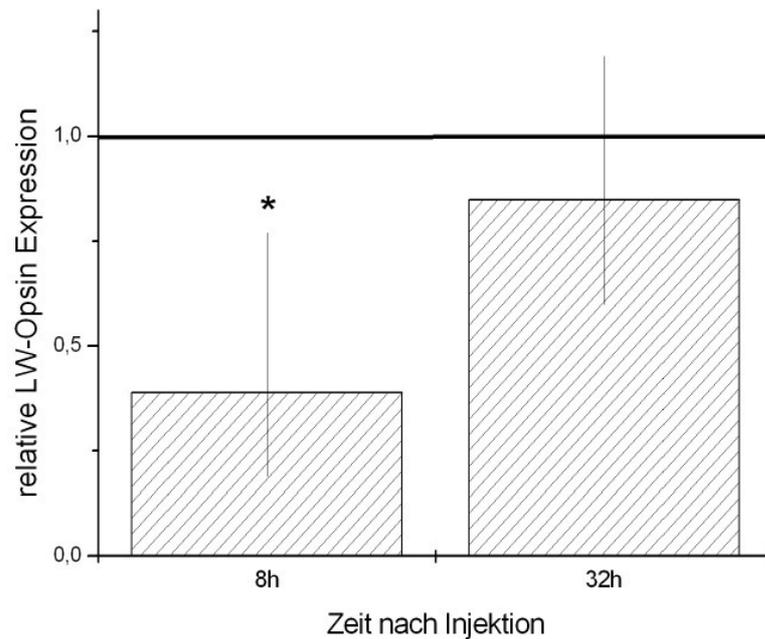


Abbildung 3.09: Vorübergehende Wirkung der injizierten dsLWOP-Lösung auf die LW-Opisin mRNA Expression. Die parallel injizierten Gruppen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert. Die abgebildeten Gruppen entsprechen den Versuchsgruppen c (links) und f (rechts) der Tabelle 3.01. * = $p < 0.05$.

Die Trennung der Präparate in injizierte und nicht injizierte Gehirnhälften vor der Homogenisation und RNA-Extraktion zeigt eine unterschiedlich starke Expression des LW-Opisins (Abb. 3.10). Dies deutet auf eine lokal auf die injizierte Retina begrenzte Reduktion der LW-Opisin Expression hin. Die Reduktion in den Gruppen a und i (auf 14 bzw. 40% der Expression) sind statistisch nicht signifikant ($p < 0.1$ in beiden Gruppen). Allerdings sind auch in diesen Gruppen die Bedingungen für eine Wirkung der RNA Interferenz nicht ideal; in Gruppe a beträgt die injizierte Menge doppelsträngiger RNA nur 2.5 μg , in Gruppe i liegen über 30 Stunden zwischen letzter Injektion und Präparation.

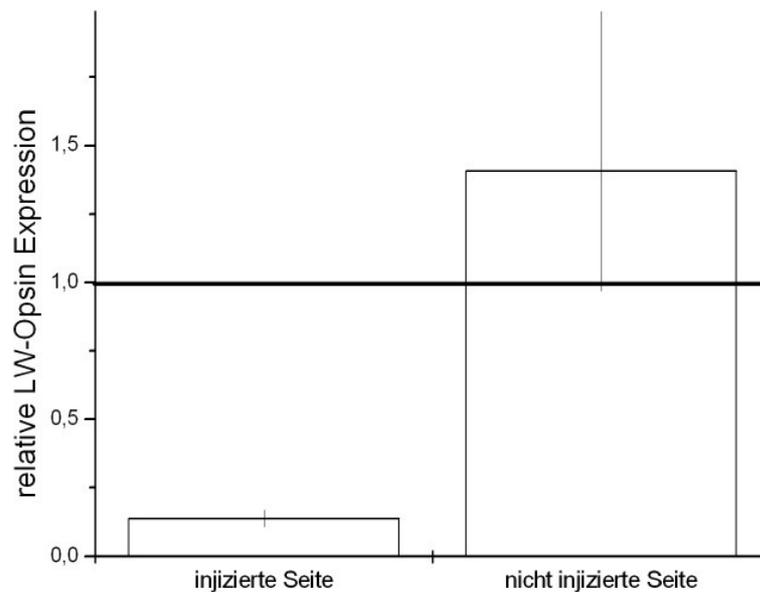


Abbildung 3.10: Relative LW-Opisn mRNA Expression in injizierter (links) und nicht injizierter (rechts) Gehirnhälfte (Gruppe a, siehe Tab. 3.01).

Die Tageszeit der Injektion bzw. die der Präparation konnte durch die Versuche leider nicht als potentiell wichtige Faktoren bestätigt oder ausgeschlossen werden. Bis auf eine Gruppe (Gruppe d, siehe Tab. 3.01) wurden alle Gruppen morgens injiziert und am späten Nachmittag oder abends präpariert. Die Tiere der Gruppe d wurden zwischen 19:30 Uhr und 20:30 Uhr injiziert und am nächsten Morgen präpariert; die Expression des LW-Opisns der mit dsLWOP injizierten Tiere unterschied sich nicht von der der Kontrolltiere (siehe Abb. 3.07). Die injizierte Menge doppelsträngiger RNA in dieser Gruppe betrug jedoch 2.5 µg, eine Menge die für eine (statistisch signifikante) Reduktion der mRNA offensichtlich nicht ausreicht (siehe Abb. 3.08). Außerdem handelt es sich bei der Reduktion des LW-Opisns durch RNAi um einen transienten Effekt (siehe Abb. 3.09), die Zeitspanne von 12 Stunden zwischen Injektion und Präparation könnte für eine detektierbare Reduktion bereits zu lang sein. Da also sowohl die Menge an injizierter RNA als auch möglicherweise der Zeitraum der Inkubation nicht ideal waren, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Zeitpunkt der Injektion oder der Präparation die Wirkung der RNAi in beeinflussen können.

3.2.3 RNAi: Effekt auf Menge der mRNA - Zusammenfassung

Mit Hilfe der Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA mit einer für den langwelligen Rezeptor spezifischen Sequenz zu einer Reduktion der LW-Opsin mRNA auf bis zu ~40% führte. Diese Reduktion war zeitlich und lokal begrenzt und benötigte eine Mindestmenge an injizierter dsRNA.

3.3 RNA Interferenz: Effekt der Injektion von dsLWOP auf Menge des Proteins

Der Effekt der Injektion von dsLWOP auf die Proteinmenge des LW-Opsins wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot untersucht. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der für das LW-Opsin einer Hummelart entwickelt wurde. Es wurden die LW-Opsin Mengen verschiedener Versuchsgruppen quantifiziert, die sich in der Zeit zwischen Injektion und Präparation sowie im Tageszeitpunkt von Injektion und Präparation voneinander unterschieden. Ferner wurde die Proteinmenge während 28 Stunden alle vier Stunden in nicht injizierten Tieren quantifiziert um zu untersuchen, ob es zu einer natürlichen Schwankung in der Proteinmenge während des Tages kommt.

3.3.1 Evaluation des LW-Opsin Antikörpers

Die Denaturierung der Proteine bei niedrigen Temperaturen (40°C) vor der SDS-PAGE erwies sich als kritischer Schritt, da eine Erhitzung auf 90°C, wie sie üblicherweise vorgenommen wird, zu einer Aggregatbildung zwischen Membranproteinen und SDS führen und die Ergebnisse erheblich verfälschen kann (Rehm 2000). Durch die Aggregatbildung kann ein Großteil der Proteine nicht aufgetrennt werden und verbleibt am Ort der Auftragung, außerdem kommt es zu unspezifischer und unregelmäßiger Anfärbung von Fragmenten (siehe Abb. 3.11).

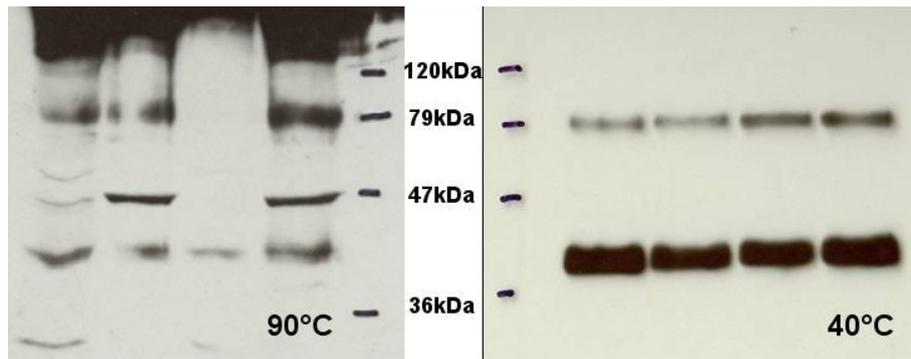


Abbildung 3.11: Einfluss der Denaturierungstemperatur auf die Detektion des LWOP-Proteins im Western Blot. Links Proben die 5 min bei 90°C denaturiert wurden (verschiedene Puffer, jeweils abwechselnd Überstand und Pellet nach Zentrifugation), rechts Proben, die 5 min bei 40°C denaturiert wurden. Mitte: Molekulargewichtsmarker. In diesem Fall wurden 12.5%ige Trenngele benutzt, daher werden keine Doppelbanden detektiert.

Der zur Detektion des LW-Opsin Proteins verwendete Antikörper („Bombus Rh1“) wurde für das LW-Opsin einer Hummelart entwickelt. Die Sequenz des dabei verwendeten Peptids wurde mit Hilfe des BLASTp-Algorithmus (Altschul et al. 1997) mit der Protein-Datenbank der Honigbiene verglichen (Honey Bee Genome Resources, siehe www.ncbi.nlm.nih.gov). Dabei wurde ein einziges Protein gefunden, welches einen Score > 40 aufweist, nämlich das LW-Opsin (Score = 45.6). Ein hoher Score weist auf eine starke Homologie zwischen den beiden Sequenzen hin. Die nächst ähnlichen Proteine der Honigbiene haben Scores < 27 und überdies berechnete Molekülgrößen, die sich von den detektierten Banden unterscheiden.

Der Antikörper detektierte im Western Blot zwei Proteine bei ~ 40 kDa, außerdem zwei weniger intensive Proteinsignale bei ~ 80 kDa (Abb. 3.12).

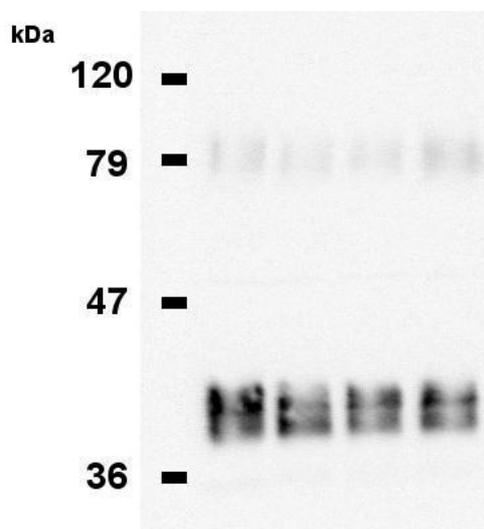


Abbildung 3.12: Western Blot nach Auftrennung von Extrakten optischer Loben durch SDS PAGE und Anfärbung mit Bombus Rh1 Antikörper. Links Markierungen durch verwendeten Molekulargewichts-Marker.

Die nach der Sequenz des LW-Opsins der Honigbiene vorhergesagte Molekülgröße beträgt 41.9 kDa, die der anderen retinalen Opsine (UVOp und BLOp) 41.3 kDa und 42.9 kDa. Ein Vergleich der Sequenzen der Opsine der Honigbiene und der des zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptids (ClustalW Alignment) zeigt, dass es sich bei der zweiten Bande bei ~ 40 kDa höchstwahrscheinlich nicht um eines der anderen Opsine handelt (Abb. 3.13). Es besteht eine hohe Übereinstimmung zwischen der Sequenz des zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptids und einer Sequenz am intrazellulären C-Terminus des LW-Opsins (16 von 19 Aminosäuren, 84% Homologie), aber nicht zu den anderen Opsin-Typen der Honigbiene (Abb. 3.13).

1	-----CTSTVSGTTTVADNEKSNA	Bombus_Rh1_AB
344	AKFPSLACAAEPSSDAV STTSGTTTV DNEKSNA	AM LWOP1
352	EKL PFLVCGSTEDQTAATAGDKASEN-----	AM LWOP2
341	KRLPWLELQE-----KPI SD STTT ETVNTPPASS	AM UVOP
349	KRCKWMIHEP-----ET TS DA TS AQ TE KI KT DE	AM BLOP

Abbildung 3.13: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptids (Bombus_Rh1_AB) mit dem C-Terminus der Sequenzen der Opsine für kurze (AM UVOP), mittlere (AM BLOP) und lange Wellenlängen (AM LWOP1 und AM LWOP2 (extraretinal (Velarde et al. 2005))). Mit Aminosäuren des Antikörpers übereinstimmende Sequenzen in rot. Zahlen geben die Position der ersten gezeigten Aminosäure in der Sequenz des Proteins an.

Bei der zweiten Bande bei ca. 40 kDa kann es sich um eine posttranslational modifizierte Form des Proteins handeln, bei den Banden bei ca. 80 kDa um Dimere des Proteins (Kurada et al. 1998, Kiefer et al. 2002).

Da es technisch nicht möglich war, die eng beieinander liegenden Doppelbanden für die Auswertung voneinander zu trennen, wurden jeweils beide Banden zusammen analysiert.

Als internes Kontrollprotein/Housekeepingprotein für die Quantifizierung wurde α -Tubulin genutzt, welches durch einen für Vertebraten entwickelten Antikörper bei einer Molekülgröße von ca. 60 kDa detektiert wurde. Die Anpassung der auf das Gel aufgetragenen Proteinmenge mit Hilfe eines Bradford Assays zeigte, dass die Expression des α -Tubulins konstant und unabhängig von der Tageszeit war.

Die Auftrennung von Homogenaten von optischen Loben durch Zentrifugation ergab, dass sich die Proteine, die durch den LW-Opsin Antikörper detektiert werden, im Pellet befinden, während das Kontrollprotein α -Tubulin ausschließlich im Überstand vorgefunden wurde. Die homogenisierten Präparate wurden daher vor Auftragung auf die SDS-Gele nicht zentrifugiert. Eine Verdünnungsreihe zeigte, dass eine Homogenatsmenge, die ca. 1/8 optischem Lobus entspricht, gut für die Quantifizierung der Proteine geeignet war; bei dieser Menge wird die Detektionsgrenze der ~80kDa-Banden des LW-Opsins und der Bande des α -Tubulins (Kontrollprotein zur Normalisierung; hier nicht gezeigt) übertroffen und die ~40 kDa-Banden liegen außerhalb der Sättigung (siehe Abb. 3.14).

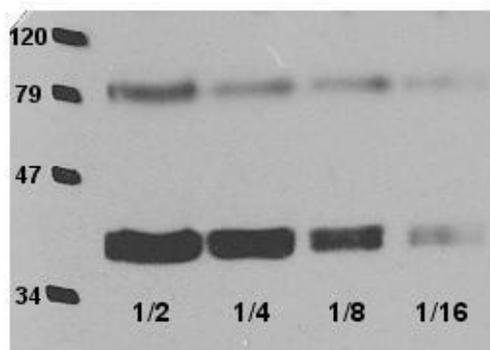


Abbildung 3.14: Verdünnungsreihe für Detektion der Banden durch den Antikörper für Hummel LW-Opsin. Homogenatsmengen entsprechen $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ und $\frac{1}{16}$ optischen Loben. Links: Molekulargewichtsmarker. In diesem Fall wurde ein 12.5%iges Trenngel benutzt, daher werden keine Doppelbanden detektiert.

3.3.2 Tageszeitliche Oszillationen der LW-Opsin Menge

Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers wurde zunächst untersucht, ob es natürliche tageszeitliche Schwankungen in der Menge des LW-Opsins gibt. Sasagawa et al. (2003) zeigten, dass die mRNA Menge des LW-Opsins der Honigbiene während des Tages stark schwankt. Diese Oszillation bleibt auch bestehen, wenn die Tiere konstanter Dunkelheit ausgesetzt sind, und eine künstliche Verschiebung des Tag-Nacht-Rhythmus (Licht-Dunkel-Rhythmus) resultiert in einer dazu relativen Verschiebung des Maximums der mRNA Menge. Durch den Vergleich einer (potentiellen) tageszeitabhängigen Änderung der Proteinmenge mit dem Verlauf der mRNA Expression könnte die Proteinturnoverrate geschätzt werden.

Es wurden vier Wochen alte Bienen einer Kohorte nach dreitägiger Haltung unter Licht-Dunkel-Konditionen (12h / 12h) benutzt. Über einen Zeitraum von 28 Stunden wurden alle vier Stunden die optischen Loben von jeweils vier Bienen entnommen, begonnen wurde um 10 Uhr früh, vier Stunden nach Beginn der Licht-Periode.

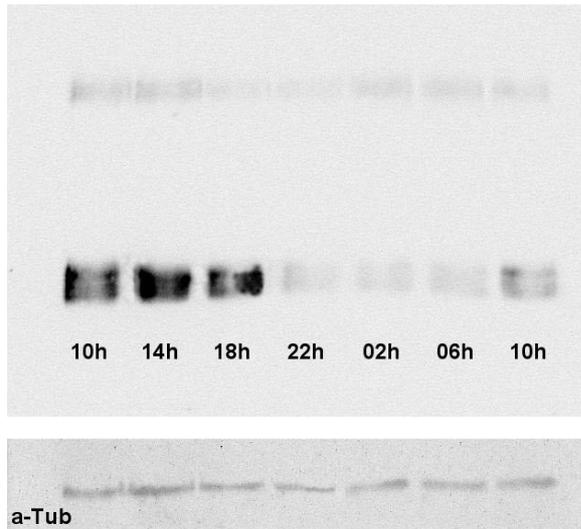


Abbildung 3.15: Untersuchung der tageszeitlichen Oszillation des LW-Opsins, beispielhafter Western Blot. Bienen wurden im 12h / 12h LD-Rhythmus gehalten (Licht an zwischen 06h und 18h).

Die Untersuchung der Abhängigkeit der LW-Opsin Menge von der Tageszeit ergab ein Maximum um 14h und eine folgende Abnahme um fast 50% (52% um sechs Uhr früh, Beginn der Lichtperiode) (~40 kDa Banden; siehe Abb. 3.16). Die Durchführung einer nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA zeigte, dass die tageszeitlichen Änderungen signifikant sind (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(6, N = 28) = 13.05, p = 0.04$). Die Proteinmenge nahm aber insgesamt nicht so stark ab wie die von Sasagawa et al. (2003) gemessene mRNA Menge.

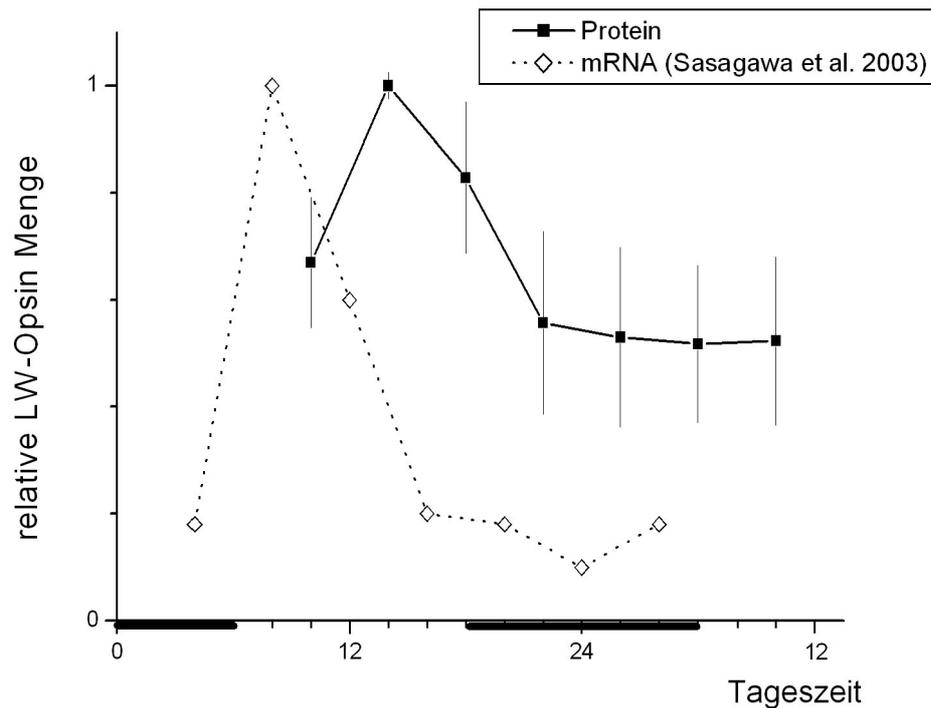


Abbildung 3.16: Relative LW-Opsin Menge (~40 kDa) in Abhängigkeit von der Tageszeit. Schwarze Quadrate, durchgezogene Linie: normalisierte gemessene Proteinmenge, Fehlerbalken = Standardfehler; N = 4 / Zeitpunkt. Zum Vergleich tageszeitliche Variation in LWOP mRNA (weiße Rhomben, gestrichelte Linie), entnommen aus Sasagawa et al. 2003.

Die Abnahme war weniger stark und eindeutig für die ~80 kDa Banden (Abb. 3.17). Eine Kruskal-Wallis ANOVA ergab keine signifikante Änderung der Menge während des Tages (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(6, N = 28) = 7.95, p = 0.24$).

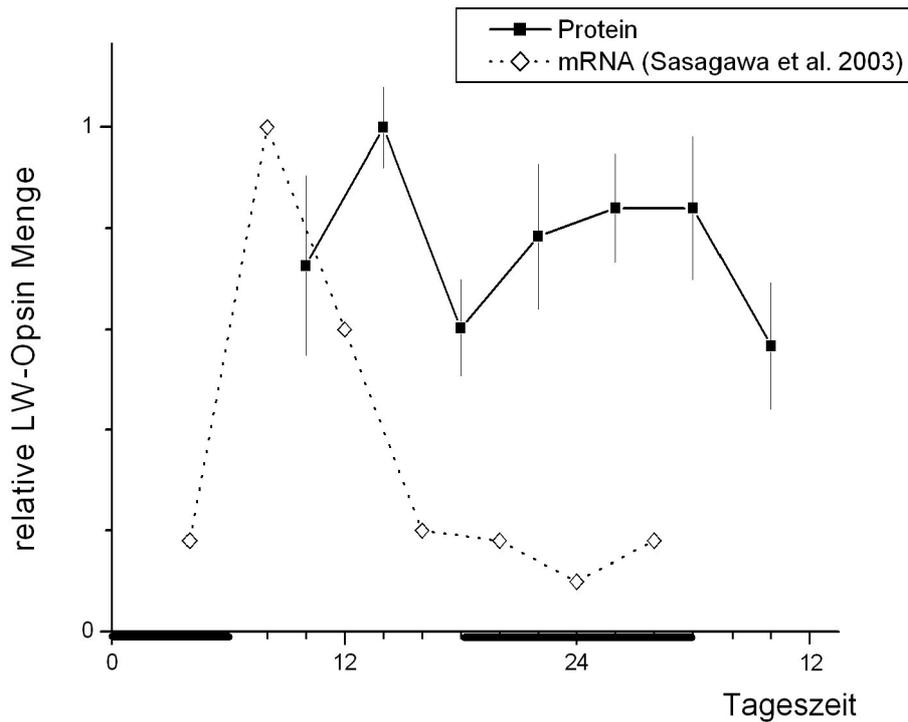


Abbildung 3.17: Relative LW-Opsin Menge (~80 kDa) in Abhängigkeit von der Tageszeit. Schwarze Quadrate, durchgezogene Linie: normalisierte gemessene Proteinmenge, Fehlerbalken = Standardfehler; N = 4 / Zeitpunkt. Zum Vergleich tageszeitliche Variation in LWOP mRNA (weiße Rhomben, gestrichelte Linie), entnommen aus Sasagawa et al. 2003.

3.3.3 Wirkung von RNAi auf die Proteinmenge

Die Wirkung der Injektion von dsLWOP auf die LW-Opsin Proteinmenge wurde zunächst mit einem Übersichtsexperiment mit wenigen Tieren aber an vielen verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Bienen wurden nach drei Tagen Haltung unter 12h / 12h Licht-Dunkel-Verhältnissen zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert und nach bestimmten Zeitspannen präpariert. Injektion und Präparation fanden immer zum Zeitpunkt des Wechsels der Beleuchtungskondition statt. Insgesamt gab es sechs Gruppen mit jeweils drei mit dsLWOP injizierten Tieren und drei Kontroll-Tieren. Diese Gruppengröße machte einen aussagekräftigen statistischen Test nicht möglich, sondern sollte zunächst einen Überblick über für die Inhibition durch RNAi wichtige Zeitspannen geben.

Eine deutliche Reduktion der Proteinmenge ließ sich 12 Stunden nach der Injektion erkennen, sowohl bei Auswertung der ~40 kDa Banden als auch der ~80 kDa

Banden (Abb. 3.18 und Abb. 3.19). Die Tiere dieser Gruppe waren frühmorgens injiziert und am Abend desselben Tages präpariert worden. Die LW-Opisin Menge in dsLWOP-injizierten Tieren an den anderen Zeitpunkten unterschieden sich nicht oder kaum von denen der Kontrollgruppe.

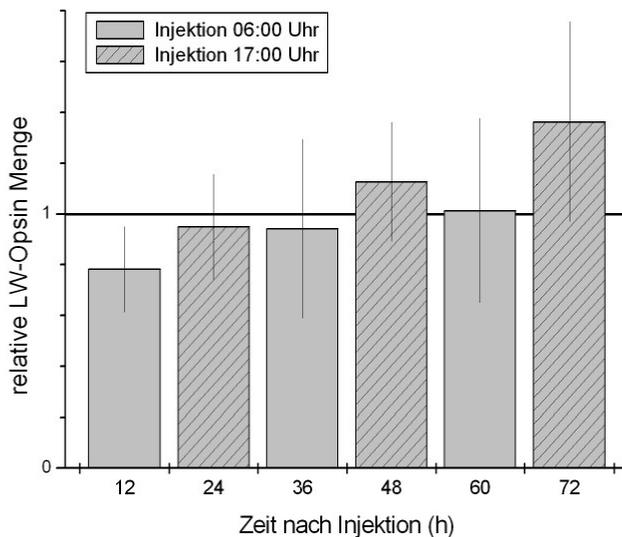


Abbildung 3.18: Pilotversuch, relative LW-Opisin Proteinmenge (~40 kDa Banden) in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Injektion mit dsRNA und Präparation, normiert auf Werte der Kontrollgruppe (=1). Das Muster der Balken gibt den ungefähren Tageszeitpunkt der Injektion an (siehe Legende). Fehlerbalken = Standardfehler. N = 3 / Gruppe.

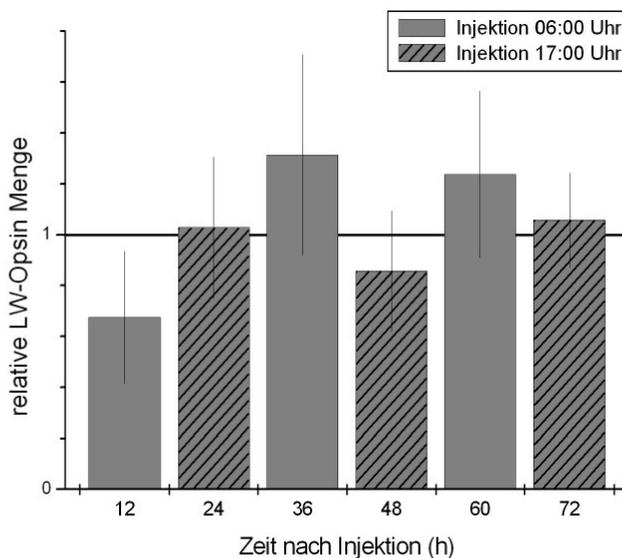


Abbildung 3.19: Pilotversuch, relative LW-Opisin Proteinmenge (~80 kDa Banden) in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Injektion mit dsRNA und Präparation, normiert auf Werte der Kontrollgruppe (=1). Das Muster der Balken gibt den ungefähren Tageszeitpunkt der Injektion an (siehe Legende). Fehlerbalken = Standardfehler. N = 3 / Gruppe.

Die Ergebnisse dieses Übersichtsexperiments führten zu einer Konzentration der Versuche auf eine Inkubationsdauer der dsRNA von 12 Stunden. In einem neuen Experiment wurden Bienen entweder am frühen Morgen oder am Abend injiziert (jeweils ungefähr zum Zeitpunkt „Licht an“ oder „Licht aus“) und 12 Stunden später

präpariert (Abb. 3.20). Während eine Injektion von dsLWOP zwischen 06:00 Uhr und 08:30 Uhr zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge auf ca. 75% im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (~40 kDa Banden, Mann-Whitney-U Test, $p < 0.05$), gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dsLWOP- und Kontrollgruppe wenn die Injektion zwischen 17:30 Uhr und 18:30 Uhr erfolgte; die Proteinmenge war im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar erhöht, wenn auch nicht signifikant (Mann-Whitney-U Test, $p > 0.25$).

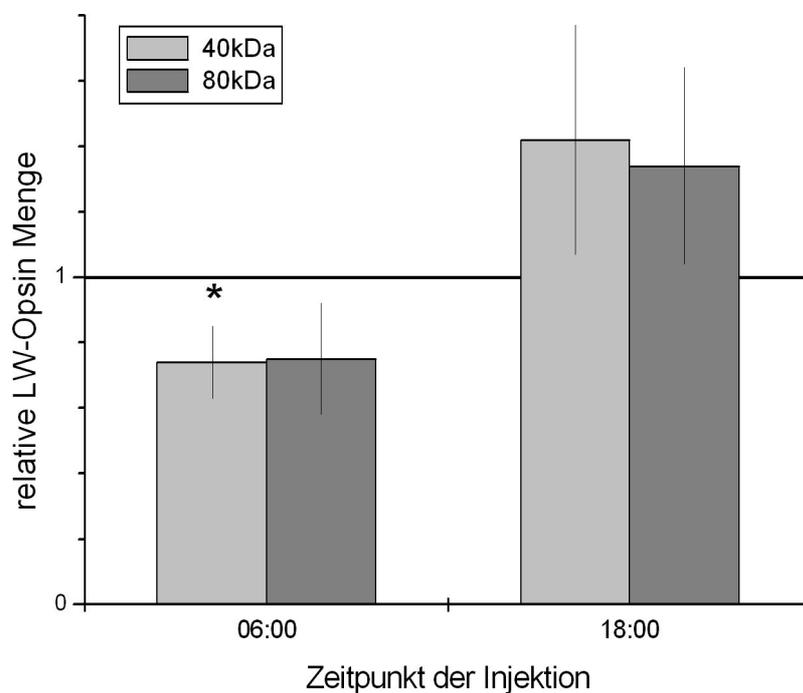


Abbildung 3.20: Relative LW-Opsin Proteinmenge 12 Stunden nach Injektion doppelsträngiger RNA in Abhängigkeit vom Tageszeitpunkt der Injektion, normiert auf Werte der Kontrollgruppe (=1). N = 10 (Injektion 06:00 Uhr) bzw. N = 12 (Injektion 18:00 Uhr), Fehlerbalken = Standardfehler, * = $p < 0.05$.

3.3.4 RNAi: Effekt auf Menge des Proteins - Zusammenfassung

Der Vergleich zwischen der Peptidsequenz, die von dem hier verwendeten LW-Opsin Antikörper erkannt wird, mit dem Genom der Honigbiene sowie die berechnete Molekülgröße für das LW-Opsin deuten darauf hin, dass es sich bei den im Western Blot detektierten Banden mit großer Wahrscheinlichkeit um das LW-Opsin handelt, welches in monomerischer und dimerischer Form vorliegt. Ähnlich wie die LW-Opsin mRNA ändert sich die Menge des Proteins im Laufe des Tages, zeitlich versetzt zur mRNA und weniger stark. Durch die Injektion von dsLWOP kann die Proteinmenge reduziert werden, der inhibierende Effekt ist jedoch vorübergehend und abhängig von der Tageszeit und/oder dem Adaptationsstatus des Auges zum Zeitpunkt der Injektion.

3.4 RNA Interferenz: Effekt der Injektion von dsLWOP auf die physiologischen Eigenschaften der Retina

Die Wirkung der Injektion von dsLWOP auf die Funktionsweise der Retina wurde mit Elektroretinogrammen (ERGs), extrazellulären Summenpotentialen der Retina, überprüft. Das injizierte Auge der Versuchstiere wurde mit drei unterschiedlichen LEDs in jeweils drei Intensitätsstufen stimuliert. Die Spektren der verwendeten LEDs waren abgestimmt auf die maximalen Empfindlichkeiten der drei Photorezeptortypen der Honigbiene (UV, Blau, Grün), um die verschiedenen Rezeptorpopulationen unterschiedlich stark ansprechen zu können. Da die Quantifizierung des LW-Opsins durch Western Blot eine transiente Reduktion des Proteins 12 Stunden nach einer Injektion am Morgen ergeben hatte, wurde jedes Versuchstier 12 und 24 Stunden nach der morgendlichen Injektion doppelsträngiger RNA gemessen. Es wurde erwartet, dass die (relative) Antwort auf grüne Stimuli in der (dsLWOP injizierten) Experimentalgruppe im Vergleich mit der (dsCAT injizierten) Kontrollgruppe zeitweise abnimmt.

Nach einer ersten Überprüfung der Messungen mussten zunächst 15 von 58 Datensätzen verworfen werden, da es während des Wechsels der LEDs zu Störungen und somit Verfälschungen der Messungen kam. Insgesamt konnten jeweils 12 Messungen von dsLWOP-injizierten und Kontrolltieren für den Zeitpunkt 12 Stunden

nach Injektion sowie von 10 dsLWOP injizierten Bienen und 9 Kontrolltieren 24 Stunden nach Injektion ausgewertet werden.

Ein erster Überblick über eine komplette Messung zeigt bereits, dass die Stärke der Reizantwort erwartungsgemäß intensitätsabhängig ist (Abb. 3.21).

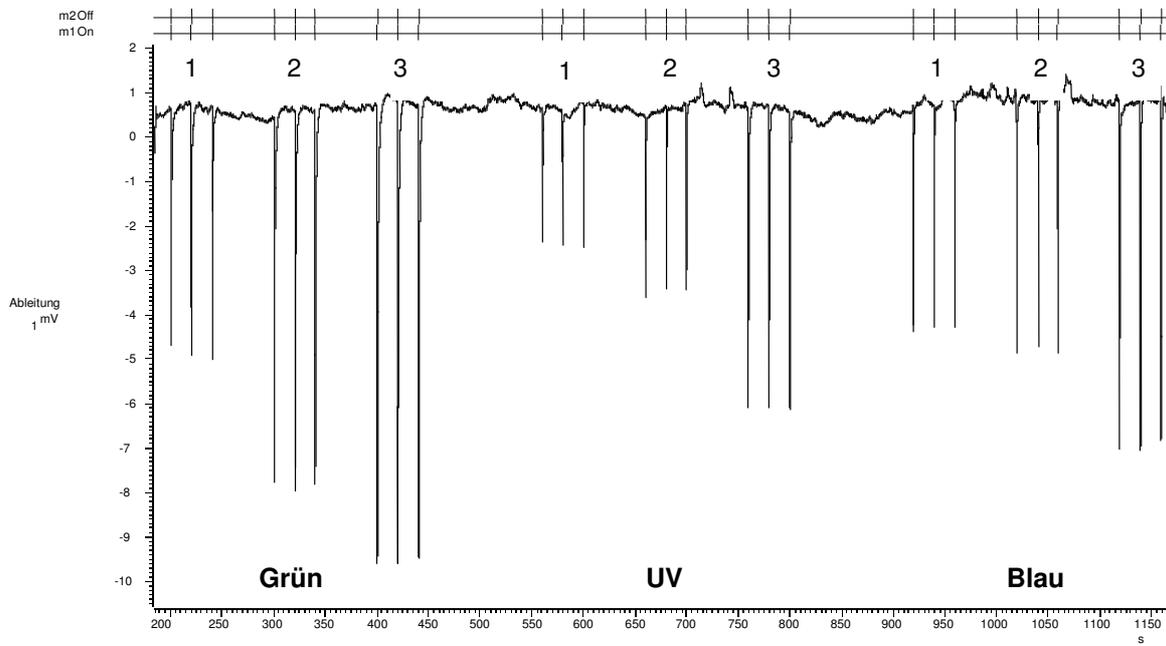


Abbildung 3.21: Übersichtsbeispiel über ca. 16 Minuten Messung des ERGs. Gereizt wurde in der Reihenfolge grüne - UV- blaue LED, jeweils in drei Intensitäten (1, 2, 3) in jeweils drei Wiederholungen; Stimulationsdauer = 241 ms.

3.4.1 Normalisierte Reizantworten

Für jede Reizantwort auf die 241 ms langen Stimulationen wurden die Parameter On-Antwort, Plateau, sustained Antwort (am Ende der Stimulation) und Off-Antwort gemessen (siehe Abb. 3.22). Es wird davon ausgegangen, dass sich On- und Off-Antworten aus Potentialänderungen in der Retina und der Lamina zusammensetzen, während die anderen Komponenten ausschließlich von den Antworten der Photorezeptorzellen getragen werden (Goldsmith 1960, Heisenberg 1971).

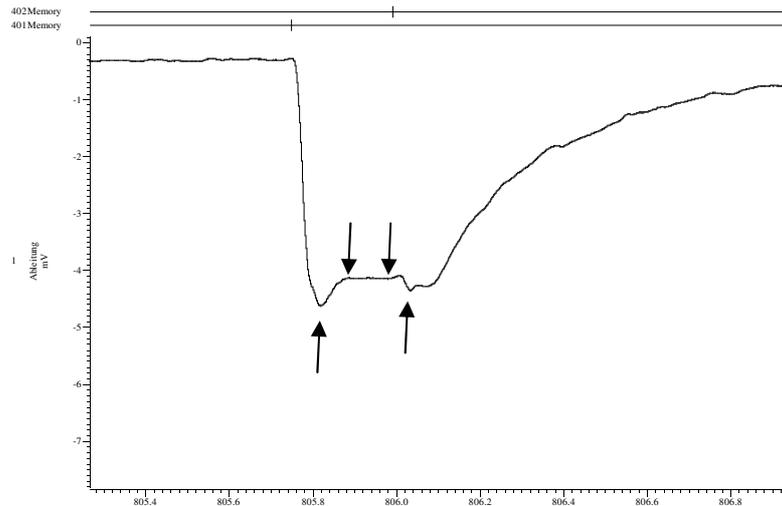


Abbildung 3.22: Gemessene Komponenten des ERGs während 241 ms Stimulus (grüne LED, mittlere Intensität). Von links nach rechts (Pfeile): On, Plateau, Sustained, Off.

Da oftmals klare On- oder Off-Antworten fehlten oder kein eindeutiger Plateauwert definiert werden konnte (siehe Abb. 3.26), sind nachfolgend die Analysen der sustained Komponente dargestellt.

Bei einer nicht-kontinuierliche Ableitung von ERGs können keine absoluten Werte verwendet werden, um Unterschiede zwischen den Messungen an verschiedenen Zeitpunkten zu berechnen, und absolute Werte können auch nicht bei dem Vergleich von Kontroll- und Experimentalgruppe verwendet werden. Relative Werte erhält man durch die Normalisierung aller Werte einer Messung auf die Reizantwort auf einen (arbiträr gewählten) definierten Stimulus.

Diese klassische Art der Auswertung des ERG durch Normalisierung auf die Antwort auf die höchste Intensität der UV LED ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Antworten von dsLWOP injizierten Tieren und Kontrolltieren, weder 12 noch 24 Stunden nach der Injektion (Mann-Whitney-U Test, n. s.) (Abb. 3.23).

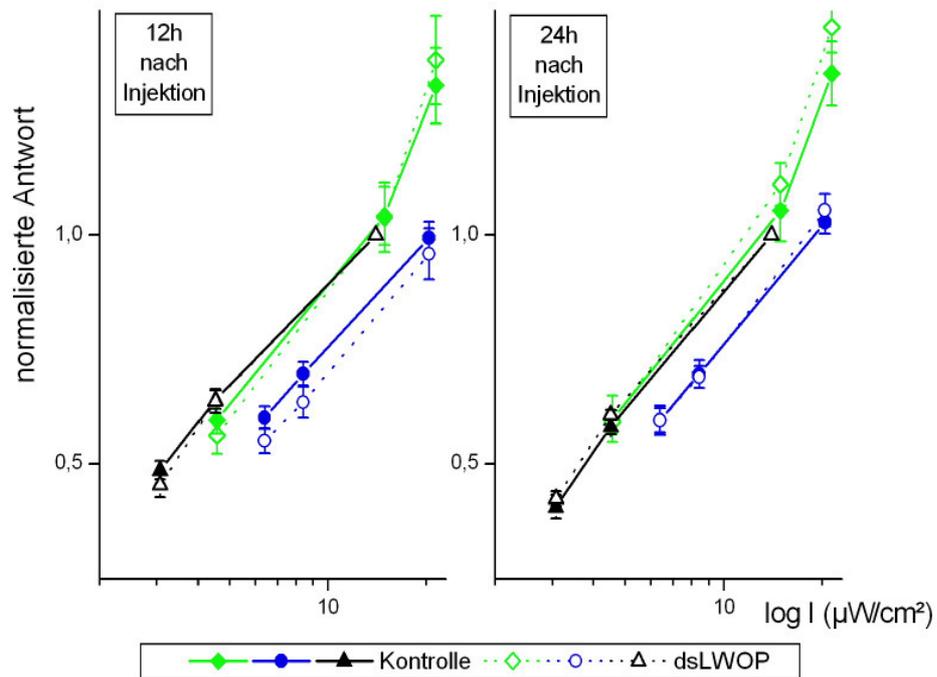


Abbildung 3.23: Normalisierte Reizantworten von Kontroll- und dsLWOP injizierten Tieren (sustained Komponente) auf UV, blaue und grüne Beleuchtung unterschiedlicher Intensität. Farben der Symbole/Linie entsprechen Farben der LEDs, UV = schwarz. Kontrolltiere = durchgezogene Linien, gefüllte Symbole; N = 12/9, dsLWOP injizierte Tiere = unterbrochene Linien, leere Symbole; N = 12/10, 12 und 24 Stunden nach der Injektion. Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler.

Auch eine alternative Art der Darstellung, bei der Abend- und Morgenmessungen getrennt für Kontroll- und dsLWOP injizierte Tiere verglichen wurden, zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 3.24).

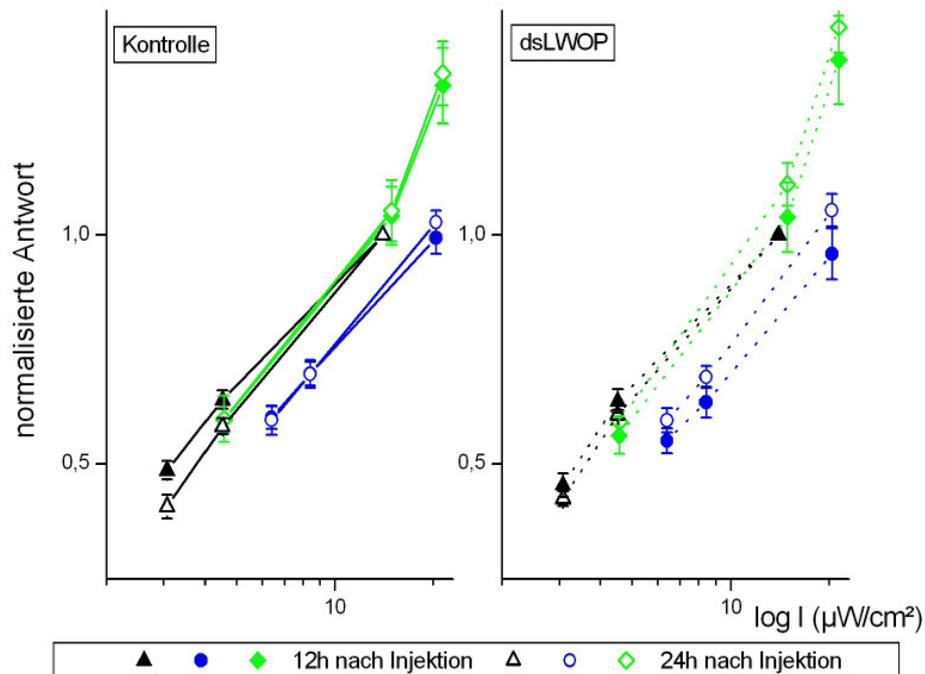


Abbildung 3.24: Normalisierte Reizantworten in Abend- und Morgenmessungen (sustained Komponente) auf UV, blaue und grüne Beleuchtung unterschiedlicher Intensität. Farben der Symbole/Linie entsprechen Farben der LEDs, UV = schwarz. Abends/12h nach Injektion = gefüllte Symbole, morgens/24h nach Injektion = leere Symbole, getrennt für dsLWOP injizierte Tier (rechter Graph, unterbrochene Linien; N = 12/10) und Kontrolltiere (linker Graph, durchgezogene Linien; N = 12/9). Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler.

Es besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Intensität des Stimulus und Reizantwort.

Die Stimulation mit der schwächsten Intensität der grünen LED ruft eine ähnlich starke sustained Antwort hervor wie die mittlere Intensität der UV LED und die schwächste Intensität der blauen LED. Die Stimulation mit der mittleren Intensität der grünen LED ruft eine ähnlich starke sustained Antwort hervor wie die höchste Intensität der UV LED und die höchste Intensität der blauen LED. Diese Informationen werden in späteren Analyseschritten genutzt, um zu vergleichen, welche Auswirkung die Farbe der LEDs auf verschiedene Komponenten der Reizantwort hat.

Die Auftragung der relativen Reizantwort über dem für alle drei Rezeptortypen aufsummierten absorbierten Photonenstrom ($Q_S + Q_M + Q_L$) zeigt überdies eine starke Korrelation zwischen der normalisierten Antwort und relativer Menge der absorbierten Photonen, unabhängig von der dominierenden Wellenlänge (Spearman Rank Korrelation $R = 0.93$, $p < 0.001$) (Abb. 3.25).

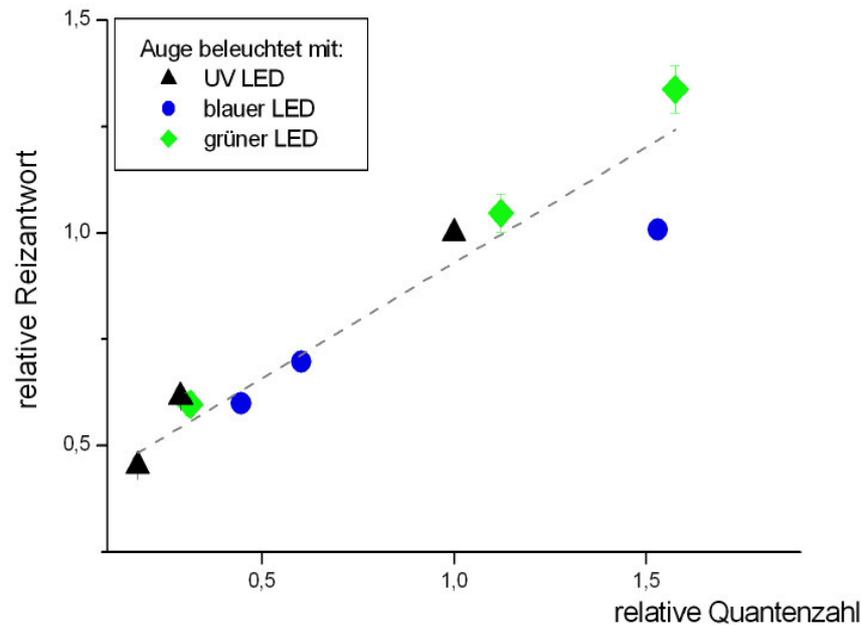


Abbildung 3.25: Normalisierte Reizantworten in Abhängigkeit vom summierten absorbierten Photonenstrom (sustained Komponente, Kontrolltiere, 24h Messung, $N = 9$). Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler.

3.4.2 Form der Reizantworten

Die teilweise sehr unterschiedlichen Formen der ERGs erschwerte die Analyse einiger Komponenten. Oftmals fehlten deutlich abgrenzbare On- und Off-Antworten und/oder statt eines stabilen Plateaus fiel das Potential während der Stimulation stetig ab oder stieg an (Abb. 3.26). Der Grund für die Formenvielfalt ist unbekannt, häufig werden zugunsten der Vergleichbarkeit von Daten solche „untypischen“ ERGs verworfen (Seibt 1967, Menzel 1971).

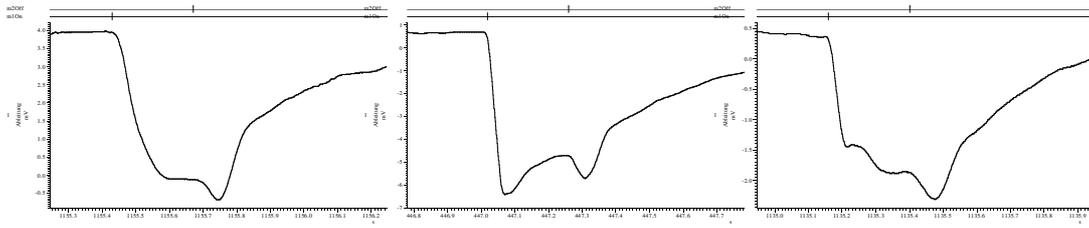


Abbildung 3.26: Verschiedene Formen des ERGs; obere Markierungen geben Zeitpunkt an, an dem der Stimulus ein- bzw. ausgeschaltet wird.

Um zu untersuchen, ob der Verlauf bzw. die Form der ERGs durch die Behandlung mit dsLWOP beeinflusst wird oder sich zwischen Abend- und Morgenmessungen unterscheidet, wurden die Kurvenverläufe jeder Einzelmessung normalisiert. Dazu wurde der Messwert zu Anfang der Stimulation als 0 definiert, der zu Ende als -1. Somit sind die Formen der ERGs innerhalb einer Messung sowie zwischen Messungen vergleichbar. Abb. 3.27 zeigt die so erhaltenen „Verlaufskurven“ von Kontrolltieren (schwarz) und dsLWOP injizierten Tieren (rot) 12 Stunden nach Injektion bei Stimulation mit der grünen LED (mittlere Intensität). Es ist zu erkennen, dass es eine große Varianz zwischen den Einzelmessungen gab; ein Unterschied zwischen den Verläufen von dsLWOP- und Kontrollgruppe ist nicht offensichtlich.

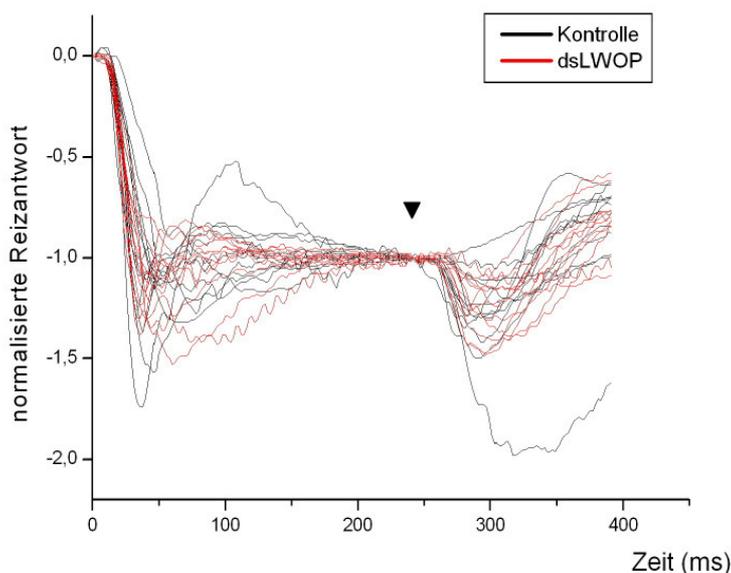


Abbildung 3.27: Normalisierte Verläufe der ERGs bei Stimulation mit grünem Licht, mittlere Intensität. Schwarz = Kontrolltiere (N = 12), Rot = dsLWOP injizierte Tiere (N = 12). Das Ende der Stimulation (Normalisierungspunkt) wird durch den schwarzen Pfeil angezeigt.

Vergleicht man die gemittelten relativen Verlaufskurven der dsLWOP- und Kontrollgruppen, getrennt nach Stimulationsfarbe sowie Zeitpunkt der Messung (12/24 Stunden nach Injektion), sieht man nur kleine Unterschiede in den Formen, die meist innerhalb des Standardfehlers liegen (Abb. 3.28).

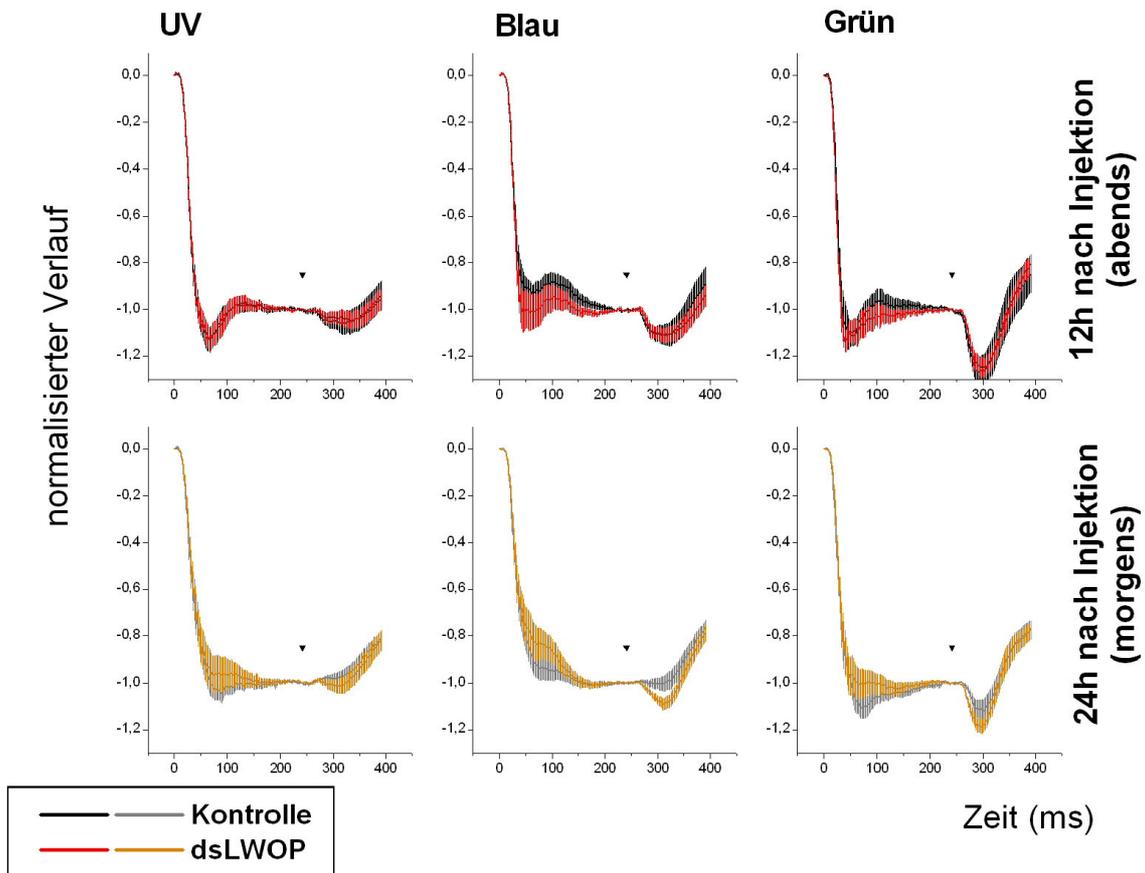


Abbildung 3.28: Vergleich der mittleren normalisierten Verläufe zwischen Kontroll- und dsLWOP injizierten Tieren; alle drei Beleuchtungsfarben, exemplarisch für jeweils eine Intensitätsstufe (UV: höchste Intensität, Blau: höchste Intensität, Grün: mittlere Intensität); Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler. Obere Graphen: Verlauf 12 Stunden nach Injektion, schwarz = Kontrollgruppe (N = 12), rot = dsLWOP injizierte Gruppe (N = 12). Untere Graphen: Verlauf 24 Stunden nach Injektion, grau = Kontrollgruppe (N = 9), orange = dsLWOP injizierte Gruppe (N = 10).

Die sichtbaren Unterschiede im Verlauf sind größer, wenn man nicht dsLWOP injizierte Tiere mit den parallel gemessenen Kontrolltieren vergleicht, sondern die Messungen, die abends (12 Stunden nach Injektion) durchgeführt wurden mit denen, die morgens aufgenommen wurden (24 Stunden nach Injektion) (Abb. 3.29).

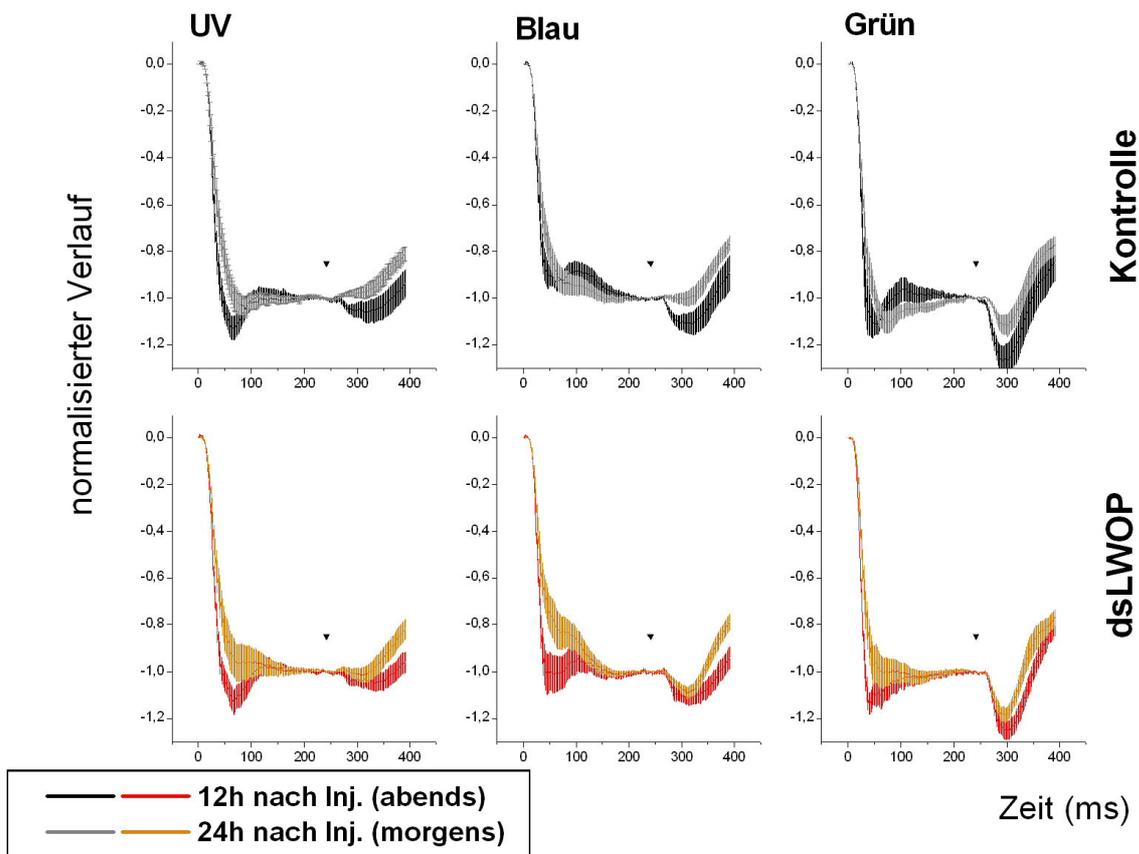


Abbildung 3.29: Vergleich der mittleren normalisierten Verläufe zwischen Abend- und Morgenmessungen; alle drei Beleuchtungsfarben, exemplarisch für jeweils eine Intensitätsstufe (UV: höchste Intensität, Blau: höchste Intensität, Grün: mittlere Intensität); Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler. Obere Graphen: Verlauf für Kontrolltiere, schwarz = 12h nach Injektion (N = 12), grau = 24h nach Injektion (N = 9). Untere Graphen: Verlauf für dsLWOP injizierte Tiere, rot = 12h nach Injektion (N = 12), orange = 24h nach Injektion (N = 10).

3.4.3 *Behandlungs- und tageszeitabhängige Ausprägung der transienten Komponenten*

Man sieht bei diesem Vergleich zwischen Abend- und Morgen-Messungen (Abb. 3.29) dass die transienten Komponenten (On- und Off-Komponenten) sowohl bei dsLWOP injizierten als auch Kontrolltieren in der Abendmessung (also 12 Stunden nach Injektion) stärker ausgeprägt waren als 24 Stunden nach der Injektion (Morgen-Messung).

Diese Unterschiede in der Entwicklung von On- und Off-Komponente sind gut zu sehen wenn man Differenzkurven bildet, indem die mittleren Verlaufskurven der

Morgenmessung (24h nach Injektion) von denen der Abendmessung (12h nach Injektion) subtrahiert werden, hier am Beispiel Antwort auf niedrigste Grün-Intensität (Abb. 3.30).

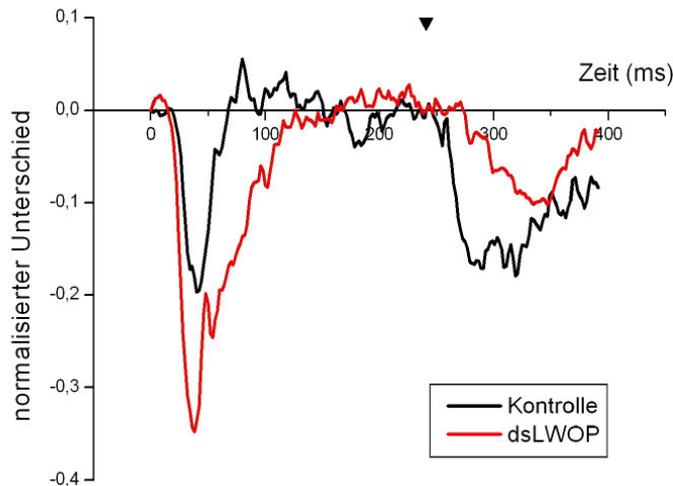


Abbildung 3.30: Vergleich der abends-morgens-Differenzkurven von dsLWOP injizierten Tieren (rot) und Kontrolltieren (schwarz).

Um dies zu quantifizieren, wurden nach Durchsicht der gemittelten normalisierten Verlaufskurven verschiedenen Maße für die transienten Komponenten gewählt und zwischen den Gruppen verglichen. Als Maß für die On-Komponente wurde das (normalisierte) Minimum, der Zeitpunkt, an dem 75% des Endwertes erreicht wurden, sowie das Integral der ersten 100 ms und im Zeitraum 26-76 ms nach Stimulusbeginn ausgewertet. Die Off-Komponente wurde durch den (normalisierten) minimalen Wert innerhalb von 100 ms nach Stimulusende sowie das Integral während dieser Zeitspanne charakterisiert. Tabelle 3.02 zeigt die Ergebnissen dieser statistischen Vergleiche (Mann-Whitney-U Test, α -Level 0.05).

LED Farbe	Intensitätsstufe	Vergleich zwischen Gruppen	On-Komponente				Off-Komponente	
			Minimum (Stimulus Dauer)	Zeitpunkt 75%	Integral 0-100ms	Integral 26-76ms	Minimum (100ms nach Stimulus Ende)	Integral 241-341ms
UV	1	dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
		Kontrolle 12h-24h						x
	2	dsLWOP 12h-24h						
		dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
	3	Kontrolle 12h-24h					x	x
		dsLWOP 12h-24h						
		dsLWOP 12h-24h						
Blau	1	dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
		Kontrolle 12h-24h						
	2	dsLWOP 12h-24h						
		dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
	3	Kontrolle 12h-24h					x	x
		dsLWOP 12h-24h						
		dsLWOP 12h-24h						
Grün	1	dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
		Kontrolle 12h-24h					x	x
	2	dsLWOP 12h-24h				x		
		dsLWOP-Kontrolle 12h						
		dsLWOP-Kontrolle 24h						
	3	Kontrolle 12h-24h						
		dsLWOP 12h-24h	x	x		x		
		dsLWOP 12h-24h						
3	dsLWOP-Kontrolle 12h							
	dsLWOP-Kontrolle 24h							
	Kontrolle 12h-24h							
3	dsLWOP 12h-24h	x			x	x		
	dsLWOP 12h-24h							
	dsLWOP 12h-24h							

Tabelle 3.02: Unterschiede in charakteristischen Merkmalen der normalisierten Reizantwort im ERG für jede verwendete LED-Farbe und –Intensität. **x** symbolisiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen ($p < 0.05$, Mann-Whitney-U); verglichen wurden die parallel gemessenen Kontroll- mit dsLWOP injizierten Tieren 12 Stunden nach Injektion („dsLWOP-Kontrolle 12h“) und 24 Stunden nach Injektion („dsLWOP-Kontrolle 24h“) sowie die Messungen 12 Stunden nach Injektion mit den Messungen 24 Stunden nach Injektion sowohl der dsLWOP injizierte Tiere („dsLWOP 12h-24h“) als auch der Kontrolltiere („Kontrolle 12h-24h“).

Die in Tabelle 3.02 untersuchten Merkmale unterschieden sich nicht zwischen zeitlich parallel gemessenen Gruppen (dsLWOP vs. Kontrolle, weiße Zeilen), in einigen Fällen aber zwischen Abend- und Morgenmessungen (graue Zeilen). Interessanterweise gibt es signifikante Unterschiede in Merkmalen, die zur Beschreibung der On-Komponente herangezogen werden können, ausschließlich bei Messungen von dsLWOP injizierten Tieren. Unterschiede in der Off-Komponente kommen dagegen nur bei Kontrolltieren vor.

Der direkte Vergleich von On- und Off-Komponenten (charakterisiert durch das Integral der normalisierten Verlaufskurven über den Zeitraum 26-76 ms nach Stimulationsbeginn bzw. 100 ms nach Stimulationsende) bei der Stimulation mit der niedrigsten Grün-Intensität zeigt, dass Unterschiede zwischen Messungen 12 Stunden nach Injektion und Messungen 24 Stunden nach Injektion größer sind als Unterschiede zwischen den parallel gemessenen dsLWOP- und Kontrollgruppen. Die Abnahme in der On-Komponente ist stärker bei dsLWOP injizierten Tieren, in der Off-Komponente divergieren dagegen die Kontrolltiere stärker zwischen Abend- und Morgenmessung (Abb. 3.31).

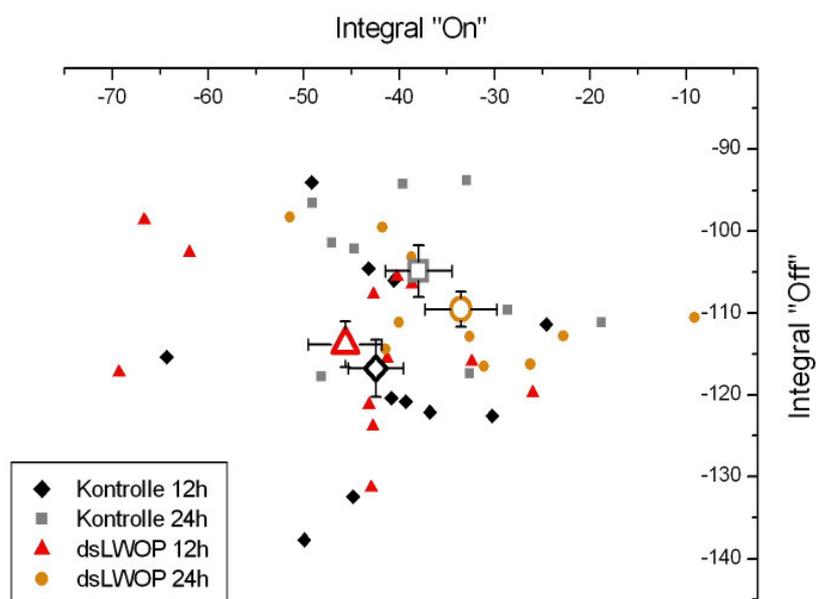


Abbildung 3.31: On- und Off-Komponenten aller normalisierten Verlaufskurven bei Stimulation mit Grün niedrigster Intensität, gemessen als Integral über den Zeitraum 26-76 ms nach Beginn des Stimulus (On) sowie 100 ms nach Beendigung des Stimulus (Off). Kleine Symbole stehen für einzelne Messungen, große für Mittelwerte der Gruppen; Mittelwerte, Fehlerbalken = Standardfehler.

Diese Unterschiede in der Entwicklung der transienten Komponenten zwischen der Abend- und der Morgenmessungen treten auch bei der Beleuchtung mit den anderen verwendeten Farben auf. Abb. 3.32 zeigt die Unterschiede zwischen Abend- und Morgenmessungen exemplarisch für jeweils eine Intensitätsstufe (UV: mittlere Intensität, Blau/Grün: niedrigste Intensität; diese Intensitätsstufen riefen ungefähr gleich starke sustained Antworten hervor (Abb. 3.23)) und getrennt für dsCAT injizierte Kontrolltiere und dsLWOP injizierte Experimentaltiere.

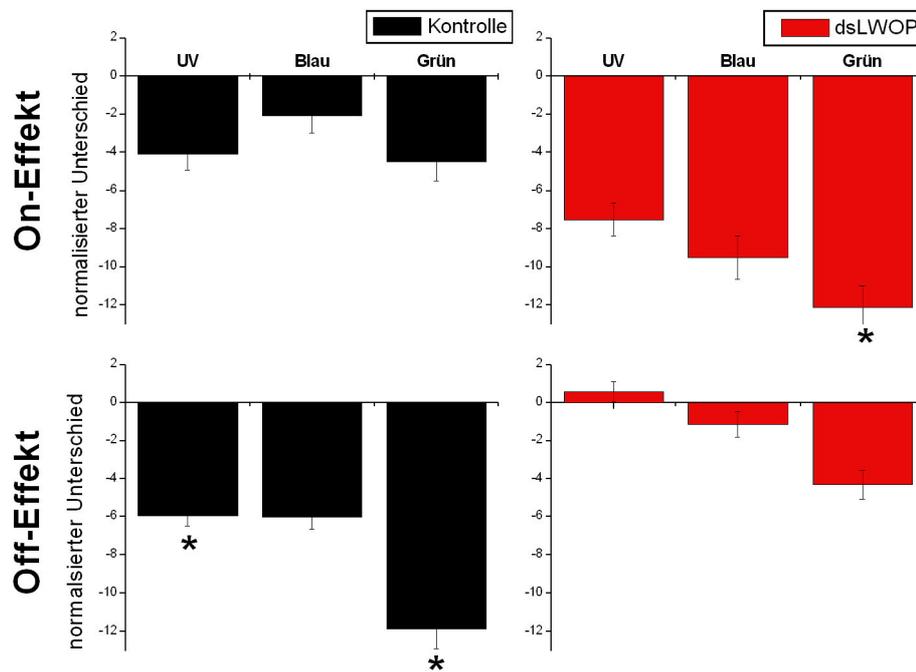


Abbildung 3.32: Unterschiede in transienten Komponenten zwischen Abend- und Morgen-Messungen für alle drei Beleuchtungsfarben. Berechnung der normalisierten Unterschiede durch Subtraktion der Mittelwerte 24 Stunden nach Injektion von Mittelwerten der Messungen 12 Stunden nach Injektion. Als Maß für den On-Effekt wurde das Integral über die Zeitspanne 26-76 ms nach Beginn der Stimulation, für den Off-Effekt das Integral über 100 ms nach Beendigung der Stimulation verwendet, jeweils der mittleren normalisierten Verlaufskurven. Fehlerbalken = Standardfehler. * = statistisch signifikanter Unterschied zwischen Abend- und Morgenmessung ($p < 0.05$, Mann-Whitney-U Test, siehe Tab. 3.02).

3.4.4 Kennlinien der On-, Off- und sustained Komponenten

Vergleicht man die normalisierten Verlaufskurven bei grüner Beleuchtung unterschiedlicher Intensität, so zeigt sich, dass das Verhältnis von Intensität zu Reizantwort, also die Steigung der Kennlinie, der On-Komponente ein anderes ist als das der Off-Komponente (Abb. 3.33): das Verhältnis von Off-Antwort zur sustained

Antwort bleibt konstant (siehe jew. rechte Pfeile in Abbildung 3.33), die Kennlinien von sustained und Off-Antwort verlaufen also parallel. Dagegen erreicht das Potential der On-Antwort bei der schwächsten Intensität nicht den Wert der sustained-Antwort, während bei der höchsten Intensität dieser deutlich übertroffen wird (siehe jew. linke Pfeile in Abbildung 3.33). Die Kennlinie der On-Antwort ist also steiler als die der sustained- und die der Off-Antwort.

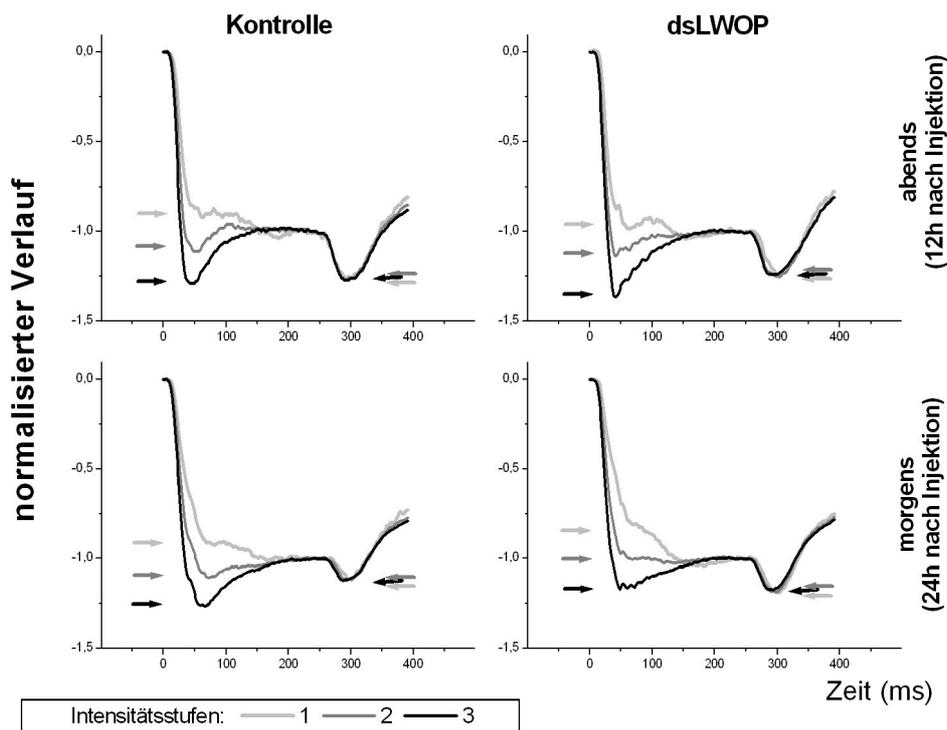


Abbildung 3.33: Mittlerer normalisierter Verlauf der Reizantwort bei grüner Beleuchtung unterschiedlicher Intensität für Kontrollgruppe und dsLWOP injizierte Tiere, jeweils 12 und 24 Stunden nach Injektion. Pfeile illustrieren die unterschiedliche Relation von On- und Off-Komponente zur sustained Antwort in Abhängigkeit von der Intensität

Abbildung 3.34 zeigt die Kennlinien der sustained-, On- und Off-Antworten der gemittelten Verlaufskurven. Diese wurden aus den zur Analyse der Form normalisierten mittleren Verlaufskurven erstellt, es können daher aufgrund der Normalisierung ausschließlich Aussagen über die Relation zwischen Kennlinien der einzelnen Komponenten gemacht werden.

In der Kontrollgruppe ähneln sich (analog zu den in den Abbildungen 3.30 – 3.32 dargestellten Ergebnissen) die Relation zwischen On- und sustained-Antwort zwischen Abend- und Morgen-Messung, aber der Abstand zwischen den Kennlinien

von Off- und sustained-Antwort ist 24 Stunden nach Injektion (Morgenmessung) kleiner als 12 Stunden nach Injektion (Abendmessung; siehe rote Pfeile).

Bei den dsLWOP injizierten Tieren dagegen gibt es deutliche Unterschiede in der Relation zwischen On- und sustained-Antwort wenn man die Messungen 12 und 24 Stunden nach Injektion vergleicht (siehe orange Pfeile).

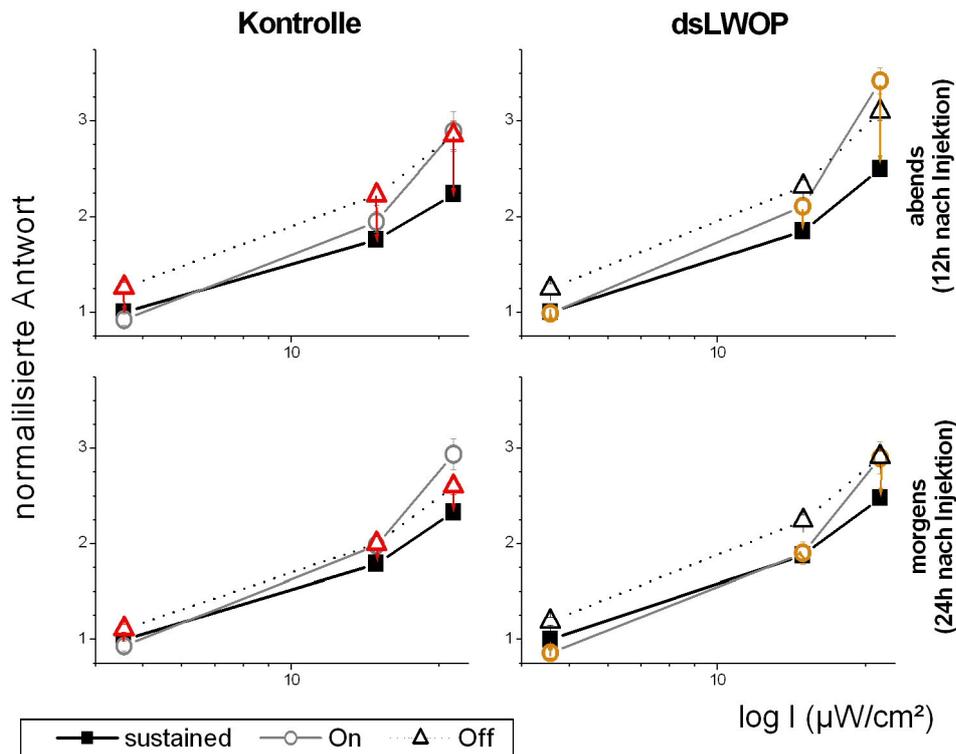


Abbildung 3.34: Kennlinien der sustained-, On- und Off-Komponenten der gemittelten Verlaufskurven bei grüner Beleuchtung, für Kontroll- (links) und dsLWOP injizierte Tiere (rechts), jeweils abends (oben) und morgens gemessen (unten); Pfeile illustrieren Veränderungen in der Relation zwischen sustained- und einer transienten Komponente zwischen Abend- und Morgenmessungen, Fehlerbalken = Standardabweichung.

Die Abbildungen 3.35 und 3.36 geben eine Übersicht über die normalisierten Verlaufskurven für alle Intensitätsstufen aller LED-Farben, getrennt nach Behandlung der Tiere und der Zeit nach der Injektion. Die unterschiedliche tageszeitliche Entwicklung von On- und Off-Komponenten bei Kontroll- und Experimentaltieren ist auch bei UV und blauer Stimulation zu sehen.

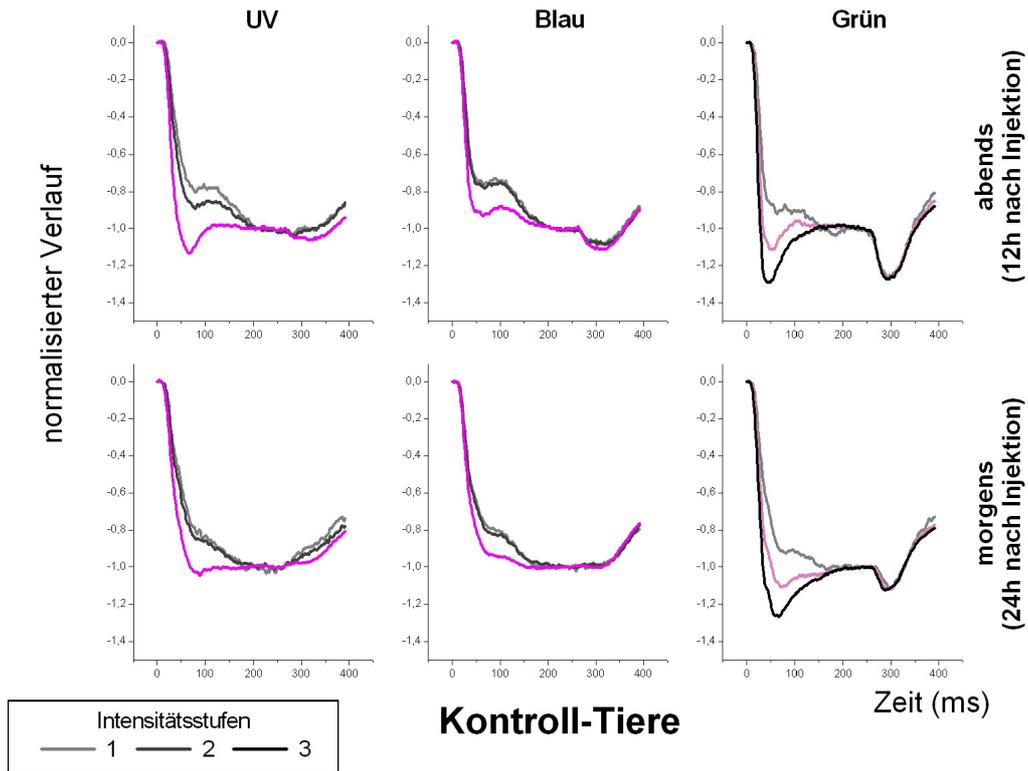
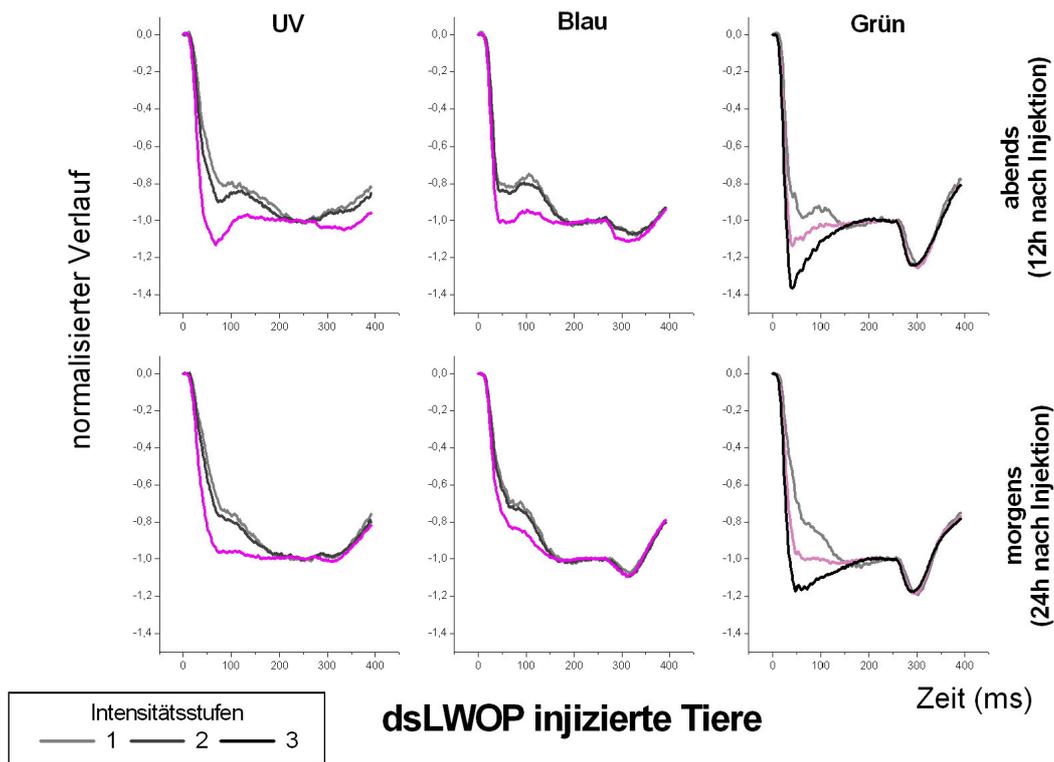


Abbildung 3.35: Normalisierte Verlaufskurven der Kontrolltiere (Mittelwerte) für alle Beleuchtungsfarben und –intensitäten. In rosa Kurven für Intensitäten, die die gleiche sustained-Antwort hervorrufen (siehe Text).



Abbildungen 3.36: Normalisierte Verlaufskurven der dsLWOP injizierten Tiere (Mittelwerte) für alle Beleuchtungsfarben und –intensitäten. In rosa Kurven für Intensitäten, die die gleiche sustained-Antwort hervorrufen (siehe Text).

Die erste Auswertung der gemessenen ERG-Komponenten hatte ergeben, dass die mittlere Intensitätsstufe der grünen LED eine gleich starke sustained-Antwort hervorruft wie die stärkste UV und blaue Stimulation (siehe Abb. 3.23). Vergleicht man für diese Intensitäten die Relation zwischen sustained-Antwort und den transienten Komponenten, sieht man, dass letztere bei grüner Beleuchtung im Verhältnis stärker ausgeprägt sind (rosa Kurven in den Abbildungen 3.35 und 3.36). Besonders die Off-Komponente ist schwächer ausgeprägt bei UV und blauer Beleuchtung als bei Stimulation mit der grünen LED bzw. nicht vorhanden. Die chromatischen Eigenschaften des Stimulus spielen also bei der Erzeugung der transienten Komponenten eine Rolle.

3.4.5 RNAi: Effekt auf die physiologischen Eigenschaften der Retina - Zusammenfassung

Die Messung der Empfindlichkeit der Retina durch Elektroretinogramme 12 und 24 Stunden nach der Injektion von doppelsträngiger RNA mit der Sequenz des LW-Opsins offenbarte keine Unterschiede zu einer Kontrollgruppe, wenn die Reizantworten auf verschiedenfarbige Lichter durch Normalisierung auf die Antwort bei einer definierten Farb-Intensitätskombination ausgewertet wurden.

Die Analyse der Form bzw. des Verlaufs der Reizantwort ergab, dass die transienten On- und Off-Komponenten relativ zur allein von Photorezeptoren erzeugte sustained-Komponente zwischen der ersten und der zweiten Messung abnahmen. Die Änderungen waren unterschiedlich stark ausgeprägt bei Kontroll- und Experimentalgruppe sowie bei den verschiedenen Farb-Intensitäts-Kombinationen. Die Untersuchung der Intensitäts-Antwort Funktionen der so normalisierten On-, Off- sowie sustained-Komponenten zeigte, dass sie zu großen Teilen unabhängig voneinander sind und dass die Ausprägung der transienten Komponenten abhängig von der Farbe der Beleuchtung ist.

3.5 Klassische Konditionierung visueller Stimuli

Kuwabara (1957) und Hori et. al (2006) beschrieben die grundlegenden Eigenschaften der klassischen Konditionierung der PER mit monochromatischen visuellen Stimuli. In dieser Arbeit wurden die Bedeutung von chromatischen und achromatischen Eigenschaften von Farben beim Lernen von und Differenzieren zwischen Stimuli sowie Gedächtnisbildung und Extinktion untersucht.

3.5.1 Absolute Konditionierung verschiedenfarbiger Stimuli

In einem ersten Experiment wurde ermittelt, ob Farbe, Intensität oder L-Rezeptor-Kontrast einen Einfluss auf die Akquisition bei der visuellen PER-Konditionierung ausüben. Dazu wurden zwei Stimuli gewählt, Blau und Gelb, die sich in diesen drei Eigenschaften unterschieden, um jeweils eine Gruppe von Bienen zu konditionieren (Abb. 3.37).

Die Akquisitionsraten für Blau und Gelb unterschieden sich nicht, beide stiegen während des zehnmaligen Trainings signifikant an (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.8$ (trainiert auf Blau) bzw. $Z = 3.5$ (trainiert auf Gelb), $p < 0.05$).

Die trainierten Tiere wurden anschließend mit unbekannten Stimuli konfrontiert um das Diskriminierungs- bzw. Generalisierungs-Verhalten zu testen.

Mit Blau trainierte Tiere antworteten nicht oder kaum auf einen gelben und einen grünen Stimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.9$ und 2.8 , $p < 0.05$), die Antwortrate für Dunkelblau und Weiß unterschied sich aber nicht von der für den letzten Trainingstrial (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$ und 1.2 , n.s.). Der Vergleich der Antworten auf die Teststimuli untereinander zeigte, dass die Raten nicht signifikant unterschiedlich waren zwischen Gelb und Grün, zwischen Grün und Weiß sowie zwischen Weiß und Dunkelblau (McNemar χ^2 Test, Bonferroni korrigiert, $\chi^2 = 0.5$, 4.9 und 1.6 , n.s.) Tiere, die bei gelber Stimulation belohnt worden waren, antworteten wenig bei weißen und blauen Stimuli (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.6$ und 4.0 , $p < 0.05$), aber stark auf Dunkelgelb und Grün (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 1.3$ und 1.0 , n.s.). Die Antwortrate unterschied sich nicht zwischen blauem und weißem sowie zwischen grünem und dunkelgelbem Stimulus (McNemar χ^2 Test, Bonferroni korrigiert, $\chi^2 = 0$ und 0.25 , n.s.).

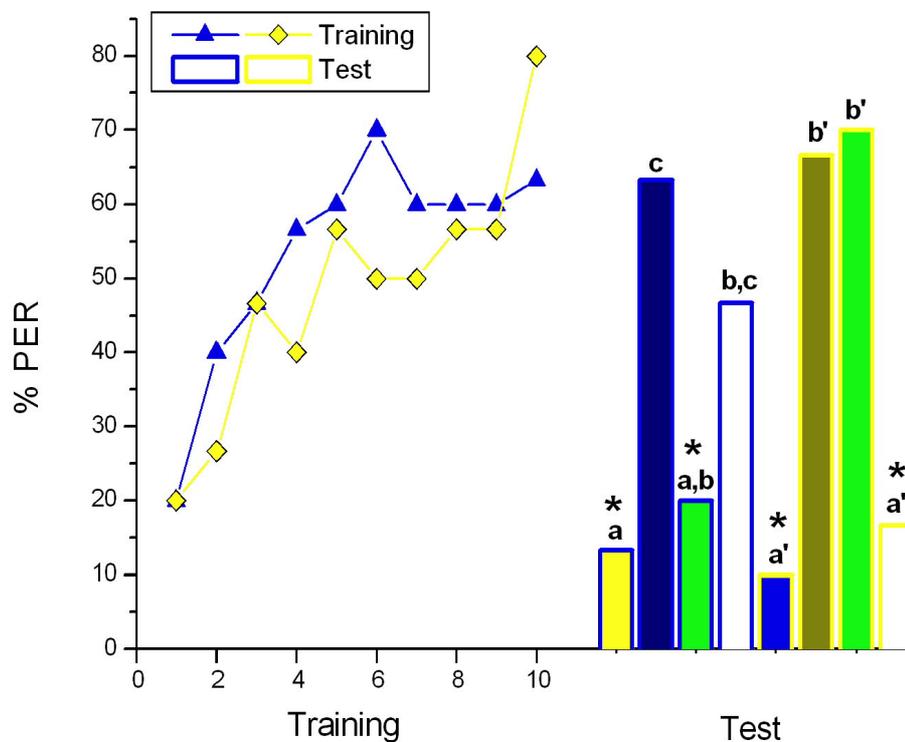


Abbildung 3.37: Absolute Konditionierung auf blauen (blaue Dreiecke, $N = 30$) oder gelben Stimulus (gelbe Rhomben, $N = 30$), zehn Stimulus-Belohnungs-Paarungen. Anschließend unbelohnte Tests mit Gelb, Dunkelblau, Grün, Weiß (auf

Blau trainierte Gruppe, Balken mit blauem Rahmen) bzw. Blau, Dunkelgelb, Grün, Weiß (auf Gelb trainierte Gruppe, Balken mit gelbem Rahmen). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$); Antwortraten mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (McNemar χ^2 Test).

Eine Untersuchung dieser Ergebnisse in Hinblick auf die chromatischen und achromatischen Eigenschaften der Stimuli zeigte ein konstantes Muster auf (Tab. 2.03). Der Farbabstand zwischen Gelb und Grün war kleiner als zwischen Gelb und Weiß oder Gelb und Blau; Weiß war Blau chromatisch ähnlicher als Gelb. Es bestand keine Korrelation zwischen der Intensität der Stimuli und der Wahrscheinlichkeit, auf einen Teststimulus zu antworten (Bienen antworteten auf Teststimuli, die sowohl heller als auch dunkler waren als die trainierten Stimuli).

3.5.2 Absolute Konditionierung gleichfarbiger, unterschiedlich heller Stimuli

Um zu untersuchen, ob die Intensität eines Stimulus seine Akquisition beeinflusst, wurden zwei Gruppen von Tieren auf gelbe Stimuli konditioniert, die sich in ihrer Helligkeit unterschieden. Der Verlauf der Akquisition für einen gelben Stimulus unterschied sich nicht von dem für einen dunkelgelben Stimulus, bis auf eine höhere Spontanrate für die hellere Farbe im ersten Trainingsdurchgang (Abb. 3.38). Beide Gruppen antworteten in den Tests nicht auf Blau (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.2$ (dunkelgelber Trainingsstimulus) und 2.8 (gelber Trainingstimulus), $p < 0.05$). Bei Test mit dem Trainingsstimulus der jeweils anderen Gruppe oder einem in der Intensität zwischen den beiden liegendem Mittelgelb waren die Antwortraten nicht von denen der letzten Trainingseinheiten unterscheidbar (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0.3$ (gelb) und 0 (mittelgelb) bei mit Dunkelgelb trainierten Bienen, $Z = 0.5$ (dunkelgelb) und 0 (mittelgelb) bei mit Gelb trainierten Bienen, n.s.).

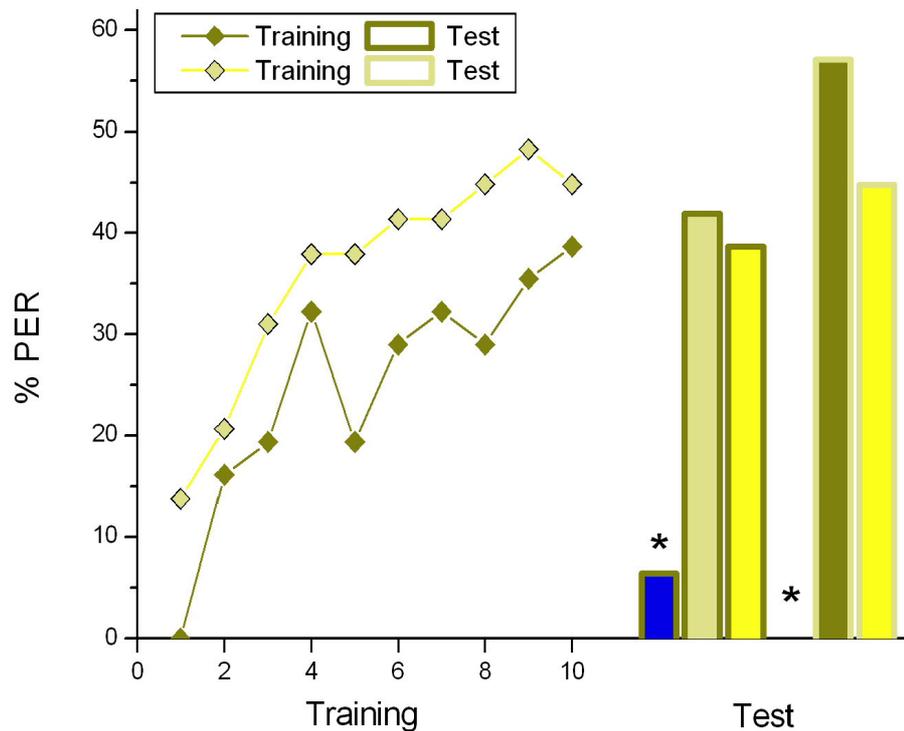


Abbildung 3.38: Absolute Konditionierung auf dunkelgelben (dunkle Rhomben, N = 31) **oder gelben Stimulus** (helle Rhomben, N = 29), zehn Stimulus-Belohnungs-Paarungen. Anschließend unbelohnte Tests mit Blau, Gelb und Mittelgelb (auf Dunkelgelb trainierte Gruppe, Balken mit dunklem Rahmen) bzw. Blau, Dunkelgelb und Mittelgelb (auf Gelb trainierte Gruppe, Balken mit hellem Rahmen). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$).

3.5.3 Differentielle Konditionierung gleichfarbiger, unterschiedlich heller Stimuli

Es wurde eine differentielle Konditionierung durchgeführt mit gelben Stimuli, die sich in ihrer Intensität unterschieden. Bienen wurden im Wechsel jeweils zehnmal mit einem belohnten gelben und einem unbelohnten dunkelgelben Stimulus konfrontiert, eine zweite Gruppe wurde auf die reziproke Kombination trainiert. In beiden Gruppen unterschieden sich die Antwortkurven für den CS+ nicht von denen für den CS-. Auf Dunkelgelb belohnte Tiere erreichten die gleiche PER-Rate wie auf Gelb trainierte Tiere, allerdings gab es einen Abfall in der Antwortrate für den CS+ während der letzten Trainingseinheit. Wie bei der absoluten Konditionierung dieser Stimuli (Abb. 3.38) antworteten die Tiere signifikant seltener auf einen blauen Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.4$ (gelber CS+) und 2.4 (dunkelgelber CS+, Vergleich zwischen 9. belohnter Trainingseinheit und Test), $p < 0.05$) aber genauso

stark auf Grün wie auf den letzten belohnten Trainingsstimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 1.0$ (gelber CS+) und 1.6 (dunkelgelber CS+), n.s.) (Abb. 3.39).

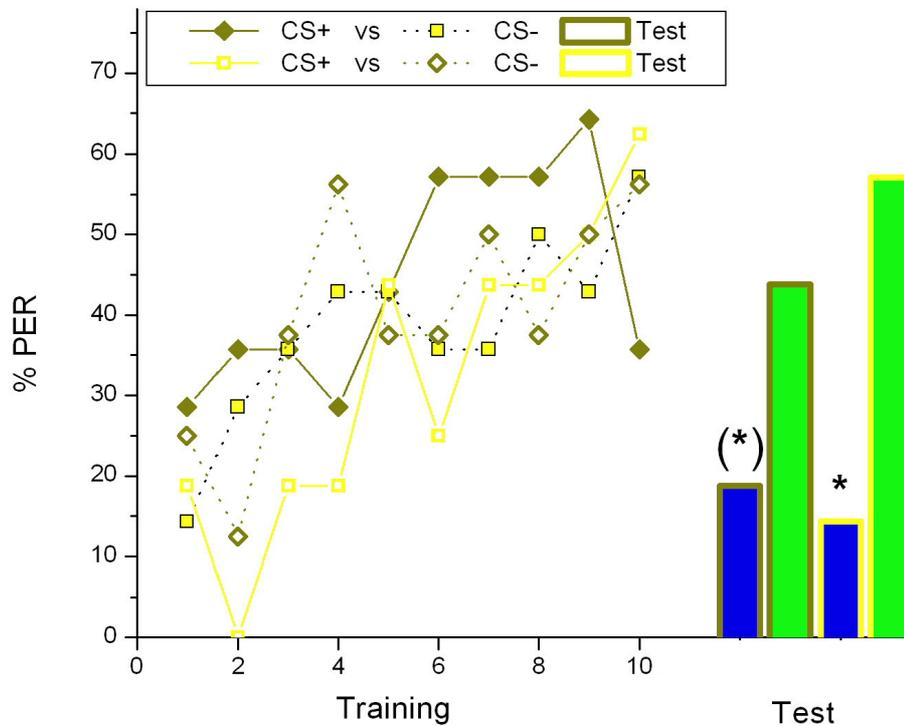


Abbildung 3.39: Differentielle Konditionierung auf gleichfarbige Stimuli unterschiedlicher Intensität. Gruppe I (volle Symbole): Dunkelgelber CS+ (dunkle Rhomben), gelber CS- (helle Quadrate), $N = 14$; Gruppe II (leere Symbole): Gelber CS+ (helle Quadrate), dunkelgelber CS- (dunkle Rhomben), $N = 16$. Jeweils zehn alternierende Präsentationen von CS+ und CS-. Anschließend unbelohnte Tests mit Blau und Grün (auf Dunkelgelb trainierte Gruppe: Balken mit dunklem Rahmen, auf Gelb trainierte Gruppe: Balken mit hellem Rahmen). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$), (*) = Unterschied ist signifikant, wenn man die Antwortrate der 9. CS+-Präsentation mit der Testantwort vergleicht.

3.5.4 Differentielle Konditionierung verschiedener Farben

Frei fliegende Bienen können gut zwischen Farben unterscheiden, die ähnlich unterschiedlich sind wie einige Trainings- und Teststimuli des ersten Experiments (Abschnitt 3.5.1 Absolute Konditionierung verschiedenfarbiger Stimuli). Um zu untersuchen, ob die hohe Antwortrate auf diese Teststimuli (Abb. 3.37) auf Generalisierung oder Nicht-Diskrimination zurückzuführen sind, wurden Tiere differentiel mit diesen Farben konditioniert.

Zunächst wurden zwei Gruppen parallel trainiert, die beide bei Präsentation eines gelben Stimulus belohnt wurden, eine Gruppe gegen einen blauen, die andere gegen einen grünen CS- (Abb. 3.40). Die CS+ und CS- Akquisitionskurven unterschieden sich nicht bei der Gruppe, die auf Grün nicht belohnt wurde (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0.91$, n.s.). Dagegen konnten die Tiere die Stimuli leicht diskriminieren, wenn Blau der CS- war (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.06$, $p < 0.05$). In den nachfolgenden unbelohnten Tests antworteten beide Gruppen stark auf Dunkelgelb (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$ (grüner CS-) und 1.6 (blauer CS-)). Die Gruppe, bei der Blau als CS- verwendet wurde, wurde außerdem mit Grün getestet (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$, n.s.), die andere Gruppe mit Blau (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.0$, $p < 0.05$) und Dunkelgrün (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.1$, $p < 0.05$).

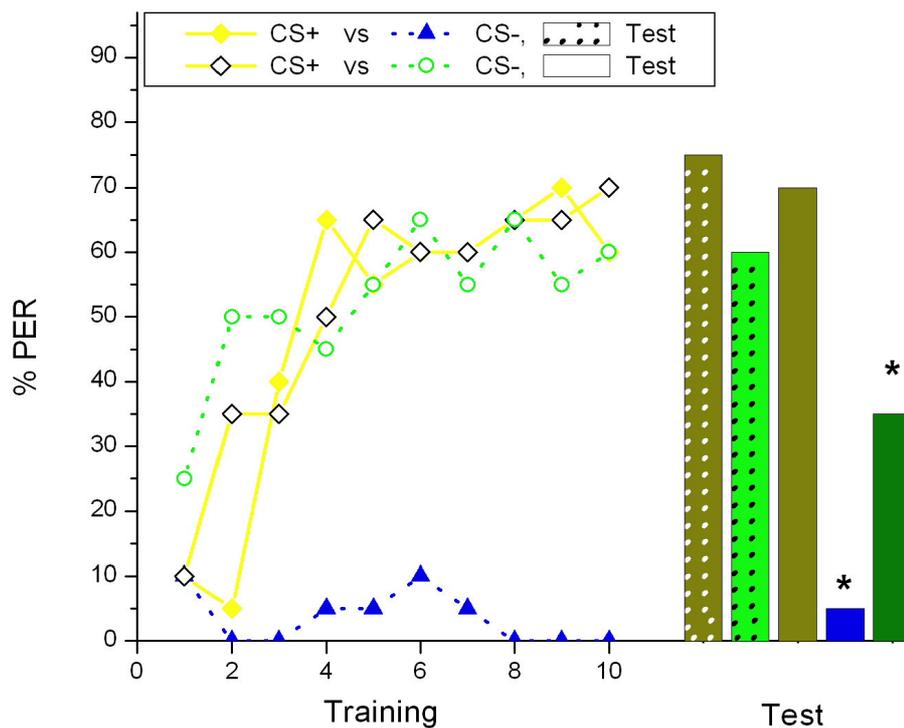


Abbildung 3.40: Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli I. Gruppe I (volle Symbole): Gelber CS+ (Rhomben) vs blauen CS- (Dreiecke), $N = 20$; Gruppe II (leere Symbole): Gelber CS+ vs grünen CS- (Kreise), $N = 20$. Jeweils zehn alternierende Präsentationen von CS+ und CS-. Anschließend unbelohnte Tests mit Dunkelgelb und Grün (Gruppe I: Balken mit Muster) bzw. Dunkelgelb, Blau und Dunkelgrün (Gruppe II: Balken ohne Muster). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$).

Reziprok zu diesem Experiment wurde eine Gruppe von Bienen bei blauer Stimulation, eine andere bei grüner Stimulation belohnt. Bei beiden Gruppen war Gelb der CS- (Abb. 3.41). Auch hier unterschieden sich die Akquisitionskurven von CS+ und CS- wenn die Tiere auf Blau trainiert wurden, nicht aber bei der Gruppe mit grünem CS+. In den nachfolgenden unbelohnten Tests antworteten die mit Blau trainierten Tiere verstärkt auf Dunkelblau (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$, n.s.) aber signifikant weniger auf Grün (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.6$, $p < 0.05$); die bei Grün belohnte Gruppe hatte eine hohe PER-Rate bei Tests mit Dunkelgelb und Dunkelgrün (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0.9$ bzw. 1.8 , n.s.) und antwortete nur schwach auf Blau (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.2$, $p < 0.05$).

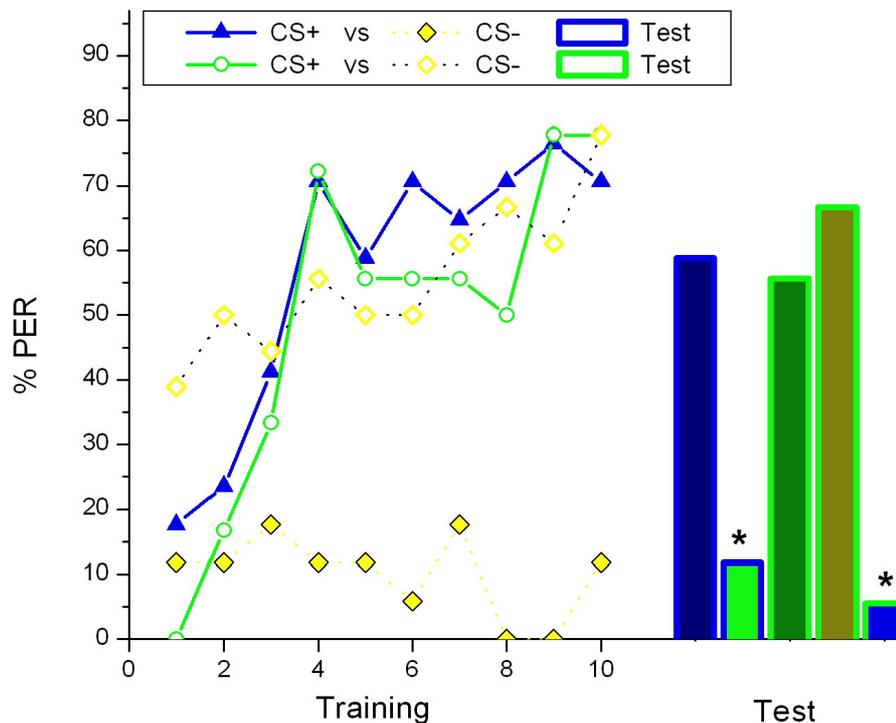


Abbildung 3.41: Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli II. Gruppe I (volle Symbole): Blauer CS+ (Dreiecke) vs gelbem CS- (Rhomben), $N = 17$; Gruppe II (leere Symbole): Grüner CS+ (Kreise) vs gelbem CS-, $N = 18$. Jeweils zehn alternierende Präsentationen von CS+ und CS-. Anschließend unbelohnte Tests mit Dunkelblau und Grün (Gruppe I: Balken mit blauem Rand) bzw. Dunkelgrün, Dunkelgelb und Blau (Gruppe II: Balken mit gelbem Rand). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$).

Die Ergebnisse der beiden zuletzt beschriebenen Experimente unterscheiden sich hinsichtlich der Antwortraten auf einen dunkelgrünen Teststimulus nach Training mit

gelbem und grünem Stimulus. War Gelb der belohnte Stimulus während des Trainings, so antworteten weniger Bienen auf den dunkelgrünen Teststimulus als auf den letzten CS+ (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.1$, $p = 0.04$). Bienen, die im Training bei grüner Stimulation belohnt worden waren, antworteten nicht signifikant weniger auf Dunkelgrün als auf den letzten grünen CS+ (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 1.8$, $p = 0.07$).

Eine differentielle Konditionierung mit Blau als CS+ und entweder Weiß oder Gelb als CS- führte zu CS+/CS- Akquisitionskurven die nach zwei Trainingseinheiten divergierten, wenn Gelb der CS- war, nach sechs bei weißem CS- (Abb. 3.42). In beiden Fällen war die Antwort auf den blauen Stimulus nach dem Training signifikant höher als vorher (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.4$ (weißer CS-) bzw. 3.2 (gelber CS-), $p < 0.05$), die Antwort auf den CS- jedoch nicht (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$ für beide Gruppen, n.s.). Beide Gruppen antworteten stark auf einen dunkelblauen Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0$ für beide Gruppen, n.s.) und signifikant weniger auf Gelb (Gruppe mit weißem CS-, Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 3.4$, $p < 0.05$) bzw. auf Weiß (Gruppe mit gelbem CS-, Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.4$, $p < 0.05$).

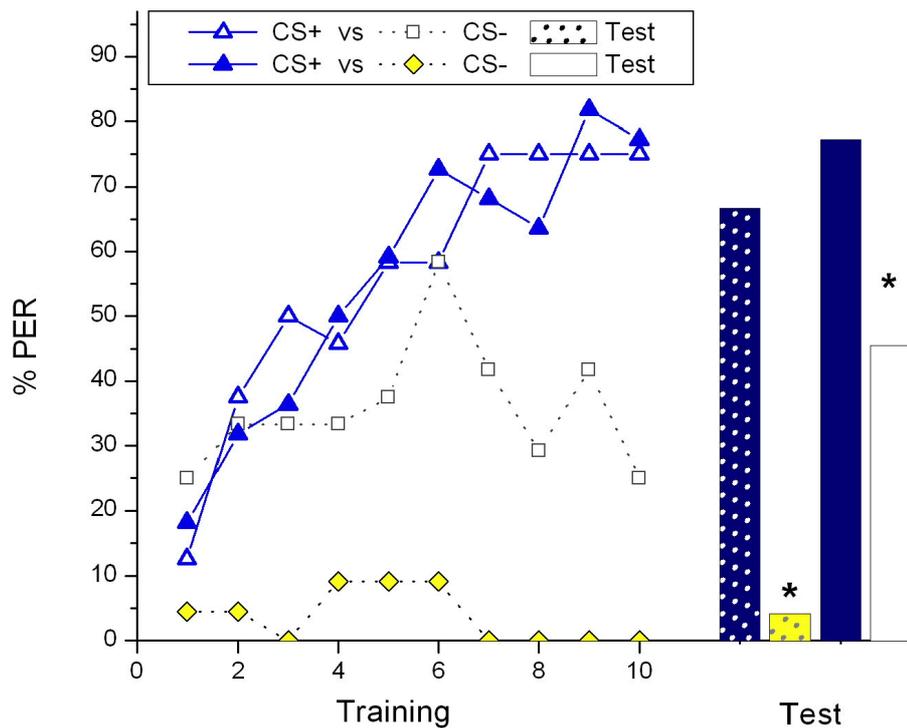


Abbildung 3.42: Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli III. Gruppe I (volle Symbole): Blauer CS+ (Dreiecke) vs weißem CS- (Quadrat), N = 24; Gruppe II (leere Symbole): Blauer CS+ vs gelbem CS- (Rhomben), N = 22. Jeweils zehn alternierende Präsentationen von CS+ und CS-. Anschließend unbelohnte Tests mit Dunkelblau und Gelb (Gruppe I: Balken mit Muster) bzw. Dunkelblau und Weiß (Gruppe II: Balken ohne Muster). * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Teststimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$).

3.5.5 Gedächtnis

Um zu untersuchen, ob konditionierte Bienen ein Gedächtnis für die belohnten Stimuli bilden und ob dieses abhängig von der Länge des Trainings ist, wurden zwei Gruppen von Bienen drei bzw. sieben mal bei Präsentation eines gelben Stimulus belohnt. Eine Stunde nach der letzten Trainingseinheit wurde derselbe Stimulus wieder gezeigt (Abb. 3.43). Die Antwortrate eine Stunde nach dem Training unterschied sich nicht von der während der letzten Trainingseinheit (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 0.8$ (3 Trainingseinheiten) bzw. 0.6 (7 Trainingseinheiten), n.s.).

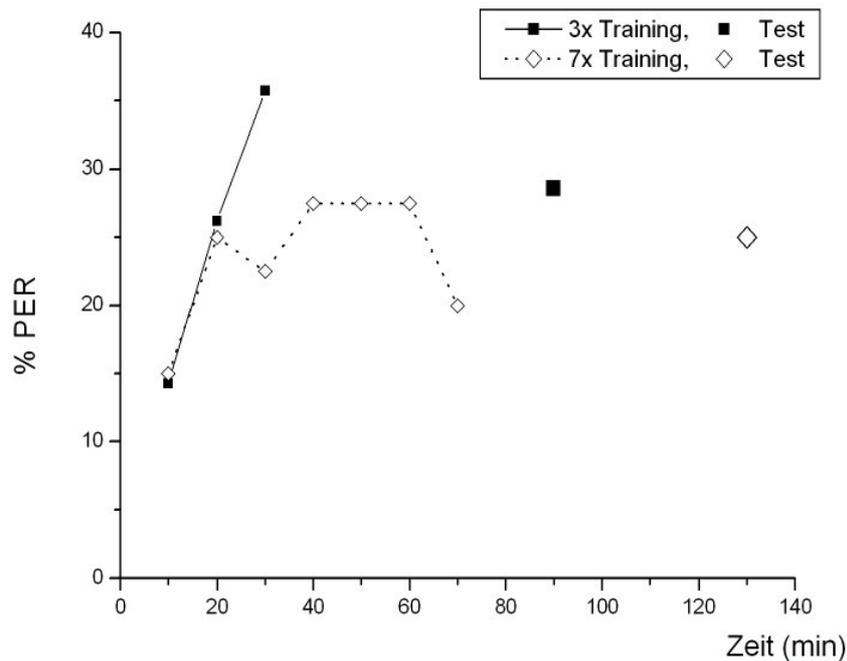


Abbildung 3.43: Gedächtnistest eine Stunde nach absoluter Konditionierung auf gelben Stimulus nach 3- (schwarze Quadrate) oder 7-maligem Training (weiße Rhomben).

3.5.6 Extinktion

Kuwabara (1957) berichtete, dass er nach der klassischen Konditionierung visueller Stimuli diese nicht extingieren konnte, die Antwortrate also trotz mehrmaliger unbelohnter Präsentation des vorher belohnten Stimulus nicht abnahm.

Ich konditionierte zwei Gruppen von Bienen drei- bzw. siebenmal mit einem gelben Stimulus. Derselbe Stimulus wurde im Anschluss mehrmals (neun- bzw. fünfmal) unbelohnt präsentiert (Abb. 3.44). Nach dreimaliger Konditionierung blieb die Antwortrate während neunmaliger unbelohnter Präsentation konstant, das heißt, es bestand keinen signifikanten Unterschied zwischen der letzten belohnten und den unbelohnten Präsentationen (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, alle n.s.). In der Gruppe, die siebenmal bei Präsentation des gelben Stimulus belohnt worden war, sank die Antwortrate zunächst auf einen Wert ab, der sich signifikant von der PER-Rate während der letzten Stimulus-Belohnungspaarung unterschied (3. Extinktionspräsentation, Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $Z = 2.52$, $p < 0.05$). Danach stieg die Antwortrate wieder an und war von der letzten belohnten Antwort nicht signifikant unterschiedlich (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, alle n.s.).

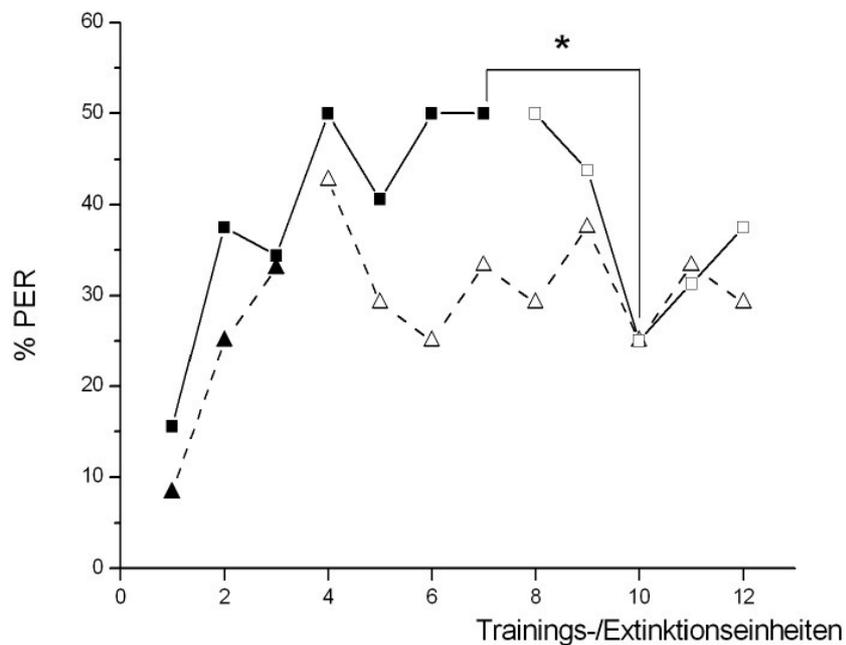


Abbildung 3.44: Extinktionsexperiment. Antwortraten während Belohnung (volle Symbole) und ohne Belohnung (leere Symbole). Eine Gruppe (Dreiecke; N = 24) erhielt drei CS-US und neun nur CS Präsentationen, die andere (Quadrate; N = 32) wurde siebenmal trainiert und fünfmal extinguiert. * = signifikanter Unterschied zwischen Antwortraten auf letzten Trainingsstimulus und Extinktionsstimulus (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0.05$).

3.5.7 Klassische Konditionierung visueller Stimuli - Zusammenfassung

Die klassische PER-Konditionierung fixierter Bienen mit farbigen Stimuli, die sich in ihren chromatischen und achromatischen Eigenschaften voneinander unterschieden, zeigte, dass die Bienen die Farbe des Stimulus lernten, nicht aber den L-Rezeptor-Kontrast oder die allgemeine Intensität. Die Generalisierung zwischen Stimuli war groß, konnte mit dem Farbabstand korreliert werden und wurde durch die Art des Trainings (absolut oder differentiell) beeinflusst. Eine zehnmahlige Assoziation von Stimulus und Belohnung führte zu der Bildung eines Gedächtnisses, das mindestens eine Stunde anhält.

4 DISKUSSION

4.1 Die Wirkung von RNA Interferenz auf LW-Op sin mRNA- und Proteinmenge

In dieser Arbeit zeige ich, dass es möglich ist, die Expression des LW-Opsins der Honigbiene mit RNA Interferenz zu manipulieren. Die Evaluierung der Hemmung auf mRNA- und Proteinebene offenbart, dass der Erfolg der Inhibition abhängig ist von der Menge der injizierten dsRNA sowie dem zirkadianen Status des visuellen Systems. Die Hemmung des Opsins ist vorübergehend, lokal begrenzt und die Wirkung stärker auf mRNA- als auf Protein-Ebene.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Translation des LW-Opsins zumindest partiell mit dem zirkadianen Rhythmus der Transkription korreliert werden kann und dass der zirkadianen Rhythmus einen von mehreren Faktoren darstellt, der den Gehalt an LW-Op sin in einer Zelle reguliert. Der Grund für die transiente Wirkung der RNAi könnte eine hohe Turnoverrate im visuellen System sein.

4.1.1 Verwendung eines für die Hummel entwickelten Antikörpers zur Detektion des LW-Op sin Proteins in der Honigbiene

Mit dem für das LW-Op sin einer Hummelart entwickelten Antikörper wurde in Western Blots reproduzierbar zwei Proteinbanden bei ~40 kDa und zwei Banden bei ~80 kDa detektiert. Die starke Spezifität und Homologie zwischen der Sequenz des LW-Opsins der Honigbiene und der des zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptids sowie die Größe der detektierten Proteine sprechen dafür, dass eine der Banden bei ca. 40 kDa das LW-Op sin der Honigbiene darstellt.

Bei der zweiten Bande bei ~40 kDa kann es sich um die glykolysierte Form des Proteins handeln. Für *Drosophila* wurde gezeigt, dass N-gekoppelte Glykolisierung für die korrekte Faltung und den Transport von Opsinen erforderlich ist (Ozaki et al. 1993, Colley et al. 1995, Katanosaka et al. 2001). In der Sequenz des LW-Opsins der Honigbiene gibt es zwei potentielle Glykolysierungs-Stellen (Chang et al. 1996).

In Western Blots zur Detektion von Opsinen werden häufig Banden detektiert, die der doppelten Molekülmasse des Opsins entsprechen, also in diesem Fall ca. 80 kDa. Hierbei handelt es sich um Dimere des Opsins (*Drosophila*: Kurada et al. 1998, Kiefer et al. 2002; Maus: Wu et al 1998)). Auch diese können in einer glykolysierten

und einer nicht glykolysierten Form vorliegen (Colley et al. 1995). Es konnte bisher jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Dimerisierung durch die Behandlung der Proben für die SDS-PAGE begünstigt wird (Bentrop et al. 1997) oder die Form darstellt, in der neu synthetisiertes, unreifes Opsin im Endoplasmatischen Retikulum vorliegt (Kurada et al. 1998, Kiefer et al. 2002). Die meisten Autoren bezogen diese Dimere nicht in ihre Analysen ein (zum Beispiel Katanosaka et al. 1998, Ahmad et al. 2006).

In meinen Versuchen waren die Banden bei ~80 kDa wesentlich schwächer ausgeprägt als jene bei ~40 kDa. Die Menge der Opsin-Dimere schwankte auch mit der Tageszeit, allerdings weniger stark und eindeutig als die Menge der in monomerischer Form vorliegenden Proteine; die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die Quantifizierung der ~80 kDa-Banden nach zwölfstündiger Inkubation von dsRNA erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die Messung der ~40 kDa-Banden, aber auch hier war die Reduktion in der Gruppe, die morgens injiziert wurde, nicht signifikant. Der Vergleich verschiedener Western Blots zeigte, dass die Intensität der ~80 kDa-Banden mit der der ~40 kDa-Banden korreliert war, dass es aber durch die sehr schwache Anfärbung der Dimer-Banden wahrscheinlich zu Messungenauigkeiten aufgrund eines ungünstigen Signal-Rauschen-Verhältnis (detektierte Bande zu Hintergrund) kam. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse und Schlussfolgerungen stützen sich daher auf die Analyse und Quantifizierung der monomerischen Form des Opsins.

4.1.2 Einfluss von Licht und Tageszeit auf LW-Opsin Menge

Verhalten und physiologische Prozesse in der Honigbiene unterliegen tageszeitlichen Rhythmen (siehe Moore 2001). Zirkadiane Rhythmen sind per Definition angeborene Oszillationen zwischen Tag- und Nachtzuständen interner Prozesse, die unter konstanter Dunkelheit (DD) fortbestehen, jedoch durch externe Faktoren wie Licht und Temperatur verschoben oder gedämpft werden können (siehe Fleissner & Fleissner 1988). Sie erlauben es Organismen, ihre Aktivitätsmuster den Umweltbedingungen anzupassen.

Bei der Honigbiene entwickeln sich diese unter natürlichen Gegebenheiten während der Ontogenese und können mit den Aufgaben der Biene korreliert werden. Ammen,

die sich tageszeitunabhängig um die Brut und die Königin kümmern, sind arhythmisch im Gegensatz zu Sammlerinnen, die nur während des Tages ausfliegen (Crailsheim et al. 1996, Toma et al. 2000). Licht sowie Temperatur beeinflussen die Periode der Oszillation (Beier 1968, Moore & Rankin 1993; Fuchikawa & Shimizu 2007). Diese exogenen Zeitgeber „stellen“ die endogene Uhr und ihre genetischen Komponenten, Uhrgene wie *period* (*per*), *timeout* (*tim2*), *cycle* (*cyc*) oder *cryptochrome* (*cry-m*), die sich wahrscheinlich ihrerseits über Feedback-Schleifen gegenseitig regulieren (Sehgal 1995, Rubin et al. 2006).

Bei vielen Tierarten unterliegt die Sensitivität des visuellen Systems einem zirkadianem Rhythmus (Insekten: Horridge et al. 1981, Fleissner 1982, Tomioka & Chiba 1982, Chen et al. 1999, Giebultowicz 2000; Crustaceen: Bryceson 1986, Arikawa et al. 1987; Vertebraten: Shaw et al. 1993, Lu et al. 1995, Cahill & Besharse 1995). Je nach Tierart und ihrer Lebensweise werden diese Empfindlichkeitsänderungen bedingt durch strukturelle Änderungen im visuellen System, wie Größenänderung des Rhabdoms, des zyklischen Ab- und Aufbaus von photorezeptiven Membranen, der Wanderung von Abschirm-Pigmenten, der Größenänderung von Zellen in den optischen Loben, oder der dortigen Anzahl von Synapsen (Horridge et al. 1981, Menzi 1987, Meinertzhagen & Pyza 1999, Sakura et al. 2003, Chang & Lee 2001, Pyza & Gorska-Andrzejak 2008, Arikawa et al. 1987, Bryceson 1986, Hafner & Tokarski 1988), und/oder der zirkadianen Expression von Neuromodulatoren und -transmittern wie PDF, Serotonin, Oktopamin und anderen (Cuttle et al. 1995, Gaus et al. 1997, Chen et al. 1999, Meinertzhagen & Pyza 1999, Saifullah & Tomioka 2002). Diese Prozesse unterliegen der efferenten Kontrolle eines endogenen Schrittmachers (Helfrich-Förster 2004).

Für die Honigbiene wurde unter anderem gezeigt, dass die Amplitude des Elektroretinograms während des Tages rhythmisch um das vier- bis zwanzigfache schwankt (Milde 1985) und dass die Empfindlichkeit und spontane Aktivität von optomotorischen visuellen Interneuronen in der Lobula einem zirkadianen Rhythmus unterliegen (Kaiser 1983). Welche physiologischen Prozesse diese Oszillationen im visuellen System der Honigbiene bedingen ist noch unbekannt. Man weiß, dass die Menge des Amins Dopamin, einem putativen Modulator der rhythmischen Aktivität,

sowie die Expression des Uhrgens *per* in den optischen Loben oszilliert (Carrington et al. 2007, Sasagawa et al 2003).

Ein möglicher Mechanismus zur Steuerung der Empfindlichkeitsänderungen des visuellen Systems liegt in der Regulierung der Menge an verfügbaren photorezeptiven Molekülen. Eine tageszeitlich Schwankung der Opsin mRNA, die durch die endogene Uhr gesteuert wird, aber durch Licht getriggert werden kann, wurde für mehrere Tierarten gezeigt (Korenbrodt & Fernald 1989 (Kröte, Fisch), von Schantz et al. 1999 (Maus), Halstenberg et al. 2005 (Fisch), Claridge-Chang et al. 2004 (*Drosophila*)). Die Periode bzw. der Zeitpunkt des Maximums können dabei zwischen Opsintypen des selben Organismus unterschiedlich sein (Halstenberg et al. 2005) bzw. sind bei einigen Opsintypen zirkadiane Rhythmen vorhanden, bei anderen nicht (Pierce et al. 1993). Bei *Drosophila* liegt ein Unterschied von vier Stunden zwischen den Maxima für Rh4 und Rh5, welche für das Farbsehen verwendet werden (Claridge-Chang et al. 2004), aber sowohl mRNA- als auch Proteinmenge des Opsins Rh1 bleiben konstant. Dieses wird in den sechs äußeren Photorezeptoren exprimiert, welche die achromatische, u. a. optomotorische, Informationen kodieren (Hartman et al. 2001, Yamaguchi et al. 2008).

Sasagawa et al. (2003) konnten für die Honigbiene zeigen, dass die Expression von LW-Opsin unter konstanten Licht-Dunkel (L/D) Konditionen mit zirkadianem Rhythmus oszilliert, mit einem Maximum zwei Stunden nach Beginn der Photoperiode und einer nachfolgenden Abnahme um ca. 90%. Der Rhythmus bleibt bei konstanter Dunkelheit bestehen und passt sich einem um drei Stunden verschobenem Lichtregime an.

In der vorliegenden Arbeit wurden die experimentellen Bedingungen der Studie von Sasagawa et al. (2003) bei der Untersuchung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen Tageszeit und LW-Opsin Proteinmenge so gut wie möglich reproduziert, indem gleichaltrige adulte Tiere drei Tage lang unter 12h/12h L/D-Rhythmus gehalten wurden. Die daraufhin im Western Blot gemessene LW-Opsin Proteinmenge war acht Stunden nach Beginn der Lichtperiode (bzw. vier Stunden vor dem Beginn der Dunkelperiode) am höchsten und fiel daraufhin schnell ab, nach acht Stunden um fast 50%. Bis zum Beginn der nächsten Lichtperiode blieb sie ungefähr auf diesem

Niveau. Vergleicht man die tageszeitlichen Mengenänderungen von LW-Opisin mRNA (siehe Abb. 3.16) und Protein, liegt aufgrund der Ähnlichkeit der zeitversetzten Verlaufskurven nahe, dass eine Korrelation zwischen den beiden Expressionsmustern besteht. Es ist anzunehmen, dass die Zeitspanne zwischen den Maxima die Turnover-Rate des Opsins widerspiegelt.

Allerdings sollte die Zeitspanne von sechs Stunde zwischen den Maxima nicht als absoluter Wert missverstanden werden, da trotz ähnlicher Behandlung der Versuchstiere in beiden Studien viele unbekannte Faktoren die zirkadiane Rhythmik des Opsins beeinflussen könnten, zum Beispiel die Jahreszeit und damit verbunden die Langzeitadaptation an eine jahreszeitspezifische Photoperiode und Temperatur.

Um diese Zeitspanne besser zu charakterisieren, wären Studien notwendig, die gleichzeitig Opsin mRNA- und Proteinmenge messen. Doch selbst dann würde diese Zeitspanne die Mechanismen der Turnover-Rate nur unzureichend erklären können. Bisher ist für die meisten Gene der quantitative und temporale Zusammenhang zwischen mRNA und Protein unbekannt. In einigen Fällen sind mRNA Transkriptionsraten und die Syntheseraten für das korrespondierende Protein voneinander unabhängig (siehe Shu & Hong-Hui 2004). Posttranskriptionale Mechanismen regulieren mRNA-Translation und –Degradation in Abhängigkeit von Gewebetyp, Entwicklungsstatus und zirkadianer Rhythmik (Gebauer & Hentze 2004, Shyu et al. 2008, Halbeisen et al. 2008).

Der Unterschied zwischen maximaler und minimaler Proteinmenge innerhalb von 24 Stunden betrug weniger als 50%, war also wesentlich kleiner als der Unterschied, den Sasagawa et al. (2003) für die LW-Opisin mRNA beschrieben (über 90%, siehe Abb. 3.16). Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass bei Insekten „benutztes“, durch Beleuchtung in nicht aktivierbares Metarhodopsin umgewandeltes Rhodopsin durch Beleuchtung mit blauem Licht wieder regeneriert werden kann. Dieses Recycling durch Photoregeneration ermöglicht eine kontinuierliche Antwort auf Licht. Durch Beleuchtung wird aber auch die Erneuerung der photorezeptiven Rhabdomer-Membran intensitätsabhängig stimuliert und somit auch der Bedarf an neuem Opsin (Schwemer 1989). Bei der Schmeißfliege (*Calliphora erythrocephala*)

wird unter (blauer) Beleuchtung innerhalb von 24 h 20-30% der Opsine durch neu synthetisierte Moleküle ersetzt (Paulsen & Schwemer 1983). Die Turnoverrate von Opsin in Mosquito (*Aedes aegypti*) wird durch Lichtadaptation erhöht (Stein et al. 1979). Im Dunkeln zerfällt das visuelle Pigment - Rhodopsin sehr langsam, Meta-rhodopsin innerhalb von Stunden. Das dabei freigesetzte Chromophor kann im Hellen mit Hilfe eines Retinal bindenden Proteins (RBP) photoisomerisiert werden (Schwemer et al. 1984 (Schmeißfliege), Smith & Goldsmith 1991 (Honigbiene)). Das dabei entstehende 11-cis Retinal regt die Opsin Biosynthese an (Paulsen und Schwemer 1983).

Wie schnell neu synthetisiertes Opsin als Teil des Rhodopsins in funktionelle photorezeptive Membran eingebaut werden kann, ist nicht genau bekannt. Die Injektion von radioaktivem Leucin in die Retina der Honigbiene zeigte eine zytoplasmatische Inkorporation in der ersten Messung nach 1h, erste Zeichen in Mikrovilli nach zwei Stunden, maximale Radioaktivität war nach 48h erreicht (Perrelet 1972). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, dass es sich bei den markierten Proteinen tatsächlich um Opsin handelte.

Der Bedarf an neuem Opsin sowie seine Synthese sind also (auch) abhängig von Dauer und Intensität der umgebenden Beleuchtung (Schwemer 1984, Sasagawa et al. 2003) und die Gesamt-Opsinmenge wird reguliert durch Synthese (mRNA Translation) und Abbau. Dass in meinen Experimenten die Unterschiede in der Proteinmenge innerhalb von 24 Stunden kleiner sind als die in der mRNA-Menge bedeutet wahrscheinlich, dass nicht die gesamte vorhandene mRNA translatiert wurde. Der große Anstieg in der Opsin mRNA-Menge zu Beginn des Tages bzw. der Lichtperiode spiegelt möglicherweise die Schaffung eines Reservoirs wieder, die den potentiellen Maximal-Bedarf an Opsin Protein abdecken kann. Im Verlaufe des Tages wird die mRNA entweder translatiert oder degradiert.

4.1.3 Limitierende Faktoren der Hemmung durch RNA Interferenz

Es stellte sich heraus, dass eine ausreichende Menge an dsRNA injiziert werden musste, um eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge zu erreichen. Die Mindestmenge an dsRNA für eine effektive Hemmung lag dabei zwischen 2.5 µg und

5 µg. Dass die Inhibition von Genen und ihren Produkten durch RNAi dosis-abhängig sein kann, stimmt mit den Ergebnissen vieler RNAi Experimente in verschiedenen Organismen, Gen- und Zelltypen überein (zum Beispiel Arakane et al. 2005, Araujo et al. 2006, Seo et al. 2003, Kobayashi et al. 2003).

Außerdem war das Zeitfenster der Inhibition begrenzt, eine Reduktion der mRNA konnte nach acht, aber nicht mehr nach 32 Stunden nach Injektion nachgewiesen werden, die LW-Opsin Proteinmenge war nach 12 Stunden reduziert, nach 24 Stunden nicht. Ein Vergleich mit anderen RNAi Studien zeigt, dass die Dauer der Inhibition durch RNAi von dem behandelten Organismus, der Art der Zielzellen, der Methode zur Einbringung der dsRNA in die Zellen sowie dem Gen, welches stumm-geschaltet wird, abhängig ist (zum Beispiel Dong & Friedrich 2005, Turner et al. 2006, McManus et al. 2002, Campbell et al. 2008). In Pflanzen, Pilzen und bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sorgt die RNA abhängige RNA Polymerase (RdRP) für eine anhaltende Vermehrung der dsRNA, wahrscheinlich durch eine RNA Synthese, bei der die siRNA als Muster genutzt werden (Cerutti & Casas-Mollano 2006, Sijen et al. 2001). Eine für die RdRP kodierende Gensequenz wurde bei Insekten und Vertebraten nicht nachgewiesen, als Substrat für die Inhibition kann also nur die eingebrachte dsRNA dienen (eine dauerhafte Hemmung durch RNAi in diesen Organismen kann zum Beispiel durch die transgene Expression von shRNA durch Plasmide oder Vektoren erreicht werden (Brummelkamp et al. 2002, siehe Kim & Rossi 2007, Grimm & Kay 2007)). Es wird angenommen, dass der RNA- (und Protein-) Turnover die Dauer des Effekt von RNAi bestimmen (Peng et al. 2002, Huppi et al. 2005). Insbesondere bei Organismen, die nicht über die RdRP verfügen, verdünnt die Neusynthese von mRNA den Hemmungseffekt. Das Zeitfenster, in dem die Hemmung eines Genes mit hoher Turnoverrate detektiert werden kann ist deshalb sehr eng und diese kann den Effekt von RNAi maskieren.

Der hier detektierte transiente Effekt der Hemmung korrespondiert somit gut mit der von Sasagawa et al. (2003) beschriebenen täglichen Erneuerung der LW Opsin mRNA. Die im vorherigen Absatz (4.1.2) diskutierte Zeitspanne zwischen tageszeitlichem LW Opsin mRNA- und Protein-Maximum spricht für eine rasche Umsetzung von mRNA in Protein, die in der nachweisbaren Hemmung des Proteins be-

reits zwölf Stunden nach der Injektion von doppelsträngiger RNA widergespiegelt wird.

Der Vergleich der LW-Opsin mRNA-Menge in injizierten optischen Loben und den nicht injizierten optischen Loben der selben Tiere deutet darauf hin, dass die Wirkung der RNAi auf die injizierte Retina begrenzt war. Die Basalmembran, die die Retina vom Gehirn trennt, stellt eine Art Blut-Hirn-Schranke dar, die für einige Substanzen impermeabel ist (Shaw & Varney 1999) und könnte der Grund für eine lokale Beschränkung der Inhibition sein. Das kann von Vorteil für die Untersuchung des visuellen Systems der Honigbiene sein, da die Herunterregulierung von mRNA und Protein in einer Retina durch den Vergleich mit der nicht injizierten Retina des selben Tieres quantifiziert werden kann. Somit können potentiell beeinflussende Faktoren wie unterschiedliches Alter oder unterschiedlicher Adaptationsstatus an die Lichtverhältnisse, die den Vergleich zwischen Tieren verfälschen können, ausgeschlossen werden. Andererseits kann es die Durchführung von Verhaltensversuchen erschweren, wenn für die Manipulation des visuellen Systems beide Retinas injiziert werden müssen.

4.1.4 Einfluss von Licht und Tageszeit auf die Wirkung der RNA Interferenz auf die LW-Opsin Menge

Erstaunlicherweise war der Effekt der Injektion von dsRNA auf die Proteinmenge abhängig von der Tageszeit der Injektion (oder der Präparation). Eine Injektion am Morgen (Beginn der Photoperiode) führte zwölf Stunden später zu einer statistisch signifikanten Reduktion um ca. 25%, die Injektion am Abend (Beginn der Dunkelperiode) zu einer relativ zu der Kontrollgruppe (statistisch nicht signifikant) erhöhten Proteinmenge. Die beiden Zeitpunkte unterschieden sich in zwei Faktoren: der vorangegangene Lichtkondition (beleuchtet/unbeleuchtet), also auch des Adaptationsstatus des Auges, sowie der Phase im zirkadianen Rhythmus.

Die LW-Opsin mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Injektion bzw. zum Zeitpunkt, an dem das RNAi-System in den Zellen aktiviert wird, kann eine Rolle bei diesem Phänomen spielen. Geht man davon aus, dass bei den hier verwendeten Versuchstieren die Menge der mRNA, ähnlich wie in den Versuchen von Sasagawa

et al. (2003), am frühen Morgen am größten war, dann war die absolute mRNA Menge, die morgens durch RNAi zerstört werden konnte, größer als abends. Intuitiv ist also anzunehmen, dass bei einer morgendlichen Injektion auch der Effekt auf die folgende Translation größer sein sollte. Außerdem wird siRNA schnell abgebaut, wenn die komplementäre Ziel-mRNA nicht exprimiert wird (Plasterk 2002, Song et al. 2003), es wäre also denkbar, dass es eine Korrelation zwischen Stabilität (und somit Effizienz) der entstandenen siRNA und Menge der vorhandenen Ziel-mRNA gibt. Auch dann wäre eine Injektion am frühen Morgen also vorzuziehen, um eine effiziente Inhibierung zu ermöglichen.

4.1.5 Zusammenhang zwischen LW-Opisin Menge und Empfindlichkeit der Photorezeptoren

Im Western Blot wird die Gesamtmenge des LW-Opsins erfasst, unabhängig davon, ob es sich um neu synthetisiertes Protein im Zytosol handelt oder ob das Opisin mit dem Retinal verbunden als aktivierbares visuelles Pigment in den Mikrovilli vorliegt (der Chromophor löst sich durch die SDS-Behandlung vom Protein (Hagins et al. 1973)). Eine bessere Auftrennung der detektierten Doppelbanden hätte Aufschluss darüber geben können, in welchem quantitativen Verhältnis sich unreifes (glykolysiertes) und reifes (unglykolysiertes) Opisin zueinander befanden, vorausgesetzt, die Reifungs- und Transportmechanismen sind ähnlich wie für *Drosophila* beschrieben (Ozaki et al. 1993, Colley et al. 1995, Bentrop et al. 1997).

Eine Reduktion der gesamten LW-Opisin Proteinmenge nach zwölf Stunden muss also nicht bedeuten, dass diese zu diesem Zeitpunkt auch physiologisch relevant ist. Es könnte sein, dass das zytosolische Reservoir an (unreifem) Opisin durch RNAi signifikant reduziert ist, die Menge an aktivierbarem Rhodopsin in den photorezeptiven Membranen aber nicht von der von Kontrolltieren unterscheidbar ist. Eine Reduktion des reifen, im visuellen Pigment gebundenen Opsins wiederum könnte maskiert werden durch eine nach der Inhibition kompensatorisch erhöhte Transkription und Translation, und somit verstärktes Aufkommen an unreifem Opisin. Solch ein kompensatorischer Effekt, bei dem durch die Abnahme des Genprodukts ein metabolischer Mechanismus aktiviert wird, um das Transkriptionslevel wieder herzustellen, wurde von Fire (1999) vorgeschlagen. Für die Honigbiene wies Franz

(2006) vier Tage nach der Injektion von für den Tyraminrezeptor spezifischer dsRNA (dsAmTyr) eine erhöhte mRNA-Menge für diesen Rezeptor nach. Die zum gleichen Zeitpunkt gemessene gustatorische Empfindlichkeit dsAmTyr-injizierter Tiere war aber relativ zu Kontrolltieren reduziert. Als Erklärung für diese Diskrepanz schlug Franz vor, dass eine reduzierte AmTyr-Proteinmenge gleichzeitig für das Anheben der gustatorischen Schwelle und für die Initiierung eines Kompensationsmechanismus und somit verstärkten Transkription von AmTyr verantwortlich sein könnte. In der hier vorliegenden Arbeit kam es weder bei der mRNA noch bei dem Protein zu einer signifikanten Erhöhung der gemessenen Menge; eine Verdichtung der Messzeitpunkte könnte diese unter Umständen aufdecken, ein Trend ist in der Erhöhung der Proteinmenge zwölf Stunden nach der abendlichen Injektion von dsLWOP zu sehen.

4.2 Die Wirkung von RNA Interferenz auf die physiologischen Eigenschaften der Retina

Eine Reduktion von LW-Opsin sollte sich auf die kodierenden Eigenschaften der Bienenretina auswirken, da es für ein breites Spektrum empfindlich ist (Peitsch et al. 1992) und in sechs von neun Photorezeptoren im Ommatidium exprimiert wird (Wakakuwa et al. 2004). Daher wurden Elektretinogramme (ERG) bei dsLWOP- und Kontroll-injizierten Tieren gemessen.

Die Analyse der ERGs 12 und 24 Stunden nach Injektion von dsLWOP offenbarte keine Reduktion der Reizantwort auf grünes Licht relativ zur Reizantwort bei einer Stimulation mit einer UV LED. Die drei Hauptkomponenten On-, Off- und sustained-Antwort, haben voneinander unabhängige Intensitäts-Antwort-Funktionen (Kennlinien) und spektrale Empfindlichkeiten. Ihre Relation zueinander, also die Form des ERGs, veränderte sich zwischen den Messzeitpunkten. Diese Veränderung wurde durch die Wirkung von RNAi moduliert.

Es ist anzunehmen, dass die Komponenten des ERGs der Honigbiene wie in anderen Tierarten unterschiedlichen zellulären Ursprungs sind und dass die Form einem zirkadianen Rhythmus unterliegt. Die fehlende Wirkung der RNAi auf die Amplitude des ERGs spricht für Mechanismen, die die Reduktion von Opsin kompensieren (zum Beispiel Pigmentwanderungen). Es ist auch denkbar, dass unter natürlichen Bedingungen die vorhandene Opsinmenge den Bedarf bei weitem über-

steigt und nur eine starke Reduktion die physiologischen Eigenschaften des visuellen Systems beeinflusst.

4.2.1 Empfindlichkeit der Analysemethode für Änderungen in der Rezeptorantwort

Eine morgendliche Injektion von dsLWOP führte 12 Stunden später zu einer Reduktion des Proteins um ca. 25%. Die Messung des ERGs 12 Stunden nach einer morgendlichen Injektion offenbarte keine Abnahme der Reizantwort der Retina bei grüner Beleuchtung im Vergleich zur Stimulation mit UV und Blau.

Da in dieser Arbeit die Relation zwischen den Reizantworten auf die spektral unterschiedlichen LED-Beleuchtungen verwendet wurde, um eine potentielle Amplitudenänderung bei grüner Beleuchtung zu detektieren, könnte es sein, dass ein Effekt, der durch die Injektion von dsLWOP erzielt wurde, maskiert wurde. Dies wäre der Fall, wenn die ERG-Amplitude bei der Beleuchtung durch alle drei Stimuli reduziert war und sich daher die Relation zwischen den Reizantworten nicht oder nur wenig änderte. Da die Beeinträchtigung der Expression der Opsine der UV- und Blausensitiven Photorezeptoren durch die injizierte dsRNA aufgrund der Spezifität der Sequenz ausgeschlossen werden kann, müsste eine solche allgemeine Abnahme bedingt sein durch einen hohen Anteil der L-Rezeptoren am ERG. Sie sind für ein relativ breites Spektrum empfindlich (Peitsch et al. 1992; siehe Abb. 2.03) und werden daher auch von der UV und der blauen LED erregt. Außerdem sind sie in der Retina zahlenmäßig besonders stark vertreten (sechs von neun Photorezeptoren im Ommatidium exprimieren das LW-Opisin (Wakakuwa et al. 2004)). Eine Empfindlichkeitsreduktion der L-Rezeptoren beeinflusst also auch das Summenpotential bei kurz- und mittelwelliger Beleuchtung.

Wie stark die Reduktion der Antwort ausfallen kann, kann man auf der Basis der gemessenen Reizantworten und bekannter Parameter (spektrale Strahlungsintensität der LEDs und Empfindlichkeiten der Photorezeptortypen) simulieren. Wenn man die Regressionsgerade aus den Daten extrahiert, die man durch die Stimulation von Kontrolltieren mit allen drei LEDs erhält (siehe Abb. 3.25), kann man die Antwort auf die verschiedenen Reize unter der Annahme modellieren, der Photonenstrom der grünen Photorezeptoren betrüge in dsLWOP-injizierten Tieren nur einen Bruchteil

des Photonenstroms unter normalen Umständen (Abb. 4.01). Wenn man eine Reduktion von 10% annimmt, sieht man, dass ein Unterschied in der relativen Reizantwort bei grüner Beleuchtung aufgrund der Normalisierung wohl nicht detektierbar wäre. Bei einer simulierten Reduktion des Photonenstroms in den LW-Rezeptoren um 50% ist der Unterschied bei grüner Beleuchtung (in den Intensitätsstufen 2 und 3) deutlich vorhanden, bei UV und blauer Stimulation dagegen nicht. Die statistische Nachweisbarkeit einer Reduktion des Photonenstroms von 25% hinge von der Streuung der Daten ab.

Das bedeutet, eine deutliche Reduktion des Photonenstroms sollte trotz der breiten Empfindlichkeit der L-Rezeptoren und der Normalisierung der Daten eine Detektion der Inhibition ermöglichen.

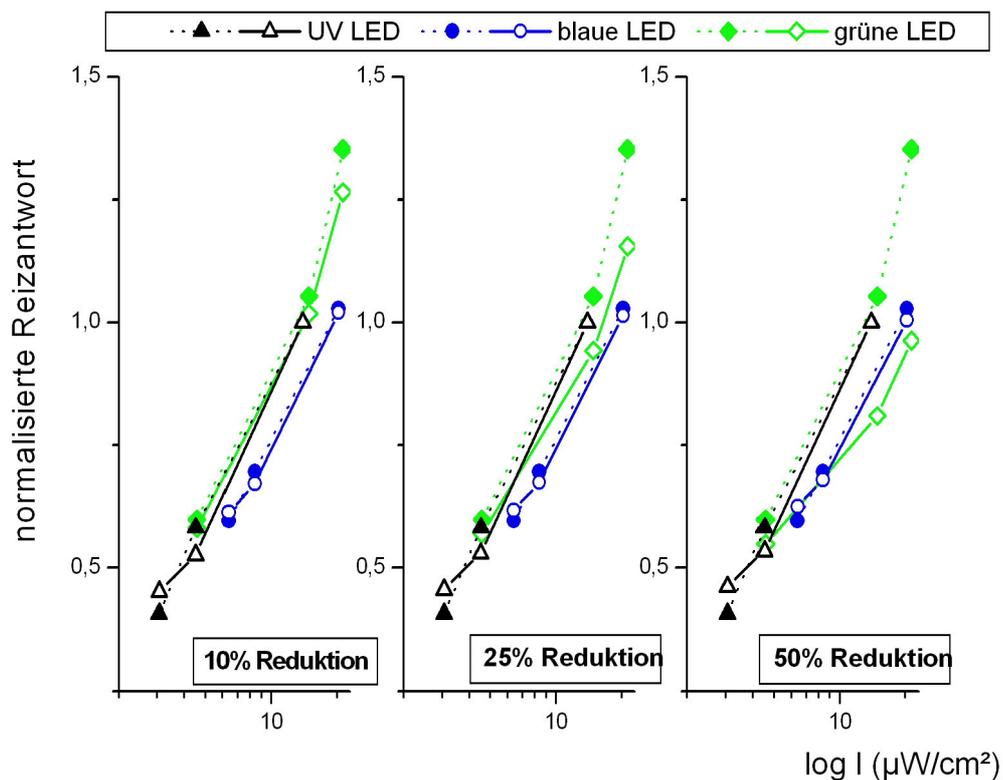


Abbildung 4.01: Simulierte normalisierte Reizantworten bei reduziertem L-Rezeptor-Photonenstrom im Vergleich mit gemessenen sustained-Antworten der Kontrollgruppe (Morgenmessung; volle Symbole). Simulierte Reduktion: um 10% (links), 25% (Mitte) oder 50% (rechts) reduzierter Photonenstrom in L-Rezeptoren (leere Symbole), Antworten wiederum normalisiert auf die Antwort bei stärkster UV-Beleuchtung, in Abhängigkeit von Stimulations-Energie.

In dieser Simulation werden allerdings potentielle Mechanismen zur Kompensation einer verminderten Empfindlichkeit vernachlässigt. In den Retinulazellen von vielen Insektenarten befinden sich Pigmentzellen, die sich lichtabhängig bewegen und somit eine Pupillenfunktion übernehmen. Bei Beleuchtung des Photorezeptors bewegen sich diese Pigmentzellen in Richtung des Rhabdoms und regulieren so den Lichtfluss in diesem. Die Stärke dieser Reaktion ist intensitätsabhängig, und die Intensität wiederum wird „gemessen“ als die Absorption von Photonen durch die visuellen Pigmente des Photorezeptors (Kirschfeld & Franceschini 1969, Menzel & Lange 1971, Kolb & Autrum 1972, 1974, Stavenga & Kuiper 1977, Bernard & Wehner 1980). In einem Photorezeptor, der durch einen Mangel an Rhodopsin weniger empfindlich ist, sollte die Aggregation der beweglichen Pigmentzellen um das Rhabdomer daher weniger stark sein, der Lichtfluss folglich weniger eingeschränkt. Die Reduktion der Reizantwort eines Photorezeptors aufgrund einer Rhodopsinreduktion sollte durch diesen Mechanismus abgeschwächt sein.

Es scheint, als ob eine leichte Reduktion der natürlichen Menge an Opsin die Amplitude des ERG nicht signifikant beeinflusst. Diese Flexibilität des visuellen Systems wäre physiologisch sinnvoll, um eine plastische Reaktion des visuellen Systems auch unter Extrembedingungen (dauerhafte Beleuchtung mit hoher Intensität und somit starke „Ab“nutzung von Rhodopsin) aufrechterhalten zu können. Auch bei *Drosophila* und der Maus resultierte eine Reduktion eines Opsins bzw. Rhodopsins nicht zwingend in der Reduktion der Amplitude des ERGs (Larivee et al. 1981, Bentreop et al. 1997, Gorbatyuk et al. 2005, 2007). Bei Fruchtfliegen, die wegen einer Mutation wesentlich weniger Rh1 Opsin als Wildtypen exprimierten (< 2%) oder wegen Vitamin A – Mangels nur eine reduzierte Menge an funktionalem Rhodopsin besaßen, wirkte sich dieser Rhodopsinmangel im ERG nicht auf die Amplitude aus (in diesen Tieren konnte aber das PDA (prolonged depolarizing afterpotential) nicht mehr ausgelöst werden, welches bei *Drosophila* entsteht, wenn durch Beleuchtung mit blauem Licht eine große Menge Rhodopsin in Metarhodopsin umgewandelt wird) (Larivee et al. 1981, Bentreop et al. 1997). Nur bei einer Rh1-Nullmutante reduzierte sich die Amplitude deutlich und wurde nur noch von der Aktivität der inneren Photorezeptoren R7 und R8 getragen.

Die Herunterregulierung des Rhodopsins in Wildtyp-Mäusen durch ein Ribozym oder mit Hilfe von RNAi führte trotz einer bis zu 50%igen Reduktion des Proteins zu keiner signifikanten Veränderung im ERG (Gorbatyuk et al. 2005, 2007). Die wesentlich stärkere Reduktion in hemizygoten Rhodopsin-Knockout Mäusen (80%) konnte allerdings mit einer Reduktion in der Amplitude des ERGs korreliert werden.

Es wäre sinnvoll, weitere Methoden zur Untersuchung der Empfindlichkeit des visuellen Systems anzuwenden, um die Eignung von ERGs für diese Aufgabe beurteilen zu können. Zum Beispiel könnte die zuvor erwähnte Pupillenantwort, also die intensitätsabhängige Bewegung von Pigmentzellen in den Photorezeptoren, durch die Messung von Transmission und Reflektion im Ommatidium untersucht werden (Stavenga & Kuiper 1977).

4.2.2 Die Relation der ERG-Komponenten zueinander und zu Strukturen des visuellen Systems

Dass verschiedene Komponenten des ERGs unabhängig voneinander moduliert werden können (durch experimentelle Behandlung aber auch durch natürliche zirkadiane Rhythmik) ist nicht ungewöhnlich. Eidechsen der Art *Anolis carolinensis* zeigten eine zirkadiane Rhythmik in der Ausprägung der b-Welle des ERGs, die von Zellen generiert wird, die postsynaptisch mit den Photorezeptoren verschaltet sind, aber nicht in der a-Welle, die auf die Aktivität der Photorezeptoren selbst zurückzuführen ist (Shaw et al. 1993). Bei der Fliege *Calliphora* werden die On- und Off-Transienten nachts verstärkt ausgeprägt, wahrscheinlich durch eine Stimulation der laminaren Monopolarzellen durch Neurotransmitter (Chen et al. 1999). *Drosophila hdc*-Mutanten, bei denen die Synthese des Neurotransmitters des visuellen Systems, Histamin, gestört ist, bilden im ERG keine transienten Komponenten aus (Burg et al. 1993). Hertel (1983) untersuchte in Deprivationsexperimenten Bienen, die ausschließlich unter UV-Licht aufgezogen wurden. Sie zeigten eine von Kontrolltieren nicht unterscheidbare Amplitude im ERG, allerdings waren die transienten Komponenten (On- und Off-) bei grüner Beleuchtung signifikant reduziert. Hertel führte dies auf eine verminderte Synapsenbildung zwischen den L-Photorezeptoren und ihren postsynaptischen Zellen während der Entwicklung zurück.

Die Herkunft der verschiedenen Komponenten des ERGs wurde in *Drosophila* detailliert untersucht (Heisenberg 1971, Alawi & Pak 1971). Bei der Honigbiene wurde aus den unterschiedlichen Antworteigenschaften geschlossen, dass On- und Off-Komponente neuronal einen anderen Ursprung haben als die sustained Komponente und wahrscheinlich laminaren Ursprungs sind (Goldsmith 1960, Seibt 1967, Hertel 1983, Gribakin 1988). Das Antwortspektrum von Laminazellen der Honigbiene ist sehr weit gefächert (de Souza et al. 1992); welche dieser Zellen zu den transienten Komponenten des ERGs beiträgt ist unbekannt.

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass On- und Off-Komponenten des ERG zumindest teilweise von der sustained-Komponente und voneinander unabhängig moduliert werden können: die Relation von On- sowie Off-Komponente zur sustained-Komponente veränderte sich mit dem Zeitpunkt der Messung. Die Steigung der Kennlinien von On- und Off-Komponente unterschieden sich deutlich voneinander. Die Wirkung der dsLWOP-Injektion war unterschiedlich für On- und Off-Komponenten.

4.2.3 *Der Einfluss der Tageszeit auf die Form des ERGs*

Milde (1985) zeigte, dass das ERG der Honigbiene in einem zirkadianen Rhythmus oszilliert, die Empfindlichkeit änderte sich mit einem Faktor, der zwischen vier und 20 lag. Diese Aussage konnte er treffen, weil er Langzeitableitungen vornahm; wahrscheinlich benutzte er das Plateau als Maß, eine davon unabhängige Rhythmik der transienten Komponenten wird nicht erwähnt. Eine zirkadiane Rhythmik in der Ausprägung des ERGs wird für viele Tierarten berichtet (Insekten (Ventura et al. 1976, Fleissner 1982, Tomioka & Chiba 1982, Menzi 1987, Chen et al. 1999, Chang & Lee 2001), Crustaceen (Gaus et al. 1997) und Vertebraten (Brandenburg et al. 1983, Shaw et al. 1993, Lu et al. 1995, Ren & Li 2004)). Die Mechanismen, die diesen Änderungen zugrunde liegen, basieren unter anderem auf tageszeitlich oszillierenden Ausschüttungen von Neurotransmittern oder des Hormons Melatonin (Gaus et al. 1997, Chen et al. 1999, Shaw et al. 1993, Lu et al. 1995), oder strukturellen Änderungen wie der Wanderung von Abschirmpigmenten (Chang & Lee 2001).

Da in dieser Arbeit keine Langzeitableitungen getätigt wurden, können auch keine Aussagen darüber getroffen werden, ob und in welchem Maße sich die absolute Amplitude der retinalen Summenpotentiale zwischen den Messzeitpunkten änderten. Es wurde aber deutlich, dass sich das Verhältnis der transienten On- und Off-Komponenten zur sustained-Komponente veränderte.

Die Injektion einer nicht unerheblichen Menge an Flüssigkeit in das Auge kann strukturelle Veränderungen im Auge bedingen, die die Antworteigenschaften des visuellen Systems beeinträchtigen können. Es könnte also sein, dass die Veränderungen, die in Bezug auf die Form der ERGs zwischen den beiden Messzeitpunkten beobachtet wurden, einzig auf die Behandlung zurückzuführen sind. Tatsächlich war in Pilotversuchen der gemessene absolute Spannungsabfall als Antwort auf eine Lichtstimulation in injizierten Tieren um einiges geringer als in nicht injizierten Tieren. Allerdings war in diesen Versuchen nicht beobachtet worden, dass sich die Qualität der Ableitungen innerhalb von drei Tagen nach Injektion in irgendeiner Form veränderte.

Geht man also davon aus, dass die Injektion an sich keinen oder einen vernachlässigbaren Effekt auf die Form der ERGs hatte, kann man sagen, dass die transienten Komponenten relativ zur sustained Komponente in einer Messung am (tatsächlichen und subjektiven) Morgen kleiner waren als am Abend. In der Kontrollgruppe, die man als „Normalzustand“ definieren könnte, ist diese Veränderung für die Off-Komponente signifikant, in der mit dsLWOP injizierten Gruppe änderte sich die Relation zwischen On- und sustained-Komponente signifikant. Das heißt, durch die RNAi-Behandlung wurde die Veränderung der Off-Komponente abgeschwächt, der On-Komponente aber verstärkt.

Da die Verlaufskurven durch Normalisierung auf die sustained-Antwort entstanden, kann man nur Aussagen darüber treffen, wie sich die Relation zwischen den Komponenten verändert. Es kann sein, dass sich nicht (nur) die Stärke der transienten Komponenten zwischen den Messzeitpunkten veränderte, sondern (auch) die Amplitude der sustained Komponente.

Was diese zirkadianen Veränderungen auf zellulärer und physiologischer Ebene verursacht ist unklar. Der Dopamingehalt der optischen Loben von *Apis mellifera* oszilliert während des Tages und könnte eine Änderung der Empfindlichkeit verschiedener Nervenzellen verursachen (Carrington et al. 2007). Bei Dipteren ändert sich die Anzahl der Synapsen zwischen Photorezeptor-Terminalien und postsynaptischen Monopolarzellen in der Lamina mit einem zirkadianem Rhythmus (Meinertzhagen & Pyza 1999) und die Off-Komponente des ERGs von *Drosophila* wird als Indikator für die synaptische Effizienz angesehen (Gibbs et al. 2001). Inwiefern eine Herunterregulierung des LW-Opsins diese potentiellen Mechanismen modulieren könnte ist ebenfalls unbekannt.

Die Reduktion des LW-Opsin Proteins, gemessen durch SDS-PAGE und Western Blot, war signifikant 12 Stunden nach der Injektion, nach 24 Stunden war die Menge in dsLWOP-injizierten Tieren nicht von der in Kontrolltieren zu unterscheiden. Wann die Reduktion physiologisch relevant ist, ist aber unklar (siehe Abschnitt 4.1.5). Dies konnte auch nicht mit Hilfe der unterschiedlich stark ausgeprägten Veränderungen in der ERG-Form geklärt werden. Es kann sein, dass eine abendliche Verstärkung der On-Komponente durch RNAi weiter maximiert wurde oder dass die natürliche morgendliche Abschwächung der On-Komponente weiter verstärkt wurde. Analog gilt dies für die Veränderungen, die die Off-Komponente betrafen und durch dsLWOP-Injektion abgemildert wurden.

4.3 Klassische Konditionierung visueller Stimuli in fixierten Bienen

RNAi stellt potentiell eine erfolgsversprechende Manipulationsmethode dar, um den Einfluss der peripheren Lichtverarbeitung, wie Quantenabsorption in Photorezeptoren, auf die visuelle Wahrnehmung, zum Beispiel Farbsehen, bei Bienen zu untersuchen.

Es ist daher erforderlich, einen Verhaltenstest zu entwickeln, bei dem sowohl Injektionen ausgeführt als auch Verhaltensantworten ausgelöst werden können. Ein Lernparadigma für fixierte Bienen bietet den Vorteil, dass Lernen und Gedächtnis während der Applikation von molekularbiologischen oder elektrophysiologischen Methoden beobachtet und gemessen werden kann. Es bot sich an, das für die Untersuchung von Perzeption und Lernen von olfaktorischen Stimuli seit langem genutzte

Konditionieren des Ausstrecken der Proboscis (Proboscis Extension Response, PER; siehe Takeda 1961, Bitterman et al. 1983) auf das Lernen von visuellen Stimuli zu übertragen.

Abgesehen von dem funktionellen Nutzen eines Verhaltenstests für fixierte Tiere ist vor allem von Interesse wie sich das Lernen visueller Stimuli zwischen fixierten und frei fliegenden Bienen unterscheidet, was die Unterschiede zwischen visueller und olfaktorischer PER-Konditionierung ausmacht und wo mögliche Ursachen dafür liegen.

Die klassische Konditionierung auf visuelle Stimuli zeigte, dass fixierte Bienen Farben schnell lernen können und das Gedächtnis für diese Farben mindestens eine Stunde bestehen bleibt. Der gelernte Stimulusparameter ist dabei die Farbe, nicht die absolute Intensität oder der achromatische L-Rezeptor Kontrast. Der Erfolg einer differentiellen Konditionierung ist abhängig vom chromatischen Abstand zwischen belohntem und unbelohntem Stimulus. Auch die Reaktion auf neue Stimuli kann mit der chromatischen Ähnlichkeit zum belohnten Stimulus korreliert werden. Die Antwort auf unbekannte Reize ist außerdem abhängig vom Konditionierungsparadigma (absolut oder differentiell).

Auf der Grundlage meiner Ergebnisse schlage ich vor, dass die PER in Verhaltenskontexten relevant ist, in denen die Präzision der visuellen Information nicht hoch sein muss. Visuelle Information ist wichtig im Flug (Orientierung, Finden von Futter, Finden des Stocks), olfaktorische und mechanosensorische dagegen bei Nicht-Flug-Verhaltensweisen wie der Orientierung auf der Blüte, der Detektion von Nektar oder der Kommunikation innerhalb des Stocks. Visuelle Reize könnten daher in der Hierarchie der Stimuli, die die PER auslösen, unter mechanosensorischen und olfaktorischen Reizen stehen und von diesen inhibiert werden. Ob die reduzierte Farbdiskriminierung mit dem Verhaltenskontext der PER oder der sensorischen Verarbeitung der Information, welche für die PER genutzt wird, im Zusammenhang steht, ist unklar.

4.3.1 Einfluss des antennalen Inputs auf die visuelle Konditionierung fixierter Bienen

Frei fliegende Bienen lernen Farben sehr schnell und ein mehrere Stunden anhaltendes Gedächtnis kann bereits nach einer einzigen Paarung von CS und US

geformt werden (Menzel 1968, Menzel & Erber 1972). Die Akquisition von olfaktorischen Stimuli erfolgt sowohl in frei fliegenden als auch in fixierten Tieren rasch (von Frisch 1919, Bitterman et al. 1983, Menzel & Müller 1996, Menzel 1999). Da die klassische Konditionierung von visuellen Stimuli oftmals nicht gelang oder der Lernerfolg gering und die Akquisition langsam waren (Kuwabara 1957, Masuhr & Menzel 1972, Gerber & Smith 1998) schlugen Mauerhagen und Greggers (1993) vor, dass das Lernen visueller Stimuli auf der Assoziation von Stimulus und Antwort statt, wie in der klassischen Konditionierung, von Stimulus und Belohnung beruht.

In neueren Experimenten von Hori et al. (2006) zeigte sich, dass die klassische Konditionierung der PER mit visuellen Stimuli unter gewissen Bedingungen möglich ist. Es stellte sich heraus, dass der entscheidende Faktor dabei die Entfernung der Antennen ist. In Studien, in denen die Bienen ihre Antennen behielten, war die Akquisition entweder sehr langsam (Masuhr & Menzel 1972) oder das Training mit Licht führte zu keiner signifikanten Anhebung der Antwortwahrscheinlichkeit auf visuelle Stimuli, erleichterte aber eine darauf folgende olfaktorische Konditionierung (im Gegensatz zu backward und unpaired konditionierten Tieren; Gerber & Smith 1998). Letztgenannte Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Training mit visuellen Stimuli einen Lernvorgang induziert, auch wenn kein Anstieg der PER-Rate während des Trainings zu beobachten war.

In meinen Experimenten reichte für einen stabilen Anstieg der Antwortwahrscheinlichkeit während des Trainings die Entfernung des Flagellums aus. Auf diesem Teil der Antenne befinden sich Chemorezeptoren. Eine mögliche Erklärung für die schwache Akquisitionsleistung für visuelle Stimuli in Bienen mit intakten Antennen könnte eine Inhibition des motorischen PER-Musters durch antennalen Input sein. Dieser Input könnte aus olfaktorischer oder mechanosensorischer Information bestehen, zum Beispiel von dem mit Zuckerwasser angefeuchteten Holzstäbchen, welches zur Belohnung verwendet wird. Diese sensorischen Inputs können, ebenso wie die Wahrnehmung von Wasserdampf, eine PER hervorrufen (Kuwabara 1957, Menzel et al. 2001, Giurfa & Malun 2004).

Es gibt mehrerer Regionen im Bienenhirn in dem multi-sensorische Integration stattfindet und visuelle und antennale Netzwerke interagieren könnten. Maronde (1991)

fand drei Neuropil-Regionen in denen sich verzweigende Projektionen aus dem Antennallobus und der Lobula überlappen, nämlich die Dorsalloben sowie das mediane und das laterale Protocerebrum. Im Pilzkörper, dem für Lernen und Gedächtnis wichtigen Neuropil (siehe Menzel 2001) stellen die Calyces die Haupt-eingangsregion dar. Die Lippe der Calyces erhält olfaktorischen, der Kragen visuellen Input und es gibt Kenyon-Zellen, die in beide Regionen projizieren (Rybak 1994).

Das neuronale Substrat, welches die Assoziation von Stimulus und Belohnung in klassischer Konditionierung visueller Stimuli vermittelt, ist unbekannt. Während der olfaktorischen Konditionierung wird die CS-US Assoziation durch das oktopaminerge VUMmx1 Neuron hergestellt (Hammer 1993, Hammer & Menzel 1998). Oktopamin vermittelt dabei den verstärkenden Effekt der Belohnung (Menzel et al. 1999). Das VUMmx1 Neuron konvergiert mit Neuronen des olfaktorischen Netzwerks im Antennallobus, dem lateralen Protocerebrum und der Lippenregionen der Calyces des Pilzkörpers. Bisher wurde kein VUM Neuron gefunden welches die visuellen Loben innerviert (Schroeter et al. 2007), aber Immunofärbungen zeigen, dass Oktopamin in den visuellen Loben vorhanden ist (Kreissl et al. 1994).

Eine alternative oder zusätzliche Hypothese zu der Inhibition des Lernens von visuellen Stimuli durch das olfaktorische System ist die Möglichkeit, dass eine Aufgaben-spezifische Hierarchie der sensorischen Systeme besteht. Man könnte spekulieren, dass das Ausschalten einer Modalität die Funktionsweise der anderen durch eine neue Ausrichtung der Aufmerksamkeit verstärkt. So fanden zum Beispiel Rybak et al. (2007) Hinweise, dass das Abdecken der Augen von fixierten Bienen, die mit olfaktorischen Stimuli konditioniert und an den Tarsen belohnt wurden, die Akquisitionsrates verbessern kann.

4.3.2 Reizgeneralisierung und Art des Trainings

Die in dieser Studie verwendete Methode führte zu einer schnellen und steil ansteigenden Akquisition während des Trainings. Die Wahrscheinlichkeit, auf unbekannte Stimuli zu antworten sowie der Erfolg einer differentiellen Konditionierung korrelierte mit dem Farbabstand zwischen den verwendeten Farben. Intensität oder L-Rezeptor-Kontrast übten keinen Einfluss auf die Lernrate aus und wurden nicht genutzt, um zwischen Stimuli zu differenzieren. Da großflächige Stimuli genutzt wurden,

war dies auch nicht zu erwarten, da die Empfindlichkeit für achromatische Eigenschaften von großen Stimuli klein ist (Backhaus et al. 1987, Giurfa & Vorobyev 1998, Hempel de Ibarra et al. 2000, Niggebrügge & Hempel de Ibarra 2003).

Ein überraschendes Ergebnis der Versuche war die Tatsache, dass die Fähigkeit, zwischen Farben zu diskriminieren in fixierten Bienen im Vergleich zu frei fliegenden Bienen reduziert zu sein scheint. Die Empfindlichkeitsfunktionen der Photorezeptoren ermöglichen ein Farbsehen mit einer hohen chromatischen Auflösung (von Helversen 1972, Peitsch et al. 1992, Vorobyev 1997, Vorobyev & Menzel 1999). Die für frei fliegende Bienen zutreffenden Vorhersagen über die Unterscheidbarkeit von Farben durch das RNQ Modell von Vorobyev et al. (2001) werden unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen oft nicht erfüllt. Die fixierten Tiere lernten schnell zwischen Blau und Gelb zu unterscheiden, die Unterscheidung zwischen den ähnlicheren Farben Blau und Weiß dauerte länger und die Antwortrate für die noch ähnlicheren Farben Gelb und Grün unterschieden sich nach zehnmaliger differentieller Konditionierung nicht voneinander. Der Farbabstand dieser Stimuluspaare lag über dem Diskriminations-Grenzwert von 2.3 (siehe Tab. 2.03).

Dass ein zehnmaliges differentielles Konditionieren zu keiner signifikant unterschiedlichen Antwortrate führt muss nicht heißen, dass die Tiere die Stimuli nicht voneinander unterscheiden können. Ernst und Heisenberg (1999) gelang es mit einigen Musterpaaren nicht, Fruchtfliegen im Flugsimulator differentiell zu konditionieren. In unbelohnten Kontrollversuchen gab es aber individuelle Präferenzen für eines der beiden Muster, die für die Tiere also unterscheidbar sein mussten.

In dieser Studie antworteten Bienen signifikant mehr auf einen dunkelgrünen Testreiz wenn sie differentiell auf Grün mit Gelb als unbelohntem Stimulus trainiert wurden als für die umgekehrte Trainingssituation. Dies ist interessant, da sich in beiden Trainingssituationen die Akquisitionskurve für den CS+ nicht von der für den CS- unterschieden. Obwohl die Bienen also scheinbar nicht zwischen Gelb und Grün diskriminierten, änderte sich die Wahrscheinlichkeit, mit der auf den selben neuen Reiz geantwortet wurde.

Die Generalisierung zwischen teilweise sehr unterschiedlichen Farben war stark. Von Reizgeneralisierung spricht man, wenn die Reaktion auf einen gelernten Reiz auf andere, meist ähnliche aber auf jeden Fall diskriminierbare Reize übertragen wird (Pavlov 1927, siehe Ghirlanda & Enquist 2003). In diesem Fall kann man das Antwortverhalten für das Farbpaar Blau-Weiß nach absoluter Konditionierung als Generalisierung bezeichnen, da es während der differentiellen Konditionierung dieses Stimuluspaares zu Abnahme der PER-Rate für den unbelohnten Reiz kam. Die fixierten Bienen konnten diese Farben also voneinander unterscheiden. Bei dem ähnlicheren Farbpaar Gelb und Grün kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein verlängertes Training ebenfalls zu einer Unterscheidung geführt hätte. Dass Reizgeneralisierung und Diskrimination umgekehrt proportional zueinander sind, wurde in Studien zur Generalisation von Wellenlängen durch Tauben und Menschen gezeigt (Guttman & Kalish 1965, Kalish 1958, siehe Honig & Urcuioli 1981).

Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass Stimuli, die sich in einer Eigenschaft stark ähneln (zum Beispiel ihrer Farbe) auch andere Eigenschaften teilen (zum Beispiel Güte der Belohnung). Außerdem variieren natürliche Objekte stets in ihrer Merkmalsausprägung; die Blüten einer Art haben selten genau die selbe Farbe oder genau den selben Duft. Die Generalisierung zwischen Reizen macht also ökonomisch Sinn, da eine einmal gelernte Assoziation zwischen Reiz und Bedeutung auf ähnliche Stimuli übertragen werden kann und einen neuen Lernprozess unnötig macht. Andererseits sollte die Erfahrung, dass Unterschiede in gewissen Merkmalen Hinweise auf Unterschiede in der Bedeutung der Objekte sein können, die Generalisierung reduzieren.

Konsequenterweise hing der Grad der Generalisierung von der Konditionierungsprozedur ab. Die absolute Konditionierung auf Blau führte zu einer signifikant höheren Antwort auf einen weißen Teststimulus als die differentielle Konditionierung mit einem blauen CS+ und einem gelben CS-. Diese reduzierte Antwort war aber immer noch stärker als die einer parallel trainierten Gruppe (Blauer CS+ vs weißer CS-) auf einen gelben Teststimulus. Durch die Art der Konditionierung konnte die Generalisierung also reduziert, aber nicht vollständig verhindert werden.

Auch Wright et al. (2008) konnten zeigen, dass in der klassischen PER-Konditionierung von Düften die Generalisierung zwischen Stimuli von der Art des Trainings abhängt. Im Vergleich zu Tieren, die mit nur einer Duftmischung trainiert wurden, generalisierten Bienen, die appetitiv mit zwei Duftmischungen trainiert wurden, stärker auf neue Mischverhältnisse der Einzeldüfte, differentiell konditionierte Bienen dagegen weniger. Ebenso diskriminieren frei fliegende Bienen und Hummeln besser bzw. generalisieren weniger zwischen Farben oder Mustern wenn sie differentiell konditioniert wurden (Giurfa et al. 1999a, Giurfa 2004, Dyer & Chittka 2004). Die Autoren spekulieren, dass die Art des Trainings die Aufmerksamkeit der Tiere und somit die interne Gewichtung von Stimuluseigenschaften und -unterschieden beeinflussen könnte.

Generalisierung kann asymmetrisch sein, vielleicht aufgrund von Erfahrung oder angeborenen Präferenzen (Guerrieri et al. 2005). Dies wurde auch für frei fliegende Bienen gezeigt, die abwechselnd mit zwei verschiedenen Farben appetitiv konditioniert wurden (Benard & Giurfa 2008). Die anschließende Generalisierung auf Testfarben war unterschiedlich stark, obwohl diese den selben Farbabstand zu den trainierten Stimuli aufwiesen. Die Autoren führten dieses Verhalten auf die Möglichkeit zurück, dass Bienen Farbkategorien bilden. In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen konnte kein Unterschied zwischen reziproken Versuchen festgestellt werden.

Der Grund, warum die Diskriminierungsfähigkeit der fixierten Bienen im Vergleich zu frei fliegenden Bienen schlechter zu sein scheint, könnte in der Art der Konditionierung liegen. Die PER-Konditionierung ist eine klassische Konditionierung nach Pavlov, in der eine Assoziation zwischen einem Reiz und einer Belohnung gebildet wird. Dagegen beinhalten Experimente mit frei fliegenden Bienen eine operante Komponente, bei der die Assoziation zwischen dem Verhalten des Tieres und der Belohnung gebildet wird. Für Menschen, Säugetiere und Insekten wurde gezeigt, dass das Gedächtnis für Information, die selber generiert wurde anstatt passiv konsumiert worden zu sein, stabiler ist („Generation effect“; Slamecka & Graf 1978, Kornell & Terrace 2007, Brembs & Heisenberg 2000).

Die Ergebnisse meiner Versuche lassen keine Aussage darüber zu, ob sich das Gedächtnis von klassisch konditionierten Bienen von dem von operant konditionierten Tieren unterscheidet und ob der „generation effect“ einen Einfluss auf die Diskriminationsfähigkeit oder Generalisierung ausübt, wurde bisher nicht untersucht. Im Y-maze anfliegende Bienen können den Stimulus in seinem Timing und seiner Erscheinungsweise kontrollieren, zum Beispiel, mit welcher Region des Auges der Reiz gesehen wird, ein wichtiger Schritt für das Erkennen und Lernen von Farben und Mustern (Giger & Srinivasan 1997, Giurfa et al. 1999a, 1999b). Es scheint also plausibel, dass eine operante Konditionierung, in der das Tier eine gewisse Kontrolle über seinen motorischen Output und somit den sensorischen Input ausübt, die Fähigkeit zur Diskrimination positiv beeinflussen kann.

Ein weiterer möglicher Grund dafür, dass die Diskriminierung zwischen Farben in meinen Versuchen schlechter als bei frei fliegenden Bienen war, liegt in der Art, wie die differentielle Konditionierung in fixierten Bienen stattfindet. In Farbdiskriminierungsversuchen mit frei fliegenden Bienen werden belohnte und unbelohnte Stimuli meist gleichzeitig, oder wenn man die geringe Sehschärfe berücksichtigt (Land 1997), zumindest in engem zeitlichem Rahmen, präsentiert (zum Beispiel von Helversen 1972, Backhaus et al. 1987, Vorobyev et al. 2001, Giurfa 2004). Bienen zeigen eine signifikant höhere Leistung in Farbdiskriminierungsexperimenten, in denen belohnte und unbelohnte Stimuli simultan präsent sind als in der differentiellen Konditionierung mit sukzessiver Präsentation (Dyer & Neumeyer 2005). Zwischen den Präsentationen von belohnten und unbelohnten Stimuli lagen in meiner Arbeit mindestens zehn Minuten.

4.3.3 Extinktion

Kuwabara (1957) berichtete, dass es ihm nach der erfolgreichen Konditionierung von monochromatischen Stimuli nicht möglich war, das Gedächtnis für den gelernten Stimulus durch dessen 30malige unbelohnte Präsentation zu extingieren. Er verglich dies mit gleichzeitig durchgeführten Versuchen seines Kollegen Takeda, der eine olfaktorische PER-Konditionierung durchführte und Extinktion beobachten konnte (1961).

Ich untersuchte, ob eine Extinktion der Antwort auf eine gelernte Farbe möglich war. Bei siebenmaliger Paarung von Stimulus und Belohnung fand ich einen Abfall der PER-Rate im Vergleich zum letzten Trainingsdurchgang nach dreimaliger unbelohnter Präsentation. Im Gegensatz zu meinen Experimenten trainierte Kuwabara die Bienen während zwei Tagen mit ITIs zwischen 15 und 60 Minuten. Dies kann ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Extinktionsversuche sein, da Akquisition und Gedächtnis vom zeitlichen Abstand zwischen einzelnen Trainingseinheiten beeinflusst werden (Menzel et al. 2001).

Nach dreimaliger unbelohnter Präsentation der zuvor gelernten Farbe sank die Antwortrate in meinem Experiment nicht weiter ab sondern stabilisierte sich auf einem Niveau welches sich signifikant von der anfänglichen Spontanantwort unterschied. Ob es sich dabei um eine Wiederherstellung des Gedächtnisses handelte, wie sie in der olfaktorischen PER-Konditionierung eine Stunde nach fünfmaliger Extinktion beobachtet wurde (Sandoz & Pham-Delègue 2004) kann aufgrund der Unterschiede in dem vorausgehenden Trainingsprotokoll nicht gesagt werden.

4.4 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten sowohl Eigenschaften des für langwelliges Licht empfindlichen Opsins der Honigbiene genauer charakterisiert werden als auch die Eignung von RNAi als Methode zur Manipulation des visuellen Systems bewertet werden. Außerdem wurden einige Grundlagen des Lernens von farbigen visuellen Stimuli durch fixierte Tiere beschrieben. Einige Fragen blieben jedoch ungeklärt oder wurden durch die Ergebnisse erst aufgeworfen.

Die Kombination von verschiedenen molekularbiologischen und elektro-physiologischen Methoden erwies sich als geeignet, die Auswirkungen der RNAi im Auge der Honigbiene auf verschiedenen Ebenen zu charakterisieren und zu quantifizieren. Es wäre jedoch wünschenswert, diese Methoden zur Klärung spezifischer Fragen weiter zu ergänzen. So wäre zum Beispiel eine Analyse des LW-Opsin Proteins hinsichtlich seines funktionellen Status wichtig, also in welchem Verhältnis es im Zytosol oder in der Rhabdomerenmembran vorhanden ist und ob es dort aktivierbar als Teil des Rhodopsins oder nicht aktivierbar als Metarhodopsin vor-

liegt. Die Empfindlichkeit der Photorezeptoren nach Aktivierung der RNAi könnte anhand der bereits beschriebenen Analyse der intensitätsabhängigen Bewegung von Abschirmpigmenten (Pupillenantwort) abgeschätzt werden.

Von besonderem Interesse, auch in Hinblick auf die Effizienz der RNAi-Wirkung, ist der quantitative Zusammenhang zwischen LW-Opsin mRNA und Protein sowie die Frage, welchen Beitrag endogene zirkadiane Schrittmacher und die Lichtkondition zur Mengenänderung des Proteins leisten. Da ein zirkadianer Rhythmus per Definition in Dunkelheit fortbesteht, kann dessen Einfluss auf die Proteinmenge durch die wiederholte LW-Opsin Quantifizierung von im Dunkeln gehaltenen Bienen untersucht werden. Stellt sich heraus, dass das Opsin tatsächlich durch einen endogenen Schrittmacher reguliert wird, kann untersucht werden, ob die hier entdeckte tageszeitliche Abhängigkeit der Effizienz der RNAi ebenfalls im Dunkeln fortbesteht oder ob diese eher von der Lichtkondition (also der Aktivität des visuellen Systems) bestimmt wird.

Durch Langzeitableitungen des ERGs, die direkt nach der Injektion von dsRNA beginnen, könnten die Veränderung von absoluten Reizantworten aufgenommen werden und somit auch kleine Modulierungen durch RNAi detektiert werden. In nicht injizierten Bienen können solche Dauerableitungen zu einem besseren Verständnis in Bezug auf die Veränderungen einzelner ERG-Komponenten während des Tages führen. Mit histologischen und biochemischen Methoden kann untersucht werden, ob diese Änderungen analog zu andern Insektenarten mit der Ab- und Zunahme der Synapsenzahl in der Lamina oder der Ausschüttung von Neuromodulatoren korreliert werden können.

Die LW-Opsin mRNA-Menge in jungen Bienen ist wesentlich geringer als in Sammlerinnen (Sasagawa et al.). Eine möglicherweise damit korrelierte geringe Menge an dem korrespondierenden Protein könnte unter Umständen stärker durch RNAi reduziert worden. Franz (2006) fand keinen Effekt von für den Tyramin-Rezeptor spezifischer dsRNA auf die gustatorische Empfindlichkeitsschwelle von alten "Winterbienen" im Gegensatz zu frisch geschlüpften Bienen und führt dies auf das gesteigerte Vorkommen des Rezeptors bei alten Bienen zurück.

Auch eine Weiterentwicklung des Lernparadimas für fixierte Bienen wäre wünschenswert. Da die Art des Trainings einen Einfluss auf die Generalisierung zwischen Stimuli hatte, sollte man den Lernerfolg in einer differentiellen Konditionierung untersuchen, in welcher der CS- bestraft wird (zum Beispiel durch Elektroschock). Dauer des Trainings oder das Intervall zwischen den Trainingseinheiten können systematisch variiert sowie das Gedächtnis und die Extinktion zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden, auch um Vergleiche zur olfaktorischen PER-Konditionierung ziehen zu können. Wie und wo der antennale Input die Akquisition von visuellen Stimuli in der klassischen Konditionierung hemmt bzw. beeinflusst ist ebenfalls von Interesse. Die Tendenz zur Generalisierung sowie der Mindest-Farbabstand für die Diskrimination klassisch konditionierter Stimuli kann mit der Benutzung neuer Farbpaare weiter eingegrenzt werden, auch in Hinsicht auf mögliche Kategorienbildung.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, zum Verständnis des visuellen Systems der Honigbiene *Apis mellifera* beizutragen. Dazu wurde die Expression eines Opsins mit Hilfe der Methode RNA Interferenz (RNAi) spezifisch herunterreguliert. Opsine stellen den Proteinanteil des photorezeptiven visuellen Pigments dar und determinieren die spektrale Empfindlichkeit der Photorezeptoren. Von den drei Rezeptortypen der Retina wurde der für langwelliges Licht empfindliche Photorezeptortyp (L-Rezeptor) als Untersuchungsobjekt gewählt, da er in der aufgabenspezifischen Kodierung von chromatischer und achromatischer Information eine wichtige Rolle spielt. Der Erfolg der Inhibition wurde mit molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Zusätzlich wurde ein verhaltensbiologischer Test entwickelt, um das Farbsehen und –lernen in fixierten Tieren untersuchen zu können.

Die Evaluation der Wirkung von RNAi auf die mRNA-Menge des für langwelliges Licht empfindlichen Opsins (LW-Opsin) mit Real Time PCR ergab, dass eine Hemmung um bis zu 60% erreicht werden konnte. Die Wirkung war zeitlich auf einige Stunden und lokal auf die injizierte Retina begrenzt. Überdies wurde eine Mindestmenge an doppelsträngiger RNA benötigt, damit eine Hemmung detektiert werden konnte.

Der Gehalt an LW-Opsin Protein wurde mit Hilfe eines für das LW-Opsin der Hummel entwickelten Antiköpers durch SDS-PAGE und Western Blot quantifiziert. Die Untersuchung von unbehandelten Tieren offenbarte eine natürliche Schwankung der LW-Opsin Proteinmenge im Tagesverlauf, mit einem Maximum acht Stunden nach Beginn der Photoperiode und einen folgenden Abfall um fast 50%.

Zwölf Stunden nach der Injektion von spezifischer doppelsträngiger RNA war die Proteinmenge relativ zu Kontrolltieren um ca. 25% reduziert wenn die Injektion am Morgen stattfand. Eine Injektion am Abend rief dagegen keine statistisch signifikante Wirkung hervor, ebenso war in späteren Messungen keine Reduktion des Proteins messbar.

In der Messung retinaler Summenpotentiale (Elektroretinogramme, ERGs) wirkte sich die RNAi 12 und 24 Stunden nach Injektion nicht nachweisbar auf die Amplitude der Reizantwort auf langwelliges (grünes) Licht in Relation zur Antwort auf mittel- und

kurzwellige Stimulation (blau und UV) aus. Der Vergleich der Form der Reizantworten zwischen der abendlichen und der morgendlichen Messung offenbarte jedoch eine Veränderung in der Relation der ERG-Komponenten zueinander. Diese Veränderung fiel in Experimental- und Kontrolltieren unterschiedlich aus.

Die Ergebnisse erweitern und bestätigen die bisher bekannten Hinweise, dass das visuelle System der Honigbiene einem zirkadianen Rhythmus unterliegt, charakterisiert durch ein tageszeitabhängiges Volumen der Proteinmenge des LW-Opsins sowie die Ausprägung verschiedener Komponenten des ERGs. Auch die unterschiedliche Wirksamkeit der RNAi zu verschiedenen Zeitpunkten kann möglicherweise auf den zirkadianen Rhythmus zurückgeführt werden.

Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit das Farbenlernen der Honigbiene durch die Weiterentwicklung einer Dressurmethode für fixierte Tiere untersucht. Die Fixierung der Tiere ist von Vorteil für kombinierte Untersuchungen auf physiologischer und Verhaltensebene. Bei der klassischen Konditionierung auf visuelle Stimuli lernten die Tiere die Farbe des belohnten Stimulus, nicht jedoch dessen Intensität. Es zeigte sich, dass die Diskriminationsleistung in fixierten Tieren schwächer war als in frei fliegenden Tieren. Die Art der Konditionierung (absolut oder differentiell) beeinflusste die Stärke der Generalisierung. Für die gelernte Farbe bildeten die Tiere ein stabiles Gedächtnis, das mindestens eine Stunde anhielt.

ABSTRACT

The present thesis aims to widen our understanding of the visual system of the honeybee *Apis mellifera* by new molecular biological and behavioral methods. RNA Interference (RNAi) was used to specifically down-regulate the expression of an opsin being the protein component of the photosensitive visual pigment in the photoreceptor membrane and determining the receptor's spectral sensitivity. There are three different types of photoreceptors in the bee retina. The L-receptor, sensitive to long wavelength, was chosen as target because of its main role in the coding of chromatic and achromatic visual information. The inhibition was assessed by molecular biological and electrophysiological methods. In addition a behavioral test was developed to investigate color perception and learning in restrained animals.

The effect of RNAi on the expression of the long-wavelength sensitive opsin (LW opsin) mRNA was evaluated by Real Time PCR revealing a down-regulation of up to 60%. The effect was transient and restricted to the injected retina. A minimum amount of 5µg of double-stranded RNA was needed to detect a significant inhibition.

The amount of LW opsin protein was quantified by means of an antibody developed for the LW opsin of a bumblebee using SDS PAGE and Western Blots. Repetitive sampling of non-injected animals revealed a natural oscillation of the protein within 24 hours, with a peak eight hours after beginning of the light period and a subsequent decrease of almost 50%.

Twelve hours after the injection of double-stranded RNA a reduction effect of about 25% was measured when the injection occurred at the beginning of the light phase. If the treatment was administered at the end of the light phase, no down-regulation was detected after the same period of time of 12 hours, nor after longer time periods.

The effect of RNAi on the signal responses in the bee retina was assessed through recording electroretinograms (ERG) 12 and 24 hours after a morning injection. No reduction was detectable when the amplitude of responses to long wavelength (green light) were normalized against the responses to short and medium wavelength (UV and blue light). However, the shape of the ERG response to the light stimuli changed between the two measurements through the differential expression of the transient components of the ERG. These changes were different in experimental and control groups.

These results supplement and confirm earlier established findings that indicate influences of circadian rhythm on visual functions in the visual system of the honeybee. These effects have been characterized here by a change in the amount of LW-opsin protein and the shape of the ERG over the day. The difference in the efficiency of the RNAi is most likely also related to the circadian rhythm.

In addition, I further developed a behavioral test for the investigation of color learning in restrained honeybees. Restraining the animals bears the possibility of simultaneous investigation of physiological processes and behavior. The classical conditioning to colored light stimuli revealed that the animals learned the colour of a light stimulus but not its intensity. Comparing the results obtained to the performance of free-flying bees, colour discrimination was poor. In addition, a strong tendency for colour generalization was revealed. This generalization depended partly on the conditioning procedure, e.g. whether bees were conditioned absolutely or differentially. Bees formed a stable memory for the learned colour that lasted at least for one hour.

LITERATUR

- Aargaard L & Rossi JJ (2007) RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews* 59: 75-86
- Ahmad ST, Natochin M, Barren B, Artemyev NO & O'Tousa JE (2006) Heterologous expression of bovine rhodopsin in *Drosophila* photoreceptor cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 47 (9): 3722-3728
- Alawi AA & Pak WL (1971) On-transient in insect electroretinograms: its cellular origin. *Science* 172: 1055-1056
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389-3402
- Amdam GV, Simoes ZLP, Guidugli KR, Norberg K & Omholt SW (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC biotechnology* 3: 1
- Amdam GV, Norberg K, Page RE Jr, Erber J & Scheiner R (2006) Downregulation of *vitellogenin* gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research* 169: 201-205
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR & Kramer KJ (2005) *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *PNAS* 102 (32): 11337-11342
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ & Pereira MH (2006) RNA interference of the salivary gland nitrophenol 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 683-693
- Arias AM (2008) *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. In: Dahmann C (ed.): *Methods in Molecular Biology: Drosophila: Methods and Protocols*. Humana Press, NJ: 1-25
- Arikawa K, Kawamata K, Suzuki T & Eguchi E (1987) Daily changes of structure, function and rhodopsin content in the compound eye of the crab *Hemigrapsus sanguineus*. *Journal of Comparative Physiology A* 161: 161-174
- Aronstein K, Pankiw T & Saldivar E (2006) SID-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *Journal of apicultural research* 45 (1): 20-24
- Backhaus W (1991) Color opponent coding in the visual system of the honeybee. *Vision Research* 31 (7/8): 1381-1397
- Backhaus W, Menzel R & Kreissel S (1987) Multidimensional scaling of color similarity in bees. *Biological Cybernetics* 56 (5-6): 293-304
- Bagasra O & Prilliman KR (2004) RNA Interference: the molecular immune system. *Journal of Molecular Histology* 35: 545-553

- Beier W (1968) Beeinflußung der inneren Uhr durch Phasenverschiebung des Licht-Dunkel-Zeitgebers. *Zeitschrift für Bienenforschung* 9: 356-378
- Bellingham J, Whitmore D, Philp AR, Wells DJ & Foster RG (2002) Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position. *Brain Research – Molecular Brain Research* 107 (2), 128-136
- Benard J & Giurfa M (2008) The cognitive implications of asymmetric color generalization in honeybees. *Animal Cognition* 11 (2): 283-293
- Ben-Shahar Y, Leung HT, Pak WL, Sokolowski MB & Robinson GE (2003) cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. *The Journal of Experimental Biology* 206: 2507-2515
- 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. *The EMBO Journal* 16 (7): 1600-1609
- Bernard GD & Wehner R (1980) Intracellular optical physiology of the bee's eye. I. Spectral sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 137: 193-203
- Beye M, Härtel S, Hagen A, Hasselmann M & Omholt SW (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molecular Biology* 11 (6): 527-532
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A & Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees. *Journal of Comparative Psychology* 97: 107-119
- Bloch G, Solomon SM, Robinson GE & Fahrbach SE (2003) Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis mellifera*): Age- and time-related plasticity. *Journal of Comparative Neurology* 464: 269–284
- Bloch G, Rubinstein CD & Robinson GE (2004) *period* expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (9): 879-891
- Brandenburg J, Bobbert AC & Eggelmeyer F (1983) Circadian changes in the responses of the rabbit's retina to flashes. *Behavioural Brain Research* 7 (1): 113-123
- Brembs B & Heisenberg M (2000) The operant and the classical in conditioned orientation in *Drosophila melanogaster* at the flight simulator. *Learning and Memory* 7: 104-115
- Bridges CDB, Fong SL, Liou GI, Alvarez RA & Landers RA (1983) Transport, utilization and metabolism of visual cycle retinoids in the retina and pigment epithelium. *Progress in Retinal Research* 2: 137-162
- Briscoe A (2001) Functional diversification of lepidopteran opsins following gene duplication. *Molecular Biology and Evolution* 18 (12): 2270-2279
- Briscoe A & Chittka L (2001) The evolution of colour vision in insects. *Annual Review in Entomology* 46: 471-510

- Brummelkamp TR, Bernards R & Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296 (5567): 550-553
- Bryceson KP (1986) Diurnal changes in photoreceptor sensitivity in a reflecting superposition eye. *Journal of Comparative Physiology A* 158: 573-582
- Burg MG, Sarthy PV, Koliantz G & Pak WL (1993) Genetic and molecular identification of a *Drosophila* histidine decarboxylase gene required in photoreceptor transmitter synthesis. *The EMBO Journal* 12: 911-919
- Buzsáki G (2004) Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nature Neuroscience* 7: 446-451
- Cahill GM & Besharse JC (1995) Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. *Progress in Retinal and Eye Research* 14 (1): 267-291
- Campbell M, Kiang AS, Kenna PF, Kerskens C, Blau C, O'Dwyer L, Tivnan A, Kelly JA, Brankin B, Farrar GJ, Humphries P (2008) RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *The Journal of Gene Medicine* 10: 930-947
- Caplen NJ, Fleenor J, Fire A & Morgan RA (2000) dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 525 (1-2): 95-105
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A & Morgan RA (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate system. *PNAS* 98 (17): 9742-9747
- Carrington E, Kokay IC, Duthie J, Lewis R & Mercer AR (2007) Manipulating the light/dark cycle: effects of dopamine levels in optic lobes of the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Comparative Physiology A* 193: 167-180
- Cerutti H & Casas-Mellano JA (2006) On the origin and function of RNAi-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics* 50 (2): 81-99
- Chang BS, Ayers D, Smith WC & Pierce NE (1996) Cloning of the gene encoding honeybee long-wavelength rhodopsin: a new class of insect visual pigments. *Gene* 173 (2): 215-219
- Chang HW & Lee HJ (2001) Inconsistency in the expression of locomotor and ERG circadian rhythms in the german cockroach, *Blattella germanica* L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 155-166
- Chen B, Meinertzhagen IA & Shaw SR (1999) Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *Journal of Comparative Physiology A* 185: 393-404
- Cheng Y & Hardin PE (1998) *Drosophila* photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without *period* mRNA cycling. *The Journal of Neuroscience* 18 (2): 741-750
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162 (1): 156-159

- Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N & Young MW (2001) Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32 (4): 657-671
- Colley N, Cassill JA, Baker EK & Zuker CS (1995) Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degradation. *PNAS* 92: 3070-3074
- Crailsheim K, Hrassnigg N & Stabentheiner A (1996) Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). *Apidologie* 27: 235-244
- Cuttle MF, Hevers W, Laughlin SB & Hardie RC (1995) Diurnal modulation of photoreceptor potassium conductance in the locust. *Journal of Comparative Physiology* 176: 307-316
- Daumer K (1956) Reizmetrische Untersuchung des Farbensehens der Bienen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 38: 413-478
- Daumer K (1958) Blumenfarben wie sie die Bienen sehen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 41: 49-110
- Dong Y & Friedrich M (2005) Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology* 5/25
- Douglass JK & Strausfeld NJ (2003) Anatomical organization of retinotopic motion-sensitive pathways in the optic lobes of flies. *Microscopy Research and Technique* 62: 132-150
- Dyer AG & Chittka L (2004) Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften* 91 (5): 224-227
- Dyer AG & Neumeyer C (2005) Simultaneous and successive colour discrimination in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A* 191 (6): 547-557
- Ehmer B & Gronenberg W (2002) Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (*Apis mellifera*). *The Journal of Comparative Neurology* 451: 362-373
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschel T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836): 494-498
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC & Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669-679
- Ernst R & Heisenberg M (1999) The memory template in *Drosophila* pattern vision at the flight simulator. *Vision Research* 39: 3920-3933
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H & Smith BH (2003) Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *The Journal of Neuroscience* 23 (12): 5370-5380
- Farooqui T, Vaessin H & Smith BH (2004) Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *Journal of Insect Physiology* 50: 701-713

- Feinberg SH & Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301 (5639): 1545-1547
- Fire A (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* 15 (9): 358-363
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811
- Fleissner G (1982) Isolation of an insect circadian clock. *Journal of Comparative Physiology A* 149: 311-316
- Fleissner G & Fleissner G (1988) Efferent control of visual sensitivity in arthropod eyes: with emphasis on circadian rhythms. In: Lindauer M (ed.): *Information processing in animals*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 15-67
- Franz K (2006) *Physiologische Grundlagen der Arbeitsteilung bei der Honigbiene (Apis mellifera L.)*. Dissertation, TU Berlin
- Frisch K v (1914) Der Farben- und Formensinn der Bienen. *Zoologisches Jahrbuch Abteilung allgemeine Zoologie und Physiologie* 35: 1-188
- Frisch K v (1919) Über den Geruchssinn der Biene und seine blütenbiologische Bedeutung. *Zoologisches Jahrbuch Abteilung allgemeine Zoologie und Physiologie* 37: 1-225
- Fritz JH, Girardin SE & Philpott DJ (2006) Innate immune defense through RNA interference. *Science* 311: 1531-1536
- Fuchikawa T & Shimizu I (2007) Effects of temperature on circadian rhythm in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *Journal of Insect Physiology* 53 (11): 1179-1187
- Gärtner W (2000) Invertebrate visual pigments. In: Stavenga DG, DeGrip WJ & Pugh EN Jr (eds): *Handbook of Biological Physics 3: Molecular mechanisms in visual transduction*. Elsevier: 297-388
- Galizia CG & Menzel R (2000) Odour perception in honeybees: coding informations in glomerular patterns. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 504-510
- Galizia CG, Joerges J, Küttner A, Faber T & Menzel R (1997) A semi-in-vivo preparation for optical recording of the insect brain. *Journal of Neuroscience Methods* 76 (1): 61-69
- Gaus C, Casaretto M & Kass L (1997) The effect of neuropeptides from *Limulus* on its circadian rhythm in retinal sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 180: 137-142
- Gebauer F & Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 827-835
- Gerber B & Smith B (1998) Visual modulation of olfactory learning in honeybees. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2213-2217
- Ghirlanda S & Enquist M (2003) A century of generalization. *Animal Behaviour* 66 (1): 15-36

- Gibbs SM, Becker A, Hardy RW & Truman JW (2001) Soluble Guanylate Cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 21 (19): 7705-7714
- Giebultowicz JM (2000) Molecular mechanism and cellular distribution of insect molecular clocks. *Annual Review of Entomology* 45: 769-793
- Giger AD & Srinivasan MV (1996) Pattern recognition in honeybees: chromatic properties of orientation analysis. *Journal of Comparative Physiology A* 178: 763-769
- Giger AD & Srinivasan MV (1997) Honeybee vision: analysis of orientation and colour in the lateral, dorsal and ventral fields of view. *The Journal of Experimental Biology* 200: 1271-1280
- Giurfa M (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 91 (5): 228-231
- Giurfa M & Malun D (2004) Associative mechanosensory conditioning of the proboscis extension reflex in honeybees. *Learning and Memory* 11: 294-302
- Giurfa M & Menzel R (2003) Cognitive architecture in a mini-brain. In: Kühn R, Menzel R, Menzel W, Ratsch U, Richter MM & Stamatescu IO (eds.): *Adaptivity and Learning. An Interdisciplinary debate*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 23-48
- Giurfa M & Vorobyev M (1998) The angular range of achromatic target detection by honey bees. *Journal of Comparative Physiology A* 183: 101-110
- Giurfa M, Vorobyev M, Kevan P & Menzel (1996) Detection of coloured stimuli by honeybees: minimum visual angles and receptor specific contrasts. *Journal of Comparative Physiology A* 178: 699-709
- Giurfa M, Vorobyev M, Brandt R, Posner B & Menzel R (1997) Discrimination of coloured stimuli by honeybees: alternative use of achromatic and chromatic signals. *Journal of Comparative Physiology A* 180: 235-243
- Giurfa M, Hammer M, Stach S, Stollhoff N, Müller-Deisig N & Mizyrycki C (1999a) Pattern learning by honeybees: conditioning procedure and recognition strategy. *Animal Behaviour* 57: 315-324
- Giurfa M, Zaccardi G & Vorobyev M (1999b) How bees detect coloured targets using different regions of their compound eyes. *Journal of Comparative Physiology A* 185: 591-600
- Gleadow IG, Hariyama T & Tsukahara Y (1989) The visual pigment chromophores in the retina of insect compound eyes, with special reference to the Coleoptera. *Journal of Insect Physiology* 35: 787-795
- Goldsmith TH (1960) The nature of the retinal action potential, and the spectral sensitivities of ultraviolet and green receptor systems of the compound eye of the worker honeybee. *The Journal of General Physiology* 43: 775-799
- Gorbatyuk MS, Pang JJ, Thomas J Jr, Hauswirth WW & Lewin AS (2005) Knockdown of wild-type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach. *Molecular Vision* 11: 648-656

- Gorbatyuk MS, Justilien V, Liu J, Hauswirth WW & Lewin AS (2007) Suppression of mouse rhodopsin expression *in vivo* by AAV mediated siRNA delivery. *Vision Research* 47: 1202-1208
- Gribakin FG (1988) Photoreceptor optics in the honeybee and its eye colour mutants: the effect of screening pigments on the long-wavelength subsystem of colour vision. *Journal of Comparative Physiology A* 164: 123-140
- Griffin EA, Staknis D & Weitz CJ (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286: 768–771
- Grimm D & Kay DA (2007) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *The Journal of Clinical Investigation* 117 (12): 3633-3641
- Gronenberg W (1986) Physiological and anatomical properties of optical input-fibres to the mushroom body in the bee brain. *Journal of Insect Physiology* 32 (8): 695-704
- Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC & Giurfa M (1995) Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *Plos Biology* 2 (4): e60
- Guttman N & Kalish H (1965) Discriminability and stimulus generalization. *Journal of Experimental Psychology* 51: 79-88
- Hafner GS & Tokarski TR (1988) The diurnal pattern of protein and photopigment synthesis in the retina of the crayfish, *Procambarus clarkia*. *Journal of Comparative Physiology A* 163: 253-258
- Hagins FM (1973) Purification and partial characterization of the protein component of squid rhodopsin. *The Journal of Biological Chemistry* 248 (9): 3298-3304
- Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T & Gerber AP (2008) Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 798-813
- Halstenberg S, Lindgren KM, Samagh SPS, Nadal-Vicens M, Balt S & Fernald RD (2005) Diurnal rhythm of cone opsin expression in the teleost fish *Haplochromis burtoni*. *Visual Neuroscience* 22: 135-141
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251
- Hamdorf K & Razmjoo S (1977) The prolonged depolarizing afterpotential and its contribution to the understanding of photoreceptor function. *European Biophysics Journal* 3 (2): 163-170
- Hamdorf K & Schwemer J (1975) Photoregeneration and the adaptation process in insect photoreceptors. In: Snyder W & Menzel R (eds): *Photoreceptor optics*. Springer Berlin, Heidelberg, New York: 263-289
- Hammer M (1993) An identified interneuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63
- Hammer M & Menzel R (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning and Memory* 5: 146-156

- Hammond SM (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* 579 (26): 5822-5829
- Hardie RC (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 204: 3403-3409
- Hartman SJ, Menon I, Haug-Collet K & Colley NJ (2001) Expression of rhodopsin and arrestin during the light-dark cycle in *Drosophila*. *Molecular Vision* 7: 95-100
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM & Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070
- Hauptenthal J, Baehr C, Kiermayer S, Zeuzem S & Piiper A (2006) Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNA in serum. *Biochemical Pharmacology* 71 (5): 702-710
- Heisenberg M (1971) Separation of receptor and lamina potentials in the Electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology* 55: 85-100
- Helfrich-Förster C (2004) The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *Journal of Comparative Physiology A* 190: 601-613
- Helfrich-Förster C (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes, Brain, and Behavior* 4 (2): 65-76
- Helfrich-Förster C, Stengl M & Homberg U (1998) Organization of the circadian system in insects. *Chronobiology International* 15: 567-594
- von Helversen O (1972) Zur spektralen Unterschiedsempfindlichkeit der Honigbiene. *Journal of Comparative Physiology* 80: 439-472
- von Helversen O & Edrich W (1974) Der Polarisationsempfänger im Bienenauge: ein Ultraviolettzeptor. *Journal of Comparative Physiology* 94: 33-47
- Hempel de Ibarra N & Giurfa M (2003) Discrimination of closed coloured shapes by honeybees requires only contrast to the long wavelength receptor type. *Animal Behaviour* 66: 903-910
- Hempel de Ibarra N, Vorobyev M, Brandt R & Giurfa M (2000) Detection of bright and dim colours by honeybees. *The Journal of Experimental Biology* 203: 3289-3298
- Hempel de Ibarra N, Giurfa M & Vorobyev M (2001) Detection of coloured patterns by honeybees through chromatic and achromatic cues. *Journal of Comparative Physiology A* 187: 215-224
- Hertel H (1980) Chromatic properties of identified interneurons in the optic lobes of the bee. *Journal of Comparative Physiology* 137:215-231
- Hertel H (1983) Change of synapse frequency in certain photoreceptors of the honeybee after chromatic deprivation. *Journal of Comparative Physiology* 151: 477-482

- Hertel H & Maronde U (1987) The physiology and morphology of centrally projecting visual interneurons in the honeybee brain. *The Journal of Experimental Biology* 133: 301-315
- Homberg U (2004) In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91: 199-208
- Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443 (7114): 931-949
- Honig WK & Urcuioli PJ (1981) The legacy of Guttman and Kalish (1965): 25 years of research on stimulus generalization. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 36: 404-445
- Hori S, Takeuchi H, Arikawa K, Kinoshita M, Ichikawa N, Sasaki M & Kubo T (2006) Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* 192: 691-700
- Horridge GA, Duniec J & Marcelja L (1981) A 24-hour cycle in single locust and mantis photoreceptors. *The Journal of Experimental Biology* 91: 307-322
- Huppi K, Martin SE & Caplen NJ (2005) Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Molecular Cell* 17 (1): 1-10
- Ilse D (1928) Über den Farbensinn der Tagfalter. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 8 (3-4): 658-692
- Kaiser W (1983) Effects of non-visual and circadian inputs to visual interneurons in the honey bee. In: Horn E (ed.): *Multimodal convergences in sensory systems (Fortschritte der Zoologie Bd. 28)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 149-166
- Kaiser W & Liske E (1974) Die optomotorischen Reaktionen von fixiert fliegenden Bienen bei Reizung mit Spektrallichtern. *Journal of Comparative Physiology A* 89: 391-408
- Kalish H (1958) The relationship between discriminability and generalization: a re-evaluation. *Journal of Experimental Psychology* 55: 637-644
- 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 Letters* 424: 149-154
- Kelber A, Vorobyev M & Osorio D (2003) Animal colour vision – behavioural tests and physiological concepts. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 78: 81-118
- Kieffer C, Sumser E, Wernet MF & Lintig J v (2002) A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *PNAS* 99: 10581-10586
- Kien J & Menzel R (1977a) Chromatic properties of interneurons in the optic lobe of the bee – I Broad band neurons. *Journal of Comparative Physiology* 113: 17-34

- Kien J & Menzel R (1977b) Chromatic properties of interneurons in the optic lobe of the bee – II Narrow band and colour opponent neurons. *Journal of Comparative Physiology* 113: 35-53
- Kim DH & Rossi JJ (2007): Strategies for silencing human disease using RNA Interference. *Nature Reviews Genetics* 8 (3): 173-184
- Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S & Rossi JJ (2005): Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology* 23 (2): 222-226
- Kirschfeld K & Franceschini N (1969) Ein Mechanismus zur Steuerung des Lichtflusses in den Rhabdomeren des Komplexauges von *Musca*. *Kybernetik* 6: 13-22
- Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M & Takakura Y (2003) Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308 (2): 688-693
- Kochendoerfer GG, Lin SW, Sakmar TP & Mathies RA (1999) How color visual pigments are tuned. *Trends in biochemical sciences* 24 (8): 300-305
- Kolb G & Autrum H (1972) Die Feinstruktur im Auge der Biene bei Hell- und Dunkeladaptation. *Journal of Comparative Physiology* 77: 113-125
- Kolb G & Autrum H (1974) Selektive Adaptation und Pigmentwanderung in den Sehzellen des Bienenauges. *Journal of Comparative Physiology* 94: 1-6
- Korenbrodt JI & Fernald RD (1989) Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature* 337: 454-457
- Kornell N & Terrace HS (2007) The generation effect in monkeys. *Psychological Sciences* 18: 682-685
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J & Eckert M (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology* 348: 583-595
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S & Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319: 1827-1830
- Kurada P, Tonini TD, Serikaku MA, Piccini JP & O'Tousa JE (1998) Rhodopsin maturation antagonized by dominant rhodopsin mutants. *Visual Neuroscience* 15: 693-700
- Kuwabara M (1957): Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifica*. *Journal of the Faculty of Sciences at Hokkaido University Ser VI Zoology* 13: 458-464
- Labhart T (1980) Specialized photoreceptors at the dorsal rim of the honeybee's compound eye: polarizational and angular sensitivity. *Journal of Comparative Physiology* 141: 19-30
- Lämmler UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685

- Lamb TD & Pugh EN (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Progresses in Retinal and Eye Research* 23 (3): 307-380
- Land MF (1997) The resolution of insect compound eyes. *Israel Journal of Plant Science* 45: 79–91
- Land MF & Nilsson DE (2002) *Animal Eyes*. Oxford University Press, Oxford New York
- Larivee D, Conrad SK, Stephenson RS & Pak WL (1981) Mutation that selectively affects rhodopsin concentration in the peripheral photoreceptors of *Drosophila melanogaster*. *Journal of General Physiology* 78: 521-545
- Lee RC & Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543): 862-864
- Lehrer M (1993) Parallel processing of motion, shape and colour in the visual system of the bee. In: Wiese K, Gribakin FG, Popov AV & Renninger G (eds): *Sensory Systems of Arthropods*. Birkhäuser Basel: 266-272
- Lehrer M (1994) Spatial vision in the honeybee: the use of different cues in different tasks. *Vision Research* 34 (18): 2363-2385
- Lehrer M & Bischof S (1995) Detection of model flowers by honeybees: the role of chromatic and achromatic contrast. *Naturwissenschaften* 82: 145-147
- Lehrer M, Srinivasan MV, Zhang SW & Horridge GA (1988): Motion cues provide the bee's visual world with a third dimension. *Nature* 332: 356-357
- Leung RKM & Whittaker PA (2005) RNA Interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* 107:222-239
- Lippman Z & Martienssen R (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431: 364-370
- Lu J, Zoran MJ & Cassone VM (1995) Daily and circadian variation in the electroretinogram of the domestic fowl: effects of melatonin. *Journal of Comparative Physiology A* 177: 299-306
- Lu PY & Woodle MC (2008) Delivering small interfering RNA for novel therapeutics. *Methods in Molecular Biology* 437: 93-107
- Ma Y, Creanga A, Lum L & Beachy PA (2006) Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature* 443: 359-363
- Maleszka J, Foret S, Saint R & Maleszka R (2007) RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development genes and evolution* 217 (3): 189-196
- Maronde U (1991) Common projection areas of antennal and visual pathways in the honeybee brain, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology* 309: 328-340
- Masuhr T & Menzel (1972) Learning experiments on the use of side-specific information in the olfactory and visual system in the honey bee (*Apis mellifica*). In: Wehner R (ed.): *Information processing in the Visual System of Arthropods*. Springer Berlin Heidelberg New York: 315-322.

- Mauelshagen J & Greggers U (1993) Experimental access to associative learning in honeybees. *Apidologie* 24: 249-266
- Max M, McKinnon PJ, Seidenman KJ, Barrett RK, Applebury ML, Takahashi JS & RF Margolskee (1995) Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. *Science* 267 (5203): 1502-1506
- McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J & Sharp PE (2002) Small Interfering RNA mediated silencing in T-Cells. *The Journal of Immunology* 169: 5754-5760
- Meinertzhagen IA & Pyza E (1999) Neurotransmitter regulation of circadian structural changes in the fly's visual system. *Microscopy Research and Technique* 45: 96-105
- Meister G & Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-49
- Menzel R (1968) Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben. I. Kurzzeitiges und langzeitiges Behalten. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 60: 82-102
- Menzel R (1971) Über den Farbensinn von *Paravespula germanica* F. (Hymenoptera): ERG und selektive Adaptation. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 75: 86-104
- Menzel R (1974) Spectral sensitivity of monopolar cells in the bee lamina. *Journal of Comparative Physiology* 93: 337-346
- Menzel R (1979) Spectral Sensitivity and Color Vision in Invertebrates. In: Autrum H (ed): *Comparative physiology and evolution of vision in Invertebrates (Handbook of sensory physiology, Vol.VII/6A)*. Springer, Berlin: 503-580
- Menzel R (1999) Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* 185: 323-340
- Menzel R (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learning and Memory* 8: 53-62
- Menzel R & Backhaus W (1991) Colour vision in insects. In: Gouras P (ed.): *Vision and visual dysfunction: The perception of colour*. Macmillan Press, London: 262-288
- Menzel R & Blakers M (1976) Colour receptors in the bee eye – morphology and spectral sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 108: 11-33
- Menzel R & Erber J (1972) The influence of the quantity of reward on the learning performance in honeybees. *Behaviour* 41: 27-42
- Menzel R & Greggers U (1985) Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A* 157: 311-321
- Menzel R & Lange G (1971) Änderungen in der Feinstruktur im Komplexauge von *Formica polyctena* bei der Helladaptation. *Zeitschrift für Naturforschung* 26b (4): 357-359
- Menzel R & Müller U (1996) Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual Review of Neuroscience* 19: 379-404

- Menzel R & Snyder AW (1974) Polarised light detection in the bee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology* 88: 247-270
- Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B & Fiala A (1999) Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behavioral Neuroscience* 113 (4): 744-754
- Menzel R, Manz G, Menzel R & Greggers U (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. *Learning & Memory* 8: 198-208
- Menzi U (1987) Visual adaptation in nocturnal and diurnal ants. *Journal of Comparative Physiology A* 160: 11-21
- Milde JJ (1985) Circadian change of compound eye sensitivity is not governed by the ocelli in honeybees. *Experimental Biology* 44: 241-245
- Mobbs PG (1985) Brain Structure. In: Kerkut GA & Gilbert LI (eds): *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* Vol. 5. Pergamon New York: 299-370
- Moore D (2001) Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *Journal of Insect Physiology* 47: 843-857
- Moore D & Rankin MA (1993) Light and temperature entrainment of a locomotor rhythm in honeybees. *Physiological Entomology* 18 (3): 271-278
- Morante J & Desplan C (2004) Building a projection map for photoreceptor neurons in the *Drosophila* optic lobes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 137-143
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk K, Page RE Jr. & Amdam GV (2007) The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5 (3): e62
- Niggebrügge C & Hempel de Ibarra N (2003) Colour-dependent target detection by bees. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 915-918
- Oates AC, Bruce AEE & Ho RK (2000) Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Developmental Biology* 224: 20-28
- Ozaki K, Nagatani H, Ozaki M & Tokunaga F (1993) Maturation of *Drosophila* major rhodopsin, ninaE, requires chromophore 3-hydroxyretinal. *Neuron* 10: 1113-1119
- Paulk AC, Philips-Portillo J, Dacks AM, Fellous JM & Gronenberg W (2008) The processing of colour, motion, and stimulus timing are anatomically segregated in the bumblebee brain. *The Journal of Neuroscience* 28 (25): 6319-6332
- Paulsen R & Schwemer J (1983) Biogenesis of blowfly photoreceptor membranes is regulated by 11-cis-retinal. *European Journal of Biochemistry* 137 (3): 609-614
- Pavlov I (1927) *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, Oxford

- Peitsch D, Fietz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF & Menzel R (1992) The spectral input system of hymenopterans and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A* 170 (1): 23-40
- Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber HL & Bedford JS (2002) Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Research* 62: 6400-6404
- Perrelet A (1972) Protein synthesis in the visual cells of the honeybee drone as studied with electron microscope radioautography. *The Journal of Cell Biology* 55: 595-605
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45
- Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9): e36
- Pierce ME, Sheshberadaran H, Zhang Z, Fox LE, Applebury ML & Takahashi J (1993) Circadian regulation of iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in cell culture. *Neuron* 10: 579-584
- Pillai RS, Bhattacharyya SN & Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 17: 118-126
- Pizzo E & D'Alessio G (2007) The success of the RNase scaffold in the advance of biosciences and in evolution. *Gene* 406 (1-2): 8-12
- Plachetzki DC, Degnan BM & Oakley TH (2007) The origins of novel protein interactions during animal opsin evolution. *PLoS One* 2 (10): e1054
- Plasterk RHA (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296: 1263-1265
- Pyza E & Górska-Andrzejak J (2008) External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 68: 322-333
- Rehm H (2000) Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin
- Ren JQ & Li L (2004) A circadian clock regulates the process of ERG b- and d-wave dominance transition in dark-adapted zebrafish. *Vision Research* 44 (18): 2147-2152
- Ribi W (1974) Neurons of the first synaptic region of the bee, *Apis mellifera*. *Cell and Tissue Research* 148: 277-286
- Ribi W (1975) The first optic ganglion of the bee. I. Correlation between visual cell types and their terminals in the lamina and medulla. *Cell and Tissue Research* 165: 103-111
- Ribi W & Scheel M (1981) The second and third optic ganglia of the worker bee. *Cell and Tissue Research* 221: 17-43
- Riehle A (1981) Color opponent neurons of the honeybee in a hetero-chromatic flicker test. *Journal of Comparative Physiology* 142: 81-88

- Rößler R (2006) Charakterisierung der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors der Honigbiene (*Apis mellifera*) und Evaluierung der Rezeptor-Down-Regulierung durch RNA Interferenz. Diplomarbeit, FU Berlin
- Rosato E, Tauber E & Kyriacou CP (2006) Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *European Journal of Human Genetics* 14 (6): 729-738
- Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM & Bloch G (2006) Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Research* 16: 1352-1365
- Rybak J (1994) Die strukturelle Organisation der Pilzkörper und synaptische Konnektivität protocerebraler Interneuronen im Gehirn der Honigbiene, *Apis mellifera*. Eine licht- und elektronenmikroskopische Studie. PhD Dissertation, Freie Universität Berlin
- Rybak J, Gardow S, Drenske D, Boettger K & Menzel R (2007) Proboscis extension response induced by tarsal sucrose stimulation in the honeybee *Apis mellifera*. 8th International Congress of Neuroethology, Vancouver, Canada
- Sachs L (1992) *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin, Heidelberg, NY
- Saifullah SM & Tomioka K (2002) Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *The Journal of Experimental Biology* 205: 1305-1314
- Sakura M, Takasuga K, Watanabe M & Eguchi E (2003) Diurnal and circadian rhythm in compound eye of cricket (*Gryllus bimaculatus*): changes in structure and photon capture efficiency. *Zoological Science* 20: 833-840
- Sandoz JC & Pham-Delegue MH (2004) Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the honeybee. *Learning and Memory* 11: 586-597
- Sasagawa H, Narita R, Kitagawa Y & Kadowaki T (2003) The expression of genes encoding visual components is regulated by a circadian clock, light environment and age in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Neuroscience* 17 (5): 963-970
- von Schantz M, Lucas RJ & Foster RG (1999) Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Molecular Brain Research* 72 (1): 108-114
- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ & Jacobs FJ (2008) Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science* 8, article 33
- Schlüns H & Crozier RH (2007) Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology* 16 (6): 753-759
- Schröter U, Malun D & Menzel R (2007) Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurons in the honeybee brain. *Cell and Tissue Research* 327: 647-667

- Schwemer J (1984) Renewal of visual pigment in photoreceptors of the blowfly. *Journal of Comparative Physiology* 154: 535-547
- Schwemer J (1989) Visual pigments of compound eyes – structure, photochemistry, and regeneration. In: Stavenga DG & Hardie RC (eds.): *Facets of vision*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 112-133
- Schwemer J, Pepe IM, Paulsen R & Cugnoli C (1984) Light-induced trans-cis isomerization of retinal by a protein from honeybee retina. *Journal of Comparative Physiology A* 154: 549-554
- Seeley TD (1995) *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge
- Sehgal A (1995) Molecular genetic analysis of rhythms in vertebrates and invertebrates. *Current opinion in Neurobiology* 5: 824-831
- Seibt U (1967) Der Einfluß der Temperatur auf die Dunkeladaptation von *Apis mellifica*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 57: 77-102
- Seki T, Fujishita S & Obana S (1989) Composition and distribution of retinal and 3-hydroxyretinal in the compound eye of the dragonfly. *Experimental Biology* 48: 65-75
- Seo MY, Abrugani S, Houghton M & Han JH (2003) Small interfering RNA-mediated inhibition of Hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *Journal of Virology* 77 (1): 810-812
- Shaw AP, Collazo CR, Easterling K, Young CD & Karwoski CJ (1993) Circadian rhythm in the visual system of the lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Biological Rhythms* 8 (2): 107-124
- Shaw SR & Varney LP (1999) Primitive, crustacean-like state of blood-brain barrier in the eye of the apterygote insect *Petrobius* (Archaeognatha) determined from uptake of fluorescent tracers. *Journal of Neurobiology* 41 (4): 452-470
- Shemesh Y, Cohen M & Bloch G (2007) Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization of the molecular clockwork in honeybees. *The FASEB Journal* 21: 2304-2311
- Shichida Y & Yamashita T (2003) Diversity of visual pigments from the viewpoint of G protein activation – comparison with other G protein coupled receptors. *Photochemical & photobiological sciences* 2 (12): 1237-1246
- Shu Y & Hong-Hui L (2004) Transcription, translation, degradation, and circadian clock. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321: 1-6
- Shyu AB, Wilkinson MF & Hoof A v (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *The EMBO Journal* 27: 471-481
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RHA & Fire A (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* (107): 465-476
- Skrzipek KH & Skrzipek H (1971) Die Morphologie der Bienenretina (*Apis mellifica* L.) in elektronenmikroskopischer und lichtmikroskopischer Sicht. *Zeitschrift für Zellforschung* 119: 552-576

- Skrzipek KH & Skrzipek H (1974) The ninth retinula cell in the ommatidium of the worker honeybee (*Apis mellifica* L.). *Zeitschrift für Zellforschung* 147: 589-593
- Slamecka NJ & Graf P (1978) The generation effect. Delineation of a phenomenon. *Journal of Human Learning and Memory* 4: 592-604
- Smith WC & Goldsmith TH (1991) The role of retinal photoisomerase in the visual cycle of the honeybee. *Journal of General Physiology* 97: 143-165
- Snyder AW, Menzel R & Laughlin SB (1973) Structure and function of the fused rhabdom. *Journal of Comparative Physiology* 87: 99-135
- Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N, Shankar P (2003) Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *Journal of Virology* 77(13): 7174-81
- de Souza J, Hertel H, Ventura DF & Menzel R (1992) Response properties of stained monopolar cells in the honeybee lamina. *Journal of Comparative Physiology A* 170: 267-274
- Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N & Shankar P (2003) Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *Journal of Virology* 77 (13): 7174-7181
- Sontheimer EJ (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 127-138
- Stavenga DG & Kuiper JW (1977) Insect pupil mechanisms. I. On the pigment migration in the retinula cells of Hymenoptera (suborder: Apocrita). *Journal of Comparative Physiology A* 113: 55-72
- Stein PJ, Brammer JD & Ostroy SE (1979) Renewal of opsin in the photoreceptor cells of the mosquito. *Journal of General Physiology* 74 (5): 565-582
- Straussfeld NJ (1971a) The organization of the insect visual system (light microscopy). I. Projections and arrangements of neurons in the Lamina ganglionaris of Diptera. *Zeitschrift für Zellforschung* 121: 377-441
- Straussfeld NJ (1971b) The organization of the insect visual system (light microscopy). II. The projection of fibres across the first optic chiasma. *Zeitschrift für Zellforschung* 121: 442-454
- Su CY, Luo DG, Terakita A, Shichida Y, Liao HW, Kazmi MA, Sakmar TP & Yau KW (2006) Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* 311 (5767): 1617-1621
- Takeda K (1961) Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology* 6: 168-179
- Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biology* 6 (3): e213
- Terakita A, Koyanagi M, Tsukamoto H, Yamashita T, Miyata T & Shichida Y (2004) Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (3): 284-289

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882
- Timmons L, Court DC & Fire A (2001) Expression of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263 (1-2): 103-112
- Toma DP, Bloch G, Moore D & Robinson GE (2000) Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labour in honey bee colonies. *PNAS* 97 (12): 6914-6919
- Tomioka K & Chiba Y (1982) Persistence of circadian ERG rhythm in the cricket with optic tract severed. *Naturwissenschaften* 69: 395-396
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D & Bucher G (2008) Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology* 9 (1): R10
- Townson SM, Chang BS, 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 (7): 2412-2422
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP & Newcomb RD (2006) RNA Interference in the light brown apple moth *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 15 (3): 383-391
- Varela FG & Porter KR (1969) Fine structure of the visual system of the honeybee (*Apis mellifera*). I The retina. *Journal of Ultrastructural Research* 29: 236-259
- Vareschi E (1971) Duftunterscheidung bei der Honigbiene: Einzelzelleitung und Verhaltensreaktionen. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 75: 143-173
- Velarde RA, Sauer CD, Walden KKO, Fahrbach SE & Robertson HM (2005) Pteropsin: a vertebrate-like non-visual opsin expressed in the honey bee brain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1367-1377
- Ventura DF, Martinoya C, Bloch S & Puglia NM (1976) Visual sensitivity and the state of adaptation in the ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicoidea). *Journal of Comparative Physiology A* 110: 333-342
- Vienne A, Shiina T, Abi-Rached L, Danchin E, Vitiello V, Cartault F, Inoko H & Pontarotti P (2003) Evolution of the proto-MHC ancestral region: more evidence for the plesiomorphic organisation of human chromosome 9q34 region. *Immunogenetics* (55): 429-436
- Vorobyev M (1997) Costs and benefits of increasing the dimensionality of colour vision system. In: Tadei-Ferretti C (ed.): *Biophysics of Photoreception: Molecular and Phototransductive Events*. World Scientific, Singapore: 280-289
- Vorobyev M & Brandt R (1997) How do insect pollinators discriminate colors? *Israel Journal of Plant Science* 45: 103-113

- Vorobyev M & Menzel R (1999) Flower advertisement for insects. In: Archer S & Partridge J (eds.): Adaptive mechanisms in the ecology of vision. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL: 537-553
- Vorobyev M, Brandt R, Peitsch D, Laughlin SB & Menzel R (2001) Colour thresholds and receptor noise: behaviour and physiology compared. *Vision Research* 41: 639-653
- Wakakuwa M, Kurasawa M, Giurfa M & Arikawa K (2005) Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften* 92 (10): 464-467
- Wehner R & Rosell S (1985): The bee's celestial compass – a case study in behavioural neurobiology. In: Hölldobler B & Lindauer M (eds): *Experimental Behavioral Ecology*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York: 11-53
- Williams BR (1997) Role of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochemical Society Transactions* 25: 509-513
- Wright GA, Kottcamp SM & Thomson MGA (2008) Generalization mediates sensitivity to complex odor features in the honeybee. *Plos One* 3 (2): e1704
- Wu TH, Ding TD, Okajima TIL, Pepperberg DR, Ho YK, Ripps H & Naash MI (1998) Opsin localization and rhodopsin photochemistry in transgenic mouse model of retinis pigmentosa. *Neuroscience* 87 (3): 709-717
- Wunderer HJ, Picaud S & Franceschini N (1989) Selective illumination of single photoreceptors in the house fly retina: local membrane turnover and uptake of extracellular horseradish peroxidase (HRP) and Lucifer Yellow. *Cell and Tissue Research* 257: 565-576
- Wyder S, Kriventseva EV, Schröder R, Kadowaki T & Zdobonov EM (2007) Quantification of ortholog losses in insects and vertebrates. *Genome Biology* 8 (11): R242
- Wyzecki G & Stiles WS (1982) *Color science: concepts and methods, quantitative data and formula*. Wiley, NY
- Yamaguchi S, Wolf R, Desplan C & Heisenberg M (2008) Motion vision is independent of color in *Drosophila*. *PNAS* 105 (12): 4910-4915
- Yang EC, Lin HC & Hung YS (2004) Patterns of chromatic information processing in the lobula of the honeybee, *Apis mellifera* L.. *Journal of Insect Physiology* 50 (10): 913-925
- Yarfitz S & Hurley JB (1994) Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14329-14332
- Yuan Q, Metterville D, Briscoe A & Reppert SM (2007) Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clock. *Molecular Biology and Evolution* 24 (4): 948-955
- Zhang X, McNeil GP, Hilderbrand-Chae MJ, Franklin TM, Schroeder AJ & Jackson FR (2000) Circadian regulation of the lark RNA-binding protein within identifiable neurosecretory cells. *Journal of Neurobiology* 45 (1): 14-29

ABKÜRZUNGEN

bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CS	Konditionierter Stimulus
CS-	unbelohnter konditionierter Stimulus
CS+	belohnter konditionierter Stimulus
Ct	Threshold Cycle (Zyklus, bei dem ein definierter Fluoreszenzwert in der Real Time PCR überschritten wird)
dsCAT	doppelsträngige RNA mit Sequenz für CAT
dsLWOP	doppelsträngige RNA mit Sequenz für LWOP
dsRNA	doppelsträngige RNA
ERG	Elektroretinogram
ITI	<u>I</u> nter <u>T</u> rial <u>I</u> nterval (Zeit zwischen CS-Präsentationen während der klassischen Konditionierung)
LD	Licht-Dunkel-Kondition
L-Rezeptor	für langwelliges Licht empfindlicher Photorezeptor
LW	lange Wellenlängen (für Menschen grünes Spektrum des Lichts)
LWOP	Opsin des für langwelliges Licht empfindlichen Rezeptors
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER	<u>P</u> roboscis <u>E</u> xtension <u>R</u> esponse, Ausstrecken der Proboscis
RNAi	RNA Interferenz
RNQ	Receptor Noise Limited Model (Modell zur Farbwahrnehmung)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl <u>s</u> ulfat- <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> ele <u>l</u> ektrophorese
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
US	Unkonditionierter Stimulus

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.01	cDNA-Sequenz zur Herstellung doppelsträngiger RNA	24
2.02	Ethidium-Bromid-Agarosegel	28
2.03	Emittiertes Spektrum der drei verwendeten LEDs	40
2.04	Emittierte relative Quantenzahl der drei verwendeten LEDs	41
2.05	Spektrale Reflektion der für die PER-Konditionierung verwendeten Stimuli	45
2.06	Schematische Darstellung der PER-Konditionierung	47
3.01	Anfärbung der optischen Loben mit 3% Alexa Fluor 488 – Dextran	50
3.02	Anfärbung der optischen Loben mit 3% Alexa Fluor 488 – Dextran, Teilausschnitt	50
3.03	In-situ Hybridisierung, antisense Sonde	51
	a) rechte optische Loben, 10fache Vergrößerung	
	b) rechte Retina, 40fache Vergrößerung	
3.04	Sense-Kontrolle der In-situ Hybridisierung	52
3.05	Schmelzkurvenanalyse nach Real Time PCR	53
3.06	Vergleich der relativen Expression von Ziel- und Housekeeping-Genen in Proben von linker und rechter Gehirnhälfte	54
3.07	Übersicht über die relative LW-Opisin mRNA Expression in allen neun Versuchsreihen	55
3.08	Einfluss der injizierten dsRNA-Menge auf die LW-Opisin mRNA Expression	56
3.09	Vorübergehende Wirkung der injizierten dsLWOP-Lösung auf die LW-Opisin mRNA Expression	57
3.10	Relative LW-Opisin mRNA Expression in injizierter (links) und nicht injizierter (rechts) Gehirnhälfte	58
3.11	Einfluss der Denaturierungstemperatur auf die Detektion des LWOP-Proteins im Western Blot	60
3.12	Western Blot nach Auftrennung von Extrakten optischer Loben durch SDS-PAGE und Anfärbung mit Bombus Rh1 Antikörper	60
3.13	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des zur Herstellung des Antikörpers verwendeten Peptids (Bombus_Rh1_AB) mit dem C-Terminus der Sequenzen der Opsine	61
3.14	Verdünnungsreihe für Detektion der Banden durch den Antikörper für Hummel LW-Opisin	62

3.15	Untersuchung der tageszeitlichen Oszillation des LW-Opsins, beispielhafter Western Blot	63
3.16	Relative LW-Opsin-Menge (~40 kDa) in Abhängigkeit von der Tageszeit	64
3.17	Relative LW-Opsin-Menge (~80 kDa) in Abhängigkeit von der Tageszeit	65
3.18	Pilotversuch, relative LW-Opsin Proteinmenge (~40 kDa Banden) in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Injektion mit dsRNA und Präparation	66
3.19	Pilotversuch, relative LW-Opsin Proteinmenge (~80 kDa Banden) in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Injektion mit dsRNA und Präparation	67
3.20	Relative LW-Opsin Proteinmenge 12 Stunden nach Injektion doppelsträngiger RNA in Abhängigkeit vom Tageszeitpunkt der Injektion	67
3.21	Übersichtsbeispiel über ca. 16 Minuten Messung des ERGs	69
3.22	Gemessenen Komponenten des ERGs	70
3.23	Normalisierte Reizantworten von Kontroll- und dsLWOP injizierten Tieren	71
3.24	Normalisierte Reizantworten in Abend- und Morgenmessungen	72
3.25	Normalisierte Reizantworten in Abhängigkeit vom summierten absorbierten Photonenstrom	73
3.26	Verschiedene Formen des ERGs	74
3.27	Normalisierte Verläufe der ERGs	74
3.28	Vergleich der mittleren normalisierten Verläufe zwischen Kontroll- und dsLWOP injizierten Tieren	75
3.29	Vergleich der mittleren normalisierten Verläufe zwischen Abend- und Morgenmessungen	76
3.30	Vergleich der Abends-Morgens-Differenzkurven	77
3.31	On- und Off-Komponenten aller normalisierten Verlaufskurven bei Stimulation mit Grün niedrigster Intensität	79
3.32	Unterschiede in transienten Komponenten zwischen Abend- und Morgen-Messungen für alle drei Beleuchtungsfarben	80
3.33	Mittlerer normalisierter Verlauf der Reizantwort bei grüner Beleuchtung unterschiedlicher Intensität	81
3.34	Kennlinien der sustained-, On- und Off-Komponenten der gemittelten Verlaufskurven bei grüner Beleuchtung	82
3.35	Normalisierte Verlaufskurven der Kontrolltiere (Mittelwerte) für alle Beleuchtungsfarben und –intensitäten	83

3.36	Normalisierte Verlaufskurven der dsLWOP injizierten Tiere (Mittelwerte) für alle Beleuchtungsfarben und –intensitäten	84
3.37	Absolute Konditionierung auf blauen oder gelben Stimulus	86
3.38	Absolute Konditionierung auf dunkelgelben oder gelben Stimulus	88
3.39	Differentielle Konditionierung auf gleichfarbige Stimuli unterschiedlicher Intensität	89
3.40	Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli I	90
3.41	Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli II	91
3.42	Differentielle Konditionierung auf verschiedenfarbige Stimuli III	93
3.43	Gedächtnistest	94
3.44	Extinktionsexperiment	95
4.01	Simulierte normalisierte Reizantworten bei reduziertem L-Rezeptor Photonenstrom im Vergleich mit gemessenen sustained-Antworten der Kontrollgruppe	107

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Randolph Menzel für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das Graduiertenkolleg, die Bereitstellung von Raum und Material, sowie vor allem für seine Offenheit für ein neues Thema, seine Bereitschaft zur Diskussion sowie seine Geduld.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich außerdem Dr. Natalie Hempel de Ibarra und Dr. Gérard Leboulle. Sie haben mich nicht nur in ein mir bis dahin unbekanntes Forschungsgebiet, diverse Methoden und Techniken sowie das Schreiben von wissenschaftlichen Artikeln eingewiesen (und noch viel mehr), sondern mich besonders durch ihre verlässliche Unterstützung und ihren Glauben an das Projekt (und mich) immer wieder motiviert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung durch das Graduiertenkolleg 831 „Functional Insect Science“ unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Walz.

Dr. Adriana Briscoe (University of California, Irvine) hat durch die freundliche Überlassung eines Antikörpers einen wesentlichen Teil der Experimente ermöglicht. Bei Dr. Wilfried Nietfeld (MPI für molekulare Genetik, Berlin) konnte ich zwei Real Time PCR durchführen. Reinhard Rössler hat mich als studentische Hilfskraft bei der Durchführung von In situ Hybridisierungen unterstützt.

Wertvolle Hilfe bei technischen Fragen und der Analyse und Diskussion meiner Daten leisteten Bernhard Komischke, Dorothea Eisenhardt, Marien de Bruyne, Martin Nawrot, Michael Schmucker, Jürgen Rybak, Uwe Greggers und Björn Brembs. Ohne die Arbeit von Peter Knoll und Dedo Koppitz hätte ich meine nicht machen können.

Seit meiner Zeit als studentische Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Neurobiologie haben ganze Generationen von Kollegen eine anregende und freundschaftliche Atmosphäre geschaffen. Es sind zu viele, um sie alle zu nennen; ganz besonders gern erinnere ich mich an wissenschaftliche und nicht ganz so wissenschaftliche Gespräche mit (in chronologischer Reihenfolge) Nico Stollhoff, Philipp Peele, Sabine Kroficzik, Ryuichi Okada, Abid Hussaini, Anja Froese und Melanie Hähnel sowie meinen GRK-Mitstreitern Lars Vollborn, Karoline Franz und Sven Knapinski.

Meiner Familie danke ich für bedingungslose und fortwährende Unterstützung.

Und Tobias dafür, dass alles gut ist und alles gut wird.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten