



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Geschlechtsspezifische Verteilung der Fotorezeptoren im Auge der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* L., 1758 (Apidae, Hymenoptera)

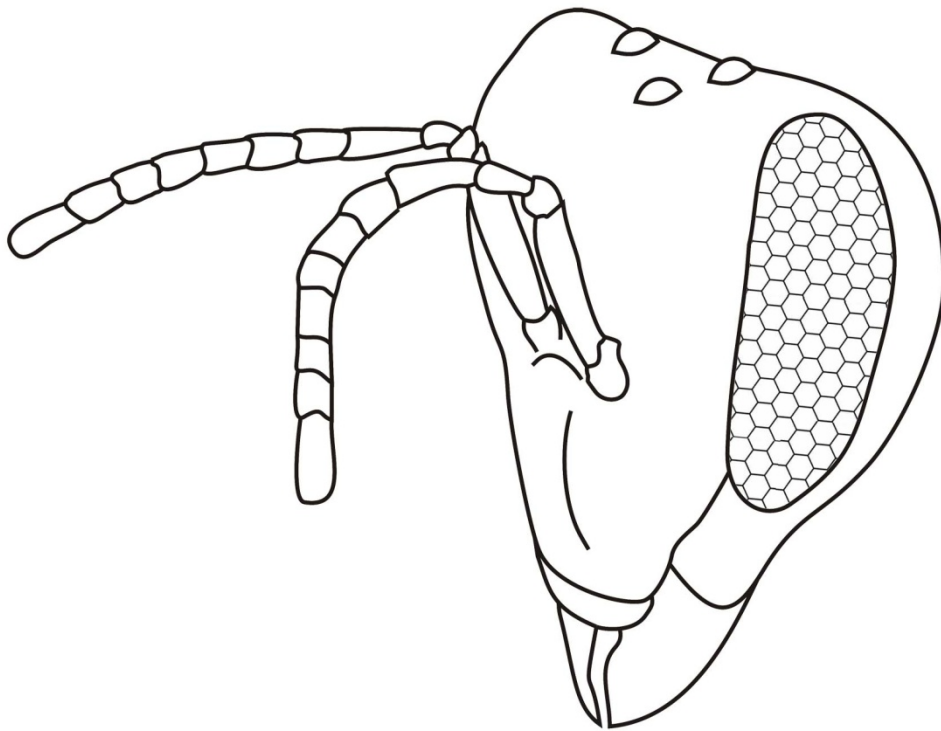
angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag<sup>a</sup>. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Sarah Maria Pfabigan  
Matrikel-Nummer: 0400288  
Studienrichtung (lt. Studienblatt): A 439 Zoologie  
Betreuerin / Betreuer: Dr. Johannes Spaethe

Wien, am 10. August 2010

**Geschlechtsspezifische Verteilung der Fotorezeptoren im  
Auge der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* L., 1758  
(Apidae, Hymenoptera)**



Diplomarbeit  
Sarah Pfabigan

**INHALTSVERZEICHNIS**

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	4
PRÄPARATION FÜR LICHTMIKROSKOPIE UND <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	
Fluoreszenz-Antikörper-Markierung für Lichtmikroskopie	4
mRNA-Extraktion, cDNA-Synthese, PCR, Klonierung und Sequenzierung	5
In Situ Hybridisierung	6
ELEKTRONENMIKROSKOPIE	
Immunogold-Markierung für Elektronenmikroskopie	6
ERGEBNISSE	8
LICHTMIKROSKOPIE	
Fluoreszenz-Antikörper-Markierung für Lichtmikroskopie	8
In Situ Hybridisierung	12
ELEKTRONENMIKROSKOPIE	
Immunogold-Markierung für Elektronenmikroskopie	18
DISKUSSION	20
LITERATUR	25
ABSTRACT UND ZUSAMMENFASSUNG	28
APPENDIX	30
DANKSAGUNG	33
LEBENS LAUF	34

## EINLEITUNG

Die Honigbiene *Apis mellifera* L., 1758 gilt als Modellsystem für das Verständnis des Farbsehens bei Evertrebraten. Die ersten Erkenntnisse erlangte Karl von Frisch bereits Anfang des 20. Jahrhunderts, als er sich intensiv mit dem Sehen der Bienen und dem damit zusammenhängenden Verhalten auseinandersetzte (von Frisch 1914, 1965). Auch die dem Farbsehen zugrunde liegenden anatomischen und physiologischen Grundlagen sind mittlerweile gut untersucht (Carlson & Chi 1979, Eckert et al. 2002, Land & Nilsson 2002, Scharstein & Stommel 1999).

Die Komplexaugen der Biene - sowie fast aller anderen Insekten - setzen sich aus vielen Einzelaugen, den Ommatidien, zusammen, welche wiederum aus mehreren Zellen bestehen. Die Ommatidien der Biene sind aus neun im Kreis angeordneten Fotorezeptorzellen (R 1-9), deren Mikrovillissäume (die sogenannten Rhabdomere) zentral das fusionierte Rhabdom bilden, zusammengesetzt. Während sich acht der Rezeptorzellen (R 1-8) über die gesamte Länge der zentralen Achse des Rhabdoms erstrecken, ist die neunte Zelle nur auf den basalen Bereich beschränkt (Gribakin 1975). In den unzähligen Mikrovilli der einzelnen Rezeptorzellen befinden sich die Sehpigmente, bestehend aus einem Protein, dem Opsin, und einem Chromophor, dem Retinal als prosthetische Gruppe (Carlson & Chi 1979, Eckert et al. 2002, Land & Nilsson 2002). Bei Auftreffen eines Photons (Lichtteilchen) wird über ein G-Protein eine Kaskade aktiviert, die letztendlich eine Änderung des Membranpotentials in der Rezeptorzelle hervorruft (Scharstein & Stommel 1999).

Die Honigbiene verfügt über ein trichromatisches Sehsystem, basierend auf drei Fotorezeptortypen, die bei verschiedenen Wellenlängen maximal empfindlich sind. Sie besitzt einen Rezeptortyp mit Absorptionsmaximum im ultravioletten (~345nm), im blauen (~435 nm) und im grünen Wellenlängenbereich (~540 nm) (Menzel & Blakers 1975, Peitsch et al. 1992). Die Anzahl dieser drei Rezeptortypen ist nicht in jedem Ommatidium gleich. Entgegen früheren Annahmen, dass nur ein einziger Ommatidientyp (der 3 UV-, 2 Blau- und 4 Grünrezeptoren enthält) im Bienenaugen existiert (Land & Nilsson 2002, Menzel & Backhaus 1991), ist seit einigen Jahren bekannt, dass mindestens drei Ommatidientypen vorhanden sind, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Die Ommatidien in der Hauptretina der Honigbienenarbeiterinnen bestehen aus sechs Grünrezeptoren und entweder zwei Blaurezeptoren, zwei UV-Rezeptoren oder von beiden genannten je einem Rezeptortyp (Wakakuwa et al. 2005).

Die drei Ommatidientypen sind heterogen und ohne erkennbares Muster in der Retina verteilt, wobei es Unterschiede in den Verhältnissen der drei Typen zwischen den einzelnen Augenregionen gibt (Wakakuwa et al. 2005). Diese Heterogenität der Ommatidien wurde auch bei Hummeln (Spaethe & Briscoe 2005) und anderen Insektenarten gefunden (Arikawa 2003, Qiu et al. 2002, Ribi 1978, Schwind et al. 1984). Die maximale Empfindlichkeit der proximal liegenden und verkleinerten neunten Rezeptorzelle wurde zuerst im UV-Bereich

(Menzel & Snyder 1974, Menzel 1975) und zuletzt im grünen Wellenbereich (Wakakuwa et al. 2005) angenommen, ist aber bis heute nicht eindeutig bestimmt.

Zusätzlich liegt am oberen Rand des Auges eine Gruppe von spezialisierten Ommatidien, welche sich in Morphologie und Funktion unterscheiden (Labhart 1980, Labhart & Meyer 1999, Wehner et al. 1975). Diese dorsale Randregion (DRA) ermöglicht den Bienen die Wahrnehmung von polarisiertem Licht (Labhart 1980, Labhart & Meyer 1999). Die Perzeption von polarisiertem Licht übernehmen bei Honigbienen UV-Rezeptoren (von Helversen & Edrich 1974, Labhart 1980, Menzel & Snyder 1974). Es wird daher angenommen, dass sich entsprechend der speziellen Ansprüche an diese Region auch die Zusammensetzung der Fotorezeptoren in den Ommatiden zugunsten der UV-Rezeptoren ändert und hier zumindest ein weiterer Ommatidentypen vorkommt. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass sich die sonst basale neunte Zelle in der DRA über die gesamte Länge des Ommatidiums erstreckt (Wehner et al. 1975, Schinz 1975).

Die Augen der männlichen Drohnen haben andere Aufgaben zu erfüllen, sie dienen vor allem dem Auffinden und Erkennen von Weibchen. Dies schlägt sich auch in der Morphologie der Augen nieder. Diese sind durch die doppelte Ommatidienzahl wesentlich größer und besitzen eine dorsale Zone mit verbesserter Auflösung und Kontrastwahrnehmung, (Menzel et al. 1991, van Praagh et al. 1980, Ribi et al. 1988, Vallet & Coles 1993). In diesem Bereich sind die Ommatidien bezüglich Linsendurchmesser und Rhabdomgröße vergrößert und die Winkel zwischen den Ommatidien verkleinert (Menzel et al. 1991, van Praagh et al. 1980, Seidl 1982). Die größten Ommatidien befinden sich im frontalen Dorsalbereich, mit welchem die Jungköniginnen gegen den hellen Himmel detektiert werden (Menzel et al. 1991, van Praagh et al. 1980). Frühere Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, dass hier die Fotorezeptoren im Vergleich zum Arbeiterinnenaug anders verteilt sind und die Ommatidien keine Grünrezeptoren enthalten (Autrum & Zwehl 1962, 1963; Menzel et al. 1991, Peitsch et al. 1992). Der ventrale Bereich des Drohnenauges unterscheidet sich nicht so stark vom Auge der Arbeiterin, obwohl selbst die kleinsten Ommatidien größer als die größten bei der Arbeiterin sind. Die Größe der Interommatidialwinkel unterscheidet sich bei Arbeiterinnenaugen und dem ventralen Bereich des Drohnenauges hingegen nicht (Menzel et al. 1991, Seidl 1982). Weiters exprimieren Drohnen im Ventralbereich alle drei Opsintypen (Menzel et al. 1991, Peitsch et al. 1992, Velarde et al. 2005). Menzel (1991) zeigte außerdem, dass sich die ventralen Drohnenommatidien unter orthodromischer Blaubeleuchtung im Fluoreszenzsignal nicht von dem der Arbeiterinnen unterscheiden. Welche Typen von Ommatidien bezüglich der Rezeptorzusammensetzung die Drohnen im Dosal- sowie Ventralbereich besitzen, und ob sich diese deutlich von denen der Arbeiterinnen unterscheiden, konnte bisher allerdings nicht geklärt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung geschlechtsspezifischer Unterschiede der Fotorezeptorzusammensetzung in den Ommatidien von *Apis mellifera* Arbeiterinnen und Drohnen mit Hilfe immunohistochemischer, elektronenmikroskopischer und molekular-

biologischer Techniken. Dies beinhaltet die Beschreibung der verschiedenen Ommatidientypen in den unterschiedlichen Augenregionen bei Arbeiterinnen und Drohnen.

## **MATERIAL UND METHODEN**

### **Versuchstiere**

Für die Untersuchungen wurden Arbeiterinnen und Drohnen der Honigbiene (*Apis mellifera*) von verschiedenen Stöcken auf der Terrasse des Biozentrums Althanstrasse der Universität Wien abgefangen. Die Bienen wurden zwischen März und November 2009 und März und Juni 2010 gesammelt.

### **PRÄPARATION FÜR LICHTMIKROSKOPIE UND *IN SITU* HYBRIDISIERUNG**

Die Bienen wurden auf 4°C gekühlt um sie zu immobilisieren, bevor der Kopf mit einer Rasierklinge abgetrennt und in einem Wachs-Kollophonium-Gemisch für die Präparation fixiert wurde. Anschließend wurde das Gehirn und die Retina ohne Cornea in 4% Paraformaldehyd in 1xPBS aus der Kopfkapsel präpariert. Das Gewebe wurde für mindestens 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixation wurde das Gewebe 3 mal für 10 min mit 1xPBS gewaschen und danach mit 16% Saccharose in 1xPBS über Nacht bei 4°C infiltriert. Am nächsten Tag wurden die Augen in Tissue-Tek® O.C.T™-Medium (Sakura Finetek, Inc.) eingebettet und mit einem CM3050 S - Cryostat (Leica Microsystems) bei circa -25°C geschnitten. Die 8 bis 10 µm dicken Schnitte wurden mit drei Objektträgern (SuperFrost®/Plus, Menzel-Gläser) alternierend aufgesammelt, so dass jeder vierte Schnitt auf demselben Objektträger war. Nachdem mit einem Pap Pen (Science Services) eine Linie um die Schnitte gezogen wurde, wurden die Objektträger für mindestens 4 h bei Raumtemperatur getrocknet. Objektträger die nicht direkt nach dem Trocknen weiter verwendet wurden, wurden bei -20°C für Antikörper-Färbungen bzw. bei -80°C für *In situ* Hybridisierungen aufbewahrt.

### **Fluoreszenz-Antikörper-Markierung für Lichtmikroskopie**

Die Immunohistochemie wurde nach einem Protokoll von Spaethe und Briscoe (2005) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 5 min in 100% eiskaltem Aceton nachfixiert, 3 mal je 10 min in 1xPBS und anschließend einmal für 5 min in 0.5% SDS (Natriumlaurylsulfat, Carl Roth) in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30-45 min mit Blockierlösung geblockt und dann mit dem primären Anti-Opsin-Antikörper, 1:100 in Blockierlösung verdünnt, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden drei verschiedene Antikörper verwendet: einer gegen UV-Opsin ( $\alpha$ -UV AB), einer gegen Blau-Opsin ( $\alpha$ -BL AB) und einer gegen Grün-Opsin ( $\alpha$ -GR AB). Diese gereinigten polyklonalen Kaninchen-Antikörper wurden gegen die Peptide LQEKPISDSTSTTTE ( $\alpha$ -UV AB), MGIHEPETSDATSA ( $\alpha$ -BL AB) und LACAAEPSSDAVSTT ( $\alpha$ -LW AB) hergestellt (Quality Controlled Biochemicals). Nach der Inkubation wurden die Objektträger 4 mal für 5 min in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem sekundären anti-

Kaninchen-Antikörper Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 568 (Invitrogen), 1:1000 verdünnt, und mit Hoechst Kernfärbung (1mg/mL, Invitrogen), 1:200 verdünnt, in 1xPBS für 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3 mal für 10 min im Dunklen in 1xPBS gewaschen und mit Fluoromount-G (Science Services) und Deckgläsern eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments Inc.) betrachtet und mit einer Nikon DS-Fi1 Mikroskopkamera (Nikon Instruments Inc.) fotografiert. Helligkeit und Kontrast der Fotos wurden, wenn nötig, mit Adobe Photoshop CS 3 (Adobe Systems Inc.) nachbearbeitet. Die Bestandteile der verwendeten Lösungen und Puffer sind im Appendix angegeben.

### mRNA-Extraktion, cDNA-Synthese, PCR, Klonierung und Sequenzierung

Für die RNA-Extraktion wurden ausschließlich die Komplexaugen verwendet, um Kontamination mit mRNA der Ocellen zu vermeiden. Einem üblichen Protokoll der Phenol/Chloroform-Extraktion folgend wurde das ISOL-RNA lysis reagent™ (5 Prime) als chaotrope Lösung zur vollständigen Extraktion der gesamten mRNA verwendet. Die Synthese der cDNA wurde mit 1 µL der extrahierten RNA mit dem iScript Reverse Synthesis Kit™ (BioRad) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Basierend auf den veröffentlichten Opsin-Sequenzen von *A. mellifera* (GenBank 2010) wurden spezifische Primer designt (Tab. 1). Die Spezifität dieser Primer wurde mit einer PCR unter Verwendung von DreamTaq™ Polymerase (Fermentas) überprüft, die PCR-Produkte mit einem Gel-Elute Kit (QIAGEN) aufgereinigt und anschließend in ein pCRII-TOPO Plasmid (Invitrogen) kloniert. Nach der Transformation in Top10 *E. coli*-Zellen wurden die Klone mit DreamTaq™ Polymerase (Fermentas) auf das richtige Insert überprüft und in 5mL Übernacht-Kulturen vermehrt. Die Plasmide wurden mit dem QIAGEN Miniprep Kit gemäß Herstellerprotokoll extrahiert und in einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Beebase (2010) unter Verwendung von nblast (Altschul et al. 1990) verglichen und die am besten übereinstimmenden Inserts für jedes Opsin wurden amplifiziert, aufgereinigt und als Template für die Transkription verwendet. Für die Transkription von „sense“ und „antisense“ Riboproben wurde ein DIG RNA labeling kit (SP6/T7, Roche Diagnostics) gemäß Herstellerangaben angewendet.

**Tab. 1:** Sequenzen der spezifischen Primer für die Amplifikation der drei Opsinsequenzen (UV, Blau, Grün) von *Apis mellifera* zur Herstellung der Sonden für die *in situ* Hybridisierung, designt nach Opsin-Sequenzen aus der Genbank (Accession Nummern). Die Länge der spezifischen Riboproben ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Opsintyp	Accession Nr.	Primernamen	Nukleotidsequenz	Länge
UV-sensitive opsin	GB18171-RA	AmUVOP 19F	5' -CAAACGGAGTTATCGAGATGT-3'	1129 bp
		AmUVOP 1127R	5' -ACTGTCTCAGTTGTAGTGCTT-3'	
Blue-sensitive opsin	GB13493-RA	AmBLOP 46F	5' -ATCGCCGAGGAAGGATATGT-3'	1077 bp
		AmBLOP 1103R	5' -GCAGATGTAGCGTCAGAAGT-3'	
Long wavelength sensitive opsin 1	NM_001011639	AmLWRHOP 78F	5' -CGGGACCAAGTTATGAAGCT-3'	1096bp
		AmLWRHOP 1154R	5' -AGGTTGTGGATACAGCGTCT-3'	



### ***In situ* Hybridisierung**

Die *In situ* Hybridisierungen wurden auf den vorbereiteten Schnitten unter Anwendung eines geringfügig modifizierten Protokoll von Maksimovic et al. (2009) durchgeführt. Die Schnitte wurden zuerst 3 mal für 10 min mit 1xPBS gewaschen und dann für 30 min mit 100-200µL Hybridisierungspuffer pro Objektträger bei ~60°C in einer befeuchteten Kammer vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte anschließend mit 500ng/µL der markierten „antisense“ Riboprobe in 100-300 µL Hybridisierungspuffer pro Objektträger für circa 16 h bei ~60°C in einer befeuchteten Kammer. Als Negativkontrolle wurden Schnitte mit der jeweilige „sense“- Riboprobe hybridisiert. Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern wurden Parafilmstücke auf die Flüssigkeit auf jedem Objektträger gelegt. Zum Ablösen des Parafilms wurden die Objektträger nach der Hybridisierung für 5 min in 5xSSC auf ~60°C eingeweicht und dann 3 mal für 20 min mit 1xSSC bei ~60°C gewaschen. Danach wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur mit PBX gewaschen, anschließend erst mit Blockerlösung für 30-45 min bei Raumtemperatur geblockt und dann mit anti-digoxigenin-AP (Roche, Applied Sciences), 1:4000 in Blockierlösung verdünnt, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Objektträger für 30 min in 1xPBX wurde die Farbreaktion mittels alkaliner Phosphatase bei Raumtemperatur unter Verwendung von NBT/BCIP (Roche, Applied Sciences) gestartet. Nach Eintreten der Färbung und der Entwicklung zur guten Sichtbarkeit wurden die Schnitte 5 min in 1xPBS gewaschen, 1-2 mal mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Fluoromount-G (Science Services) und Deckgläsern eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit einem Nikon Microphot-FXA Mikroskop untersucht und mit einer Nikon DS-Fi1 Mikroskopkamera (Nikon Instruments Inc.) fotografiert. Helligkeit und Kontrast der Fotos wurden, wenn nötig, mit Adobe Photoshop CS 3 (Adobe Systems Inc.) nachbearbeitet. Die Bestandteile der verwendeten Lösungen und Puffer sind im Appendix angegeben.

Von jedem Individuum wurde, sofern möglich, auf den Schnitten jeweils mindestens eine Stelle im ventralen als auch im dorsalen Bereich ausgewählt, wo sowohl die Ommatidien getrennt zu sehen waren als auch die Färbung gut erkennbar war. Anhand dieser wurden die Ommatidientypen, identifiziert anhand von UV-Rezeptoren oder Blau-Rezeptoren, ausgezählt und deren relative Häufigkeit errechnet.

### **ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE**

#### **Immunogold-Markierung für Elektronenmikroskopie**

Die Retina wurde wie oben beschrieben aus der Kopfkapsel präpariert, allerdings erfolgte die Fixierung nur für die Dauer der Präparation (~15 min). Die Retina wurde anschließend in kleine Stücke geschnitten, so dass diese in die für Proben vorgesehene Aussparung des Kupfer-Carriers (0.5 mm Durchmesser, 200 µm hoch) passten. Dann wurden die Proben sofort mit einem EMPACT 2 high-pressure freezer, ausgestattet mit einem „rapid transfer

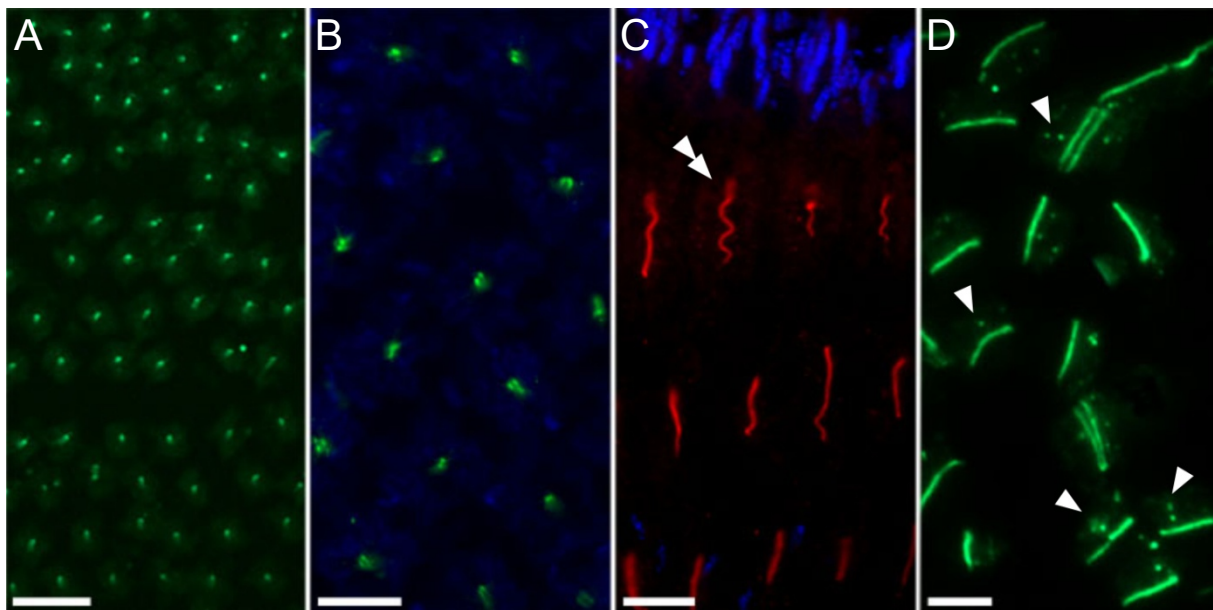
system“ (Verkade 2008), unter hohem Druck gefroren und anschließend das in der Probe enthaltene Wasser in einem Gefriersubstitutionssystem EM AFS 2 (beides Leica Microsystems) durch Methanol ersetzt. Das Protokoll für die Gefriersubstitution wurde nach Reipert und Wiche (2008) modifiziert und wie folgt durchgeführt: von  $-140^{\circ}\text{C}$  auf  $-90^{\circ}\text{C}$  in 2h ( $+25^{\circ}\text{C/h}$ ), für 80 h auf  $-90^{\circ}\text{C}$  in Methanol, dann auf  $-88^{\circ}\text{C}$  und von  $-88^{\circ}\text{C}$  auf  $-40^{\circ}\text{C}$  in 24 h ( $+2^{\circ}\text{C/h}$ ). Proben die zusätzlich mit Uranylacetat fixiert wurden, wurden danach 3 mal für 10 min mit Ethanol auf  $-40^{\circ}\text{C}$  gewaschen. Die darauffolgende Einbettung in das Niedrigtemperatur-Harz HM20 (Polysciences, Inc.) erfolgte schrittweise. Die Probe wurde für 30 min in einem Gemisch Methanol:HM20 2:1, für 1 h in einem Gemisch 1:1 und danach für 2 h in einem Gemisch 1:2 infiltriert. Nach der Infiltration mit purem HM20 bei  $-60^{\circ}\text{C}$  über Nacht wurde das Harz ausgetauscht und auf  $-40^{\circ}\text{C}$  für 48 h mit UV-Licht polymerisiert.

Nach der Polymerisation wurden Ultradünnschnitte ( $\sim 70$  nm) mit einem EM UC6 (Leica Microsystems) mit Diamantmesser (Diatome) geschnitten und auf Nickel-Grids (200 mesh) mit Formvar-Film abgefischt. Für die Immuno-Gold-Markierung wurden die Grids 2 mal 5 min auf 1xPBS-, dann auf 0.05 M Glycin- und anschließend auf Protein-Blockier-Puffer-Tropfen für jeweils 10 min gelegt. Danach wurden die Schnitte 2 mal für 5 min mit Inkubationspuffer gewaschen. Die Inkubation mit den primären Antikörpern, 1:25 in Inkubationspuffer verdünnt, erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die verwendeten Primärantikörper waren dieselben, die für die immunohistochemischen Untersuchungen mit Fluoreszenz-Lichtmikroskopie verwendet wurden (siehe oben). Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Grids 6 mal für je 2 min mit Inkubationspuffer gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-Kaninchen-Antikörper konjugiert mit 5 nm kolloidalem Gold (British Biocell), 1:40 in Inkubationspuffer verdünnt, verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte 3 mal für 5 min mit Inkubationspuffer und 3 mal 5min mit 1x PBS gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte für 5 min mit 1% Glutaraldehyd in 1xPBS. Anschließend wurden die Schnitte 6 mal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden für 15 min mit 0.5% Uranylacetat und 8 min mit 1% Bleicitrat kontrastiert und nach jedem dieser Schritte 3 mal mit 20 Dips in destilliertem Wasser gewaschen. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 30 min wurden die Schnitte mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops Zeiss TEM 902 (Carl Zeiss) und einer slow scan CCD-Kamera (TRS, Tröndle) fotografiert. Wenn nötig wurden Helligkeit und Kontrast der Fotos mit Adobe Photoshop CS 3 (Adobe Systems Inc.) nachbearbeitet. Die Bestandteile der verwendeten Lösungen und Puffer sind im Appendix angegeben.

**ERGEBNISSE****LICHTMIKROSKOPIE****Fluoreszenz Antikörper-Markierung für Lichtmikroskopie**

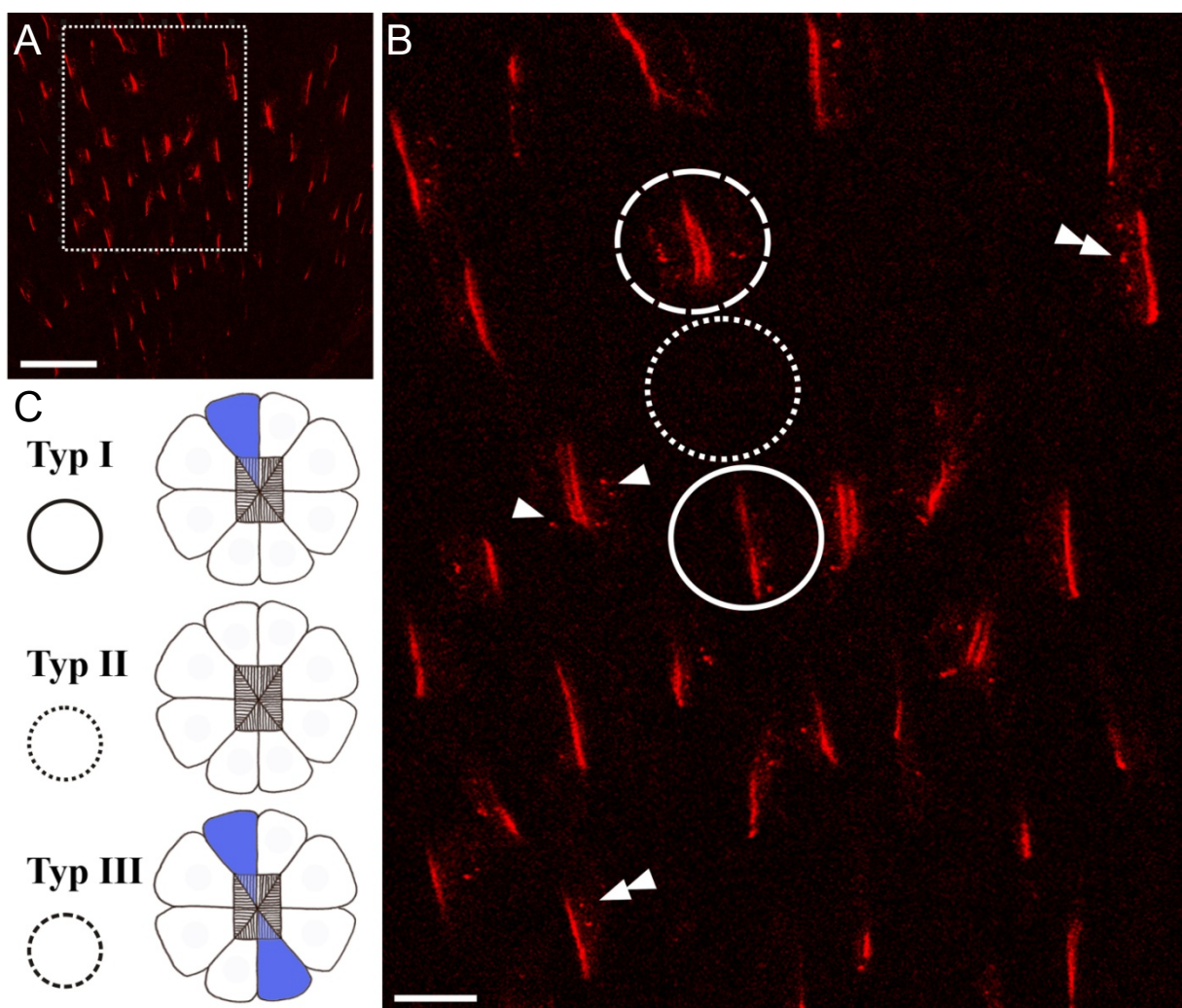
Da die  $\alpha$ -Opsin-Antikörper spezifisch am Opsin binden, findet man das stärkste Fluoreszenzsignal immer im fusionierten Rhabdom im Zentrum des Ommatidiums, da dort das meiste Opsin in der Membran der zahlreichen Mikrovilli der Rezeptorzellen gebunden ist (Abb. 1). Weiters wurden Fluoreszenzsignale in manchen Zellkörpern gefunden, wo Vesikel, in welchen Opsin enthalten ist, mit dem Antikörper markiert wurden (Abb. 1, 2; Pfeilkopf). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um sekundäre Lysosome und multivesikuläre Körper (Suzuki & Hirosawa 1991). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur mit dem  $\alpha$ -BL AB gute Fluoreszenzsignale erzielt werden, die anderen beiden  $\alpha$ -Opsin-Antikörper ( $\alpha$ -UV AB und  $\alpha$ -GR AB) führten nur zu einem sehr schwachen bzw. keinem wahrnehmbaren Signal.

In der Hauptretina der Honigbienen-Arbeiterinnen wurden drei Typen von Ommatidien gefunden, die entweder zwei (Typ III), einen (Typ I) oder keinen (Typ II) Blau-Rezeptor enthalten (Abb. 2), was bereits für Honigbienen (Wakakuwa et al. 2005) und



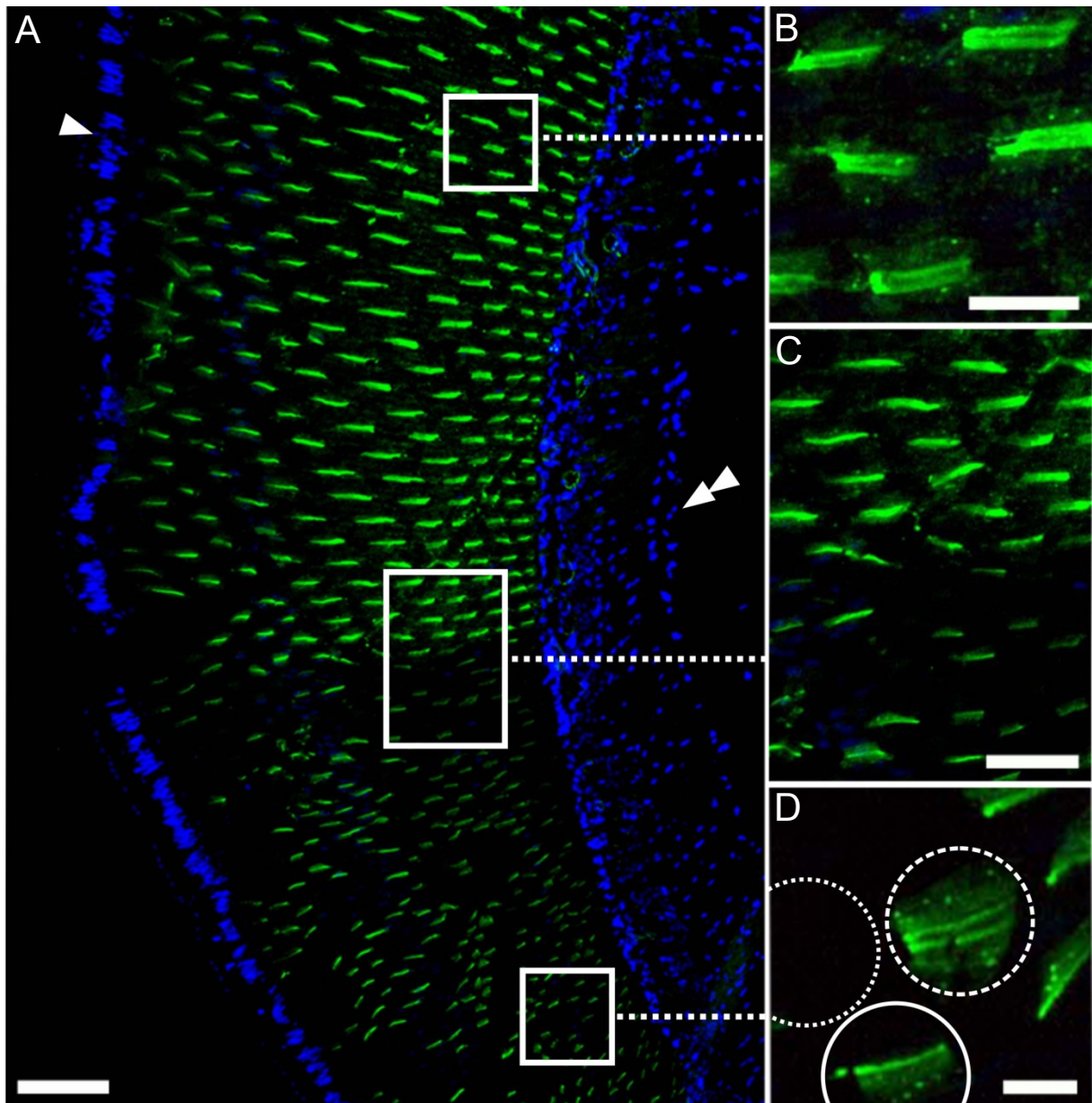
**Abb. 1:** Beispiele für die Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen Blau-Opsin auf den Cryoschnitten von *Apis mellifera*-Augen, sichtbar gemacht mit fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper (Alexa 488 – grün oder Alexa 568 – rot) und Höchst Kernfärbung (blau). **A, B** Querschnitte aus dem Dorsalbereich eines Drohnenauges. Nur das zentral im Ommatidium liegende Rhabdom zeigt ein Fluoreszenzsignal. **A** Einzelne Ommatidien sind anhand der leichten Auto-Fluoreszenz des Gewebes jeweils als leichter Kreis sichtbar, das starke Signal in der Mitte ist das Signal des Rhabdoms (Maßstab 50  $\mu$ m). **B** Leichte Auto-Fluoreszenz der Ommatidien als blaue Kreise sichtbar, das grüne Signal jeweils in der Mitte zeigt die Rhabdomere (Maßstab 20  $\mu$ m). **C** Längsanschnitte aus dem dorsalen Bereich eines Drohnenauges. Die Rhabdomere sind als rotes Signal, die Zellkerne der Kristallkegelzellen als blaues Signal (oben im Bild) sichtbar. Der Twist im oberen Bereich der Rhabdome ist deutlich zu sehen (doppelter Pfeilkopf), er ist typisch für die Hauptretina und verhindert hier das Polarisationssehen (Wehner et al. 1975, Maßstab 25  $\mu$ m). **D** Längsanschnitte aus der Hauptretina des Arbeiterinnenauges. Neben den markierten Rhabdomeren sind in den anschließenden Zellkörpern Vesikel, die Opsin enthalten, sichtbar (Pfeilkopf, Maßstab 10  $\mu$ m).

Hummeln bezüglich UV-Rezeptoren (Spaethe & Briscoe 2005) gezeigt werden konnte. Es besteht kein Unterschied in den gefundenen Ommatidientypen zwischen dem ventralen und dorsalen Bereich der Hauptretina der Arbeiterin. Die Retina der Drohnen zeigt bezüglich der Ommatidien, die Blaurezeptoren enthalten, zwei verschiedene Bereiche (Abb. 3). Der ventrale Teil des Auges ist aus denselben drei Ommatidientypen (Typ I-III) wie die Hauptretina der Arbeiterinnen zusammengesetzt (Abb. 3 D). Im dorsalen Teil hingegen sind in jedem Ommatidium Blaurezeptoren zu finden. Aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Rhabdomere nicht auflösbar waren und das Fluoreszenzsignal viel stärker als im ventralen Bereich war, kann angenommen werden, dass jedes Ommatidium mindestens zwei Blaurezeptoren enthält (Abb. 3 B). Der Unterschied zwischen den beiden Augenregionen ist



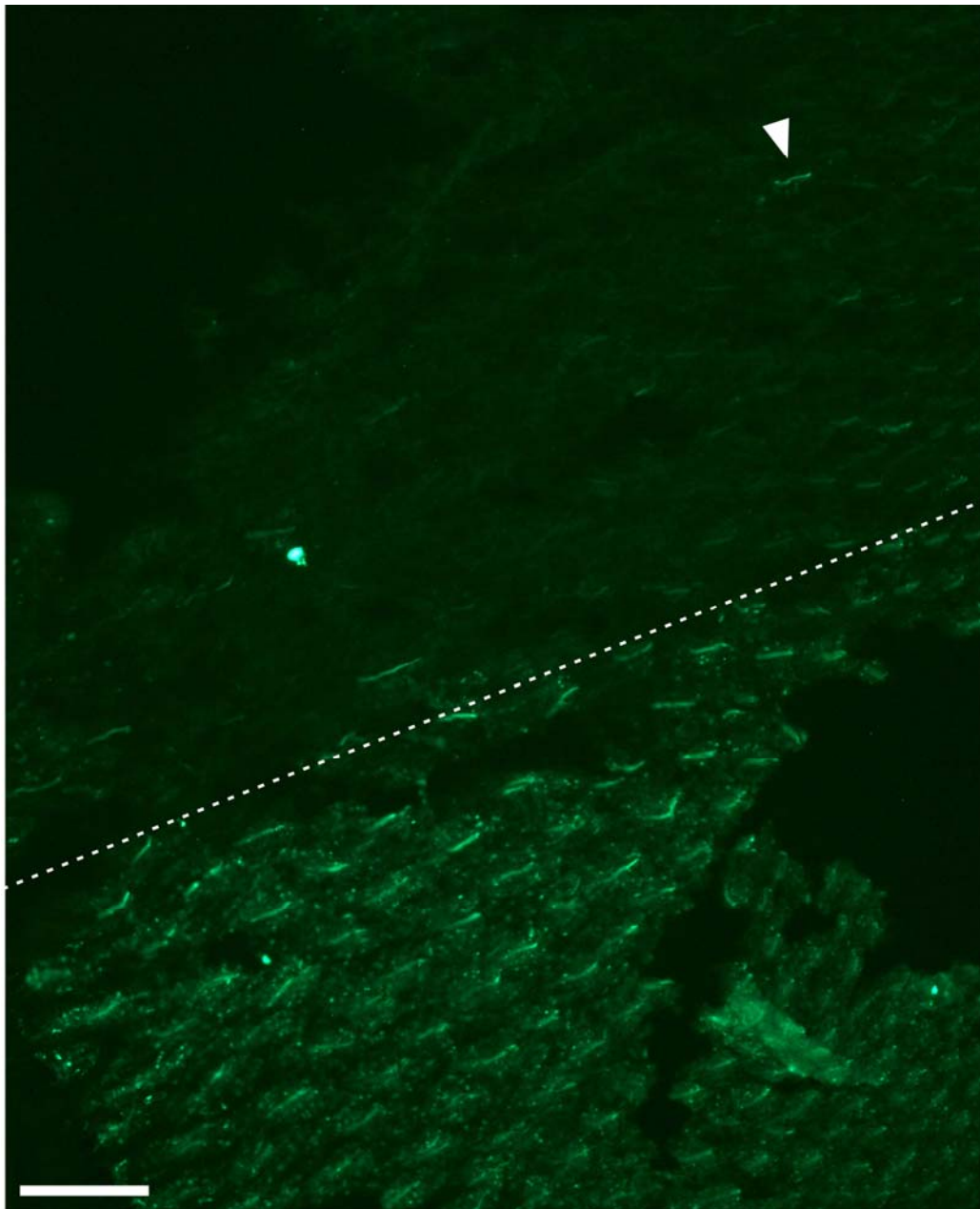
**Abb. 2:** Cryoschnitt eines *Apis mellifera* Arbeiterinnenauges markiert mit spezifischen Antikörpern gegen Blau-Opisin, sichtbar gemacht mit fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper (Alexa 568, rot). **A** Übersicht des Schnittes (Messbalken 100  $\mu$ m), der eingerahmte Bereich wurde in **B** herausvergrößert (Messbalken 25  $\mu$ m). **B** Das Fluoreszenzsignal zeigt, dass Ommatidien in zwei (gestrichelter Kreis), einem (Kreis) oder keinem (gepunkteter Kreis) Rezeptor Blau-Opisin exprimieren. Neben den Rhabdomeren sind markierte Vesikel in den Zellkörpern der Blau-Rezeptoren von Typ I-Ommatidien (Pfeilkopf, einseitig) und Typ III-Ommatidien (Doppelpfeilkopf, beidseitig) sichtbar. **C** Schematische Darstellung eines Querschnittes der drei Ommatidientypen, die in der Hauptretina des Arbeiterinnenauges vorkommen. Typ I enthält einen, Typ II keinen und Typ III zwei Blaurezeptoren.

durch die unterschiedliche Stärke des Signals deutlich sichtbar, wobei hier die unterschiedlichen Rhabdomdurchmesser eine große Rolle spielen können (Abb. 3 C). In Frontalschnitten (im Bezug auf die Kopfkapsel) macht der ventrale Bereich etwa ein Drittel des Auges aus und wird in Richtung caudal immer kleiner bis er ganz verschwindet. Eine Markierung mit Grün-Opsin-Antikörper zeigt, dass sich die Verteilung der Grün-Rezeptoren komplementär zur Verteilung der Blau-Rezeptoren verhält (Abb. 4). Im ventralen Bereich ist



**Abb. 3:** Cryolängsschnitt eines Drohnenauges von *Apis mellifera* markiert mit spezifischen Antikörpern gegen Blau-Opsin, sichtbar gemacht mit fluoreszenz-markiertem Sekundäntikörper (Alexa 488, grün), und Höchst Kernfärbung (blau). **A** Übersicht über den mittleren Teil des Drohnenauges (Messbalken 100  $\mu$ m). Die Rhabdomere von Blaurezeptoren sind als grünes und die Zellkerne der Kristallkegelzellen (Pfeilkopf) und der Lamina (doppelter Pfeilkopf) als blaues Fluoreszenzsignal sichtbar. **B** Im dorsalen Bereich ist das Signal der Fotorezeptoren stark, hier befinden sich Blaurezeptoren in allen Ommatidien (Messbalken 20  $\mu$ m). **C** Dorsaler (oben) und ventraler Bereich (unten) sind klar voneinander unterscheidbar (Messbalken 50  $\mu$ m). **D** Im ventralen Bereich enthalten die Ommatidien zwei (gestrichelter Kreis), einen (Kreis) oder keinen (gepunkteter Kreis) Blau-Rezeptor, wodurch das Signal vergleichsweise schwächer erscheint (Messbalken 10  $\mu$ m).

das Signal stark und man kann keine einzelnen Rhabdomere unterscheiden. In jedem Ommatidium sind also mehrere Rezeptoren vorhanden, die Grün-Opsin exprimieren. Im dorsalen Bereich sind hingegen nur einige vereinzelte Rhabdomere, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, sichtbar. Ventraler und dorsaler Bereich sind ebenfalls klar voneinander unterscheidbar (Abb. 4, gestrichelte Linie). Da nur der  $\alpha$ -BL AB verlässlich funktionierte, für  $\alpha$ -UV AB wurde nie ein eindeutiges Signal gefunden und die Markierung mit  $\alpha$ -GR AB funktionierte nur einmal, kann keine eindeutige Aussage über die Zugehörigkeit der anderen Rezeptorzellen gemacht werden.



**Abb. 4:** Cryoschnitt eines *Apis mellifera* Drohnenauges markiert mit spezifischen Antikörpern gegen Grün-Opsin, sichtbar gemacht mit fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper (Alexa 488, grün). Im ventralen Augenbereich (unten) befinden sich in allen Ommatidien Grün-Rezeptoren. Im dorsalen Bereich (oben) kommen Grün-Rezeptoren nur in wenigen, vereinzelten Ommatidien (Pfeilkopf) vor. Eine deutliche Trennung (gestrichelte Linie) zwischen ventralem und dorsalem Augenbereich ist erkennbar (Messbalken 100  $\mu$ m).

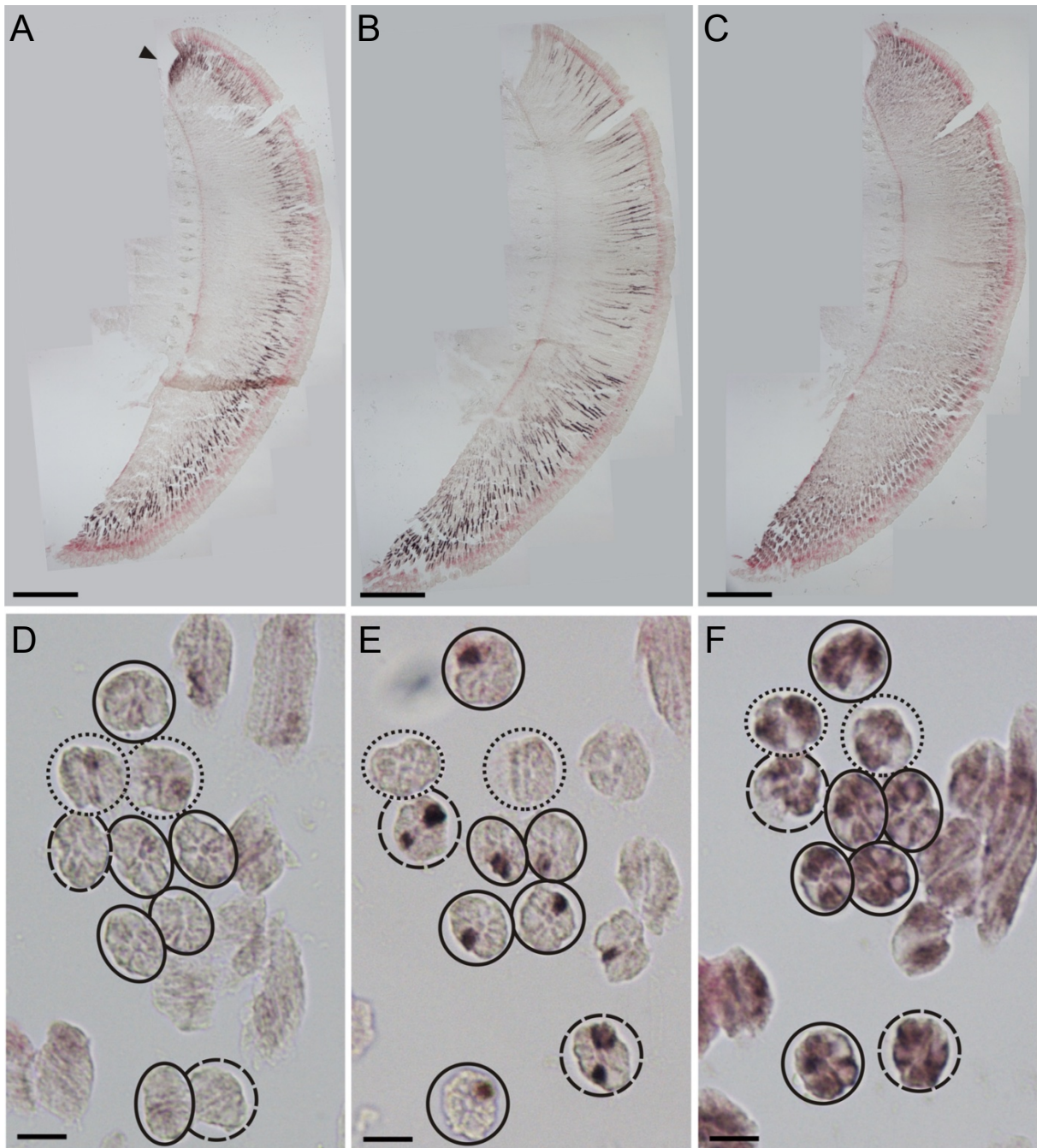
### ***In situ* Hybridisierung**

Die drei mRNA-Riboproben gegen UV-Opisin (UVOP), Blau-Opisin (BLOP) und Grün-Opisin (LWOP) lieferten ein spezifisches Signal, es wurden ausschließlich Fotorezeptorzellen in der Retina markiert. Die Ergebnisse der *In situ* Hybridisierung bestätigten dabei die Resultate der Antikörper-Markierung (siehe oben).

Auf den Schnitten der Arbeiterinnen Hauptretina ist zu sehen, dass sich der ventrale und dorsale Bereich nicht unterscheiden (Abb. 5 A, B, C). Es ist jedoch deutlich erkennbar, dass nicht alle drei Opisin-Typen gleich stark exprimiert werden. BLOP (Abb. 5 B) wird im Gegensatz zu UVOP (Abb. 5 A) in weniger Rezeptorzellen exprimiert, dafür ist LWOP in jedem Ommatidium zu finden (Abb. 5 C). Die Verteilung innerhalb des Auges ist jedoch weitgehend homogen. Nur bei der Hybridisierung von UV-Opisin-mRNA ist eine Konzentration der Färbung am dorsalen Rand der Retina zu sehen (Abb. 5 A, Pfeilkopf). Es handelt sich dabei um die DRA der Arbeiterinnen. Querschnitte durch die Hauptretina, welche einen genaueren Blick auf die Verteilung der Fotorezeptorzellen innerhalb eines Ommatidiums zulassen, zeigen, dass auch hier die drei bekannten Ommatidientypen zu finden sind (Abb. 5 D, E, F). Ommatidien mit je sechs Grünrezeptoren und entweder einem UV- und einem Blau-Rezeptor (Typ I), zwei UV-Rezeptoren (Typ II) oder zwei Blau-Rezeptoren (Typ III) wurden gefunden.

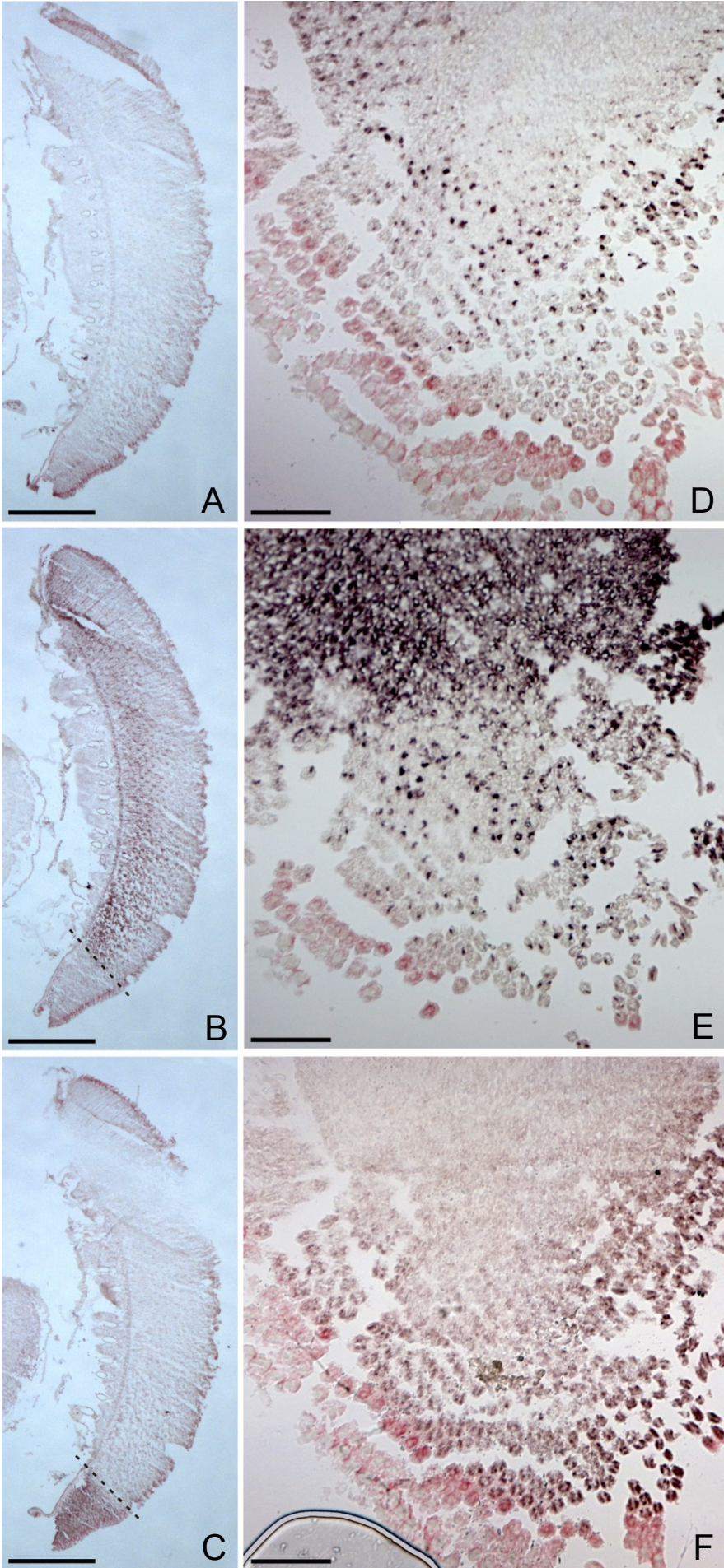
Das Drohnen-Auge hingegen zeigt eine Teilung in zwei Regionen, die sich in der Opisin-mRNA Expression unterscheiden (Abb. 6, gestrichelte Linie). Längsschnitte, auf denen UVOP sichtbar gemacht wurde, zeigen eine homogene Färbung (Abb. 6 A) und es sind Ommatidien mit zwei, einem oder keinem UV-Rezeptor zu erkennen (Abb. 6 B). Die einzige Ausnahme stellt auch hier die DRA dar, in der die Färbung von UVOP weitaus stärker ist (Daten nicht gezeigt). Die Hybridisierung von BLOP und LWOP zeigt hingegen deutliche Unterschiede zwischen ventraler und dorsaler Augenregion. Die BLOP-Färbung ist im ventralen Teil ähnlich jener von UVOP, auch hier sind Ommatidien mit zwei, einem oder keinem Blau-Rezeptor zu finden (Abb. 6 E). Im dorsalen Teil ist die Färbung wesentlich stärker, man kann keine einzelnen Rezeptoren in den Ommatidien erkennen (6 B, E). Es ist möglich, dass die zunehmende Größe der Rhabdome die Stärke der Färbung beeinflusst. Die Färbung von LWOP gestaltet sich genau umgekehrt. Sie ist im ventralen Teil kräftig und es sind keine einzelnen Grünrezeptoren zu unterscheiden. Im größten Teil des dorsalen Bereichs wurde keine Färbung gefunden (Abb. 6 C, F). Die einzige Ausnahme ist eine Färbung von Grünrezeptoren in einem schmalen Streifen entlang des proximalen Augenrandes, welcher sich in Richtung dorsal zunehmend verschmälert und schließlich in etwa vor dem Beginn des letzten Augendrittels endet (Daten nicht gezeigt).

Ein direkter Vergleich der hybridisierten Schnitte von Arbeiterinnen und Drohnen zeigt die beschriebenen Unterschiede noch deutlicher (Abb. 7). Die Fotorezeptorzusammensetzung der Ommatidien im ventralen Bereich unterscheidet sich nicht zwischen den Geschlechtern. Man findet die drei bekannten Ommatidientypen I, II und III (Abb. 7 E, F, G).



**Abb. 5:** *In situ* Hybridisierung auf Cryoschnitten von *Apis mellifera* Arbeiterinnenaugen in der Übersicht (Längsschnitte) (A, B, C; Messbalken 200  $\mu\text{m}$ ) und in der Detailansicht (Querschnitte) (D, E, F; Messbalken 10  $\mu\text{m}$ ). Die Schnitte wurden mit spezifischen Sonden gegen UV- (A, D), Blau- (B, E) und Grün-Opsin-mRNA (D, F) hybridisiert und mittels alkaliner Phosphatase-Aktivität sichtbar gemacht. **A, B, C** Ein Vergleich der Längsschnitte zeigt eine gleichmäßige Verteilung der drei Opsintypen über die Hauptretina. Die Verteilung von Blau-Opsin (B) und Grün-Opsin (C) scheint im ventralen Abschnitt (unten) konzentrierter, was durch einen leichten Unterschied in der Schnittebene und die Zahl der schleifend angeschnittenen Ommatidien zustande kommt. UV-Opsin zeigt eine Konzentration der Färbung am dorsalen Rand des Auges (A, schwarzer Pfeilkopf), ein Hinweis darauf, dass in der dorsalen Randregion (DRA) mehr UV-Rezeptoren pro Ommatidium vorkommen. **D, E, F** Die Querschnitte zeigen, dass die drei Rezeptortypen nicht gleichmäßig auf die acht Rezeptorzellen eines Ommatidiums verteilt sind. Es sind drei Ommatidientypen zu finden: Typ I-Ommatidien enthalten einen UV- und einen Blau-Rezeptor (schwarzer Kreis), Typ II-Ommatidien zwei UV-Rezeptoren (gepunkteter Kreis) und Typ III-Ommatidien zwei Blau-Rezeptoren (gestrichelter Kreis) mit je sechs Grünrezeptoren.





Dasselbe Set an Ommatidien findet sich im dorsalen Bereich des Arbeiterinnenauges (Abb. 7 C, D). Der Dorsalbereich der Drohnen unterscheidet sich davon deutlich (Abb. 7 A). In den Zellen befindet sich ein (Typ A), zwei (Typ B) oder kein UV-Rezeptor (Typ C) (Abb. 7 B). Markierte Grün-Rezeptoren sind im dorsalen Bereich nicht zu finden. Die Hybridisierung von BLOP zeigt, dass Blau-Opisin in mehr als zwei Zellen exprimiert wird, lässt aber keine Aussage über deren genaue Anzahl zu (Abb. 7 A). Es ist wahrscheinlich, dass sich hier mindestens drei Ommatidientypen (Typ A-C) finden, die sich von den bekannten Ommatidientypen (Typ I-III) unterscheiden.

Die Auszählung der Fotorezeptoren pro Ommatidium bei den Arbeiterinnen zeigt, dass die drei Ommatidientypen nicht gleich häufig in der Retina auftreten. Am häufigsten kommt Typ II, welcher zwei UV- jedoch keinen Blau-Rezeptor enthält, vor. Er macht circa die Hälfte aller Ommatidien aus. Circa 38% macht Typ I aus, welcher alle drei Fotorezeptoren enthält. Am seltensten tritt Typ III, jener mit 2 Blaurezeptoren, auf. Er macht nur circa 12% aller Ommatidien aus (Tab. 2). Weiters zeigt das Ergebnis, dass es geringfügige Unterschiede zwischen der ventralen und dorsalen Augenregion gibt. Im Bezug auf den Ventralbereich kommt der Typ mit allen drei Rezeptortypen im Dorsalbereich zu Lasten der beiden anderen Typen (II & III) häufiger vor (Tab. 2).

Im Gegensatz dazu stellt Typ I mit beinahe 46% den häufigsten Ommatidientyp im ventralen Bereich des Drohnenauges dar und auch Typ III kommt im Verhältnis zum Ventralbereich der Arbeiterinnen häufiger vor. Dadurch macht Typ II nur 36%, und damit weit weniger als beim Weibchen, aus (Tab. 2). Der dorsale Bereich der Männchen unterscheidet sich bezüglich der UV-Rezeptoren pro Ommatidium davon deutlich. Hier ergab die Auszählung ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen den Ommatidientypen A, B und C (Tab. 2).

**Abb. 6:** *In situ* Hybridisierung auf Cryoschnitten von *Apis mellifera* Drohnenaugen in der Übersicht (Längsschnitte) (A, B, C; Messbalken 500 µm) und in der Detailansicht aus dem Ventralbereich (D, E, F; Messbalken 100 µm). Alle Schnitte wurden mit spezifischen Sonden gegen Opsin-mRNA hybridisiert, welche als braune Färbung durch Alkaline-Phosphatase-Aktivität sichtbar gemacht wurden. **A, D** Mit Sonden gegen UV-Opisin-mRNA markierte Schnitte. Pro Ommatidium findet man zwei, einen oder keinen UV-Rezeptor, die Verteilung ventral (unten) unterscheidet sich nicht von jener dorsal (oben). **B, E** Hybridisierung von Blau-Opisin-mRNA. Im ventralen Augenabschnitt (unten) enthalten Ommatidien zwei, einen oder keinen Blaurezeptor (E), im dorsalen Augenbereich (oben) können keine einzelnen Rezeptoren unterschieden werden. Die starke Färbung lässt darauf schließen, dass sich im dorsalen Bereich mehr Blau-Rezeptoren pro Ommatidium befinden als im ventralen. Eine deutliche Teilung in zwei Augenabschnitten ist erkennbar (B, gestrichelte Linie). **C, F** Mit Grün-Opisin hybridisierte Schnitte. Auch hier ist eine deutliche Teilung in zwei Bereiche sichtbar (gestrichelte Linie), wobei im ventralen Bereich (unten) eine starke und im dorsalen Bereich (oben) keine Färbung zu finden ist (C). Die Querschnitte lassen erkennen, dass im ventralen Bereich pro Ommatidium in mehreren Rezeptoren Grün-Opisin exprimiert wird (F).

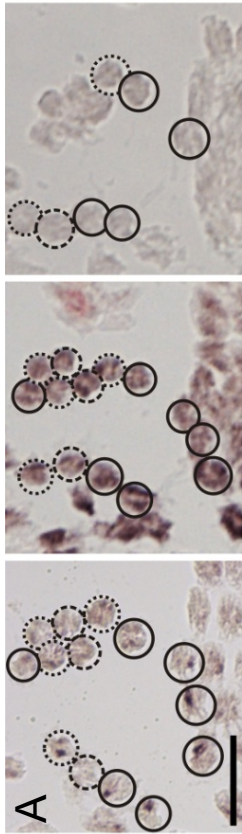
**Tab. 2:** Relative Häufigkeit der Ommatidientypen im ventralen und dorsalen Augenbereich von *Apis mellifera* Arbeiterinnen (♀, n=3) und Drohnen (♂, n=1). Die verschiedenen Ommatidientypen wurden anhand der Zahl von UV- und Blaurezeptoren pro Ommatidium im ventralen und dorsalen Augenbereich bei Arbeiterinnenaugen und im ventralen Bereich des Drohnenauges identifiziert. Im dorsalen Bereich des Drohnenauges wurden Ommatidientypen nur anhand der Zahl von UV-Rezeptoren pro Ommatidium bestimmt. Prozentuelle Häufigkeit der Ommatidientypen sind in Klammer (%-Wert) dargestellt.

Region	Anzahl der Ommatidien (%)		
	Typ I	Typ II	Typ III
♀ Gesamt	195 (37.6)	260 (50.1)	64 (12.3)
♀ Dorsal	131 (38.8)	168 (49.7)	39 (11.5)
♀ Ventral	64 (35.4)	92 (50.8)	25 (13.8)
♂ Ventral	131 (45.6)	103 (35.9)	53 (18.5)

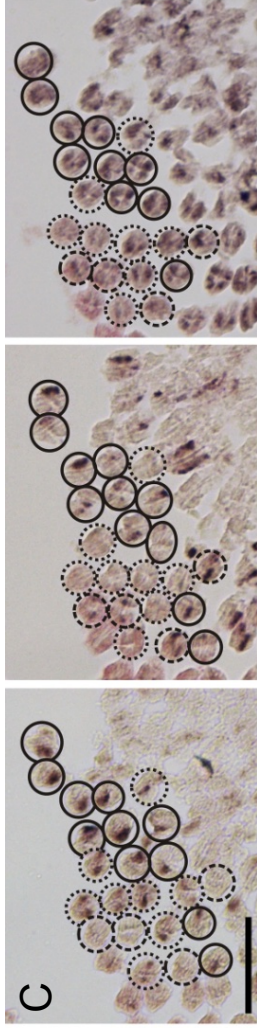
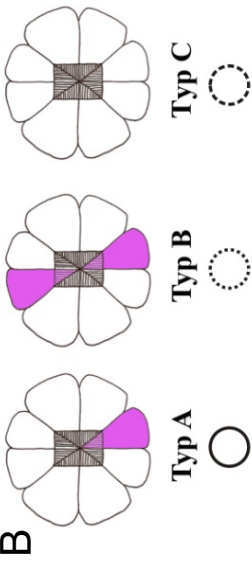
  

	Anzahl der Ommatidien (%)		
	Typ A (1 UV)	Typ B (2 UV)	Typ C (0 UV)
♂ Dorsal	121 (38.3)	109 (34.5)	86 (27.2)

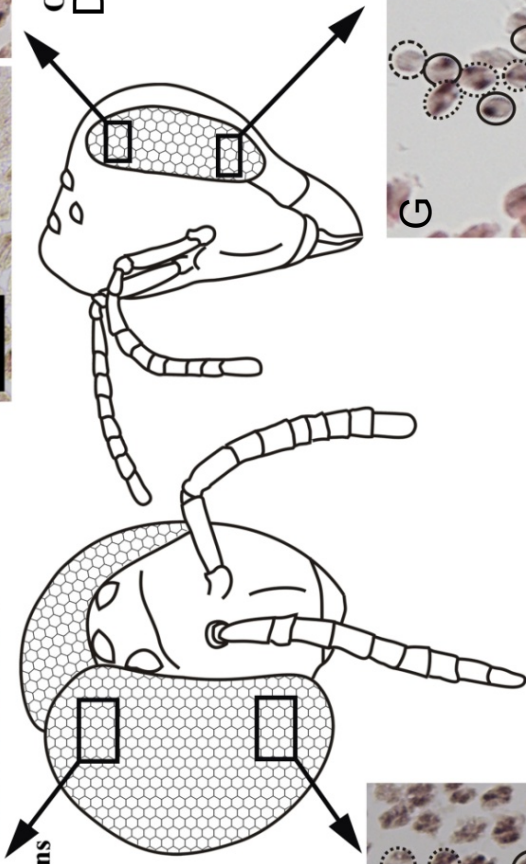
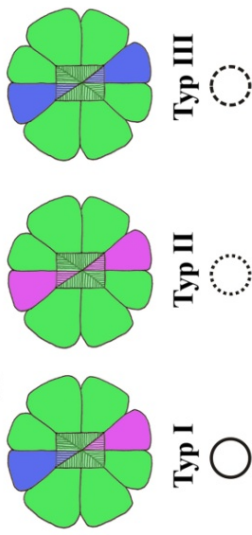
**Abb. 7: A, C, E, G** *In situ* Hybridisierung auf Cryoschnitten von *Apis mellifera* Augen. Die Schnitte wurden mit spezifischen Sonden gegen UV- (jeweils links), Blau- (jeweils Mitte) und Grün-Opsin-mRNA (jeweils rechts) hybridisiert und mittels alkaliner Phosphatase als braune Färbung sichtbar gemacht (Messbalken 50 µm). Ommatidien mit einem UV-Rezeptor sind mittels schwarzem Kreis, mit zwei UV-Rezeptoren mittels gepunktetem Kreis und mit keinem UV-Rezeptor mittels gestricheltem Kreis markiert. **B, D, F** Schema der Verteilung der drei Rezeptortypen in den Ommatidien der verschiedenen Augenregionen. **A** Ommatidienquerschnitte aus dem dorsalen Bereich des Drohnenauges. In den Ommatidien kommen kein (Typ C, gestrichelter Kreis), ein (Typ A, schwarzer Kreis) oder zwei (Typ B, gepunkteter Kreis) UV-Rezeptoren (links), viele Blau-Rezeptoren (mitte) und keine Grünrezeptoren (rechts) vor. **B** Das Schema zeigt, dass nur die UV-Rezeptoren eindeutig zugeordnet werden können. **C** Ommatidienquerschnitte aus dem dorsalen Bereich des Arbeiterinnenauges zeigen 3 Ommatidientypen (D). Die Ommatidien enthalten entweder einen UV- und einen Blaurezeptor (Typ I, schwarzer Kreis), zwei UV- und keinen Blau-Rezeptor (Typ II, gepunkteter Kreis) oder zwei Blau- und keinen UV-Rezeptor (Typ III, gestrichelter Kreis) mit je sechs Grün-Rezeptoren. **D** Schema der im dorsalen Bereich der Arbeiterin vorkommenden drei Ommatidientypen. **E, G** Querschnitte von Ommatidien aus dem ventralen Bereich von Drohnen (E) und Arbeiterinnen (G). Hier sind dieselben drei Ommatidientypen wie im dorsalen Bereich des Arbeiterinnenauges (C, D) zu finden. **F** Schema der im ventralen Augenbereich beider Geschlechter vorkommenden Ommatidientypen.



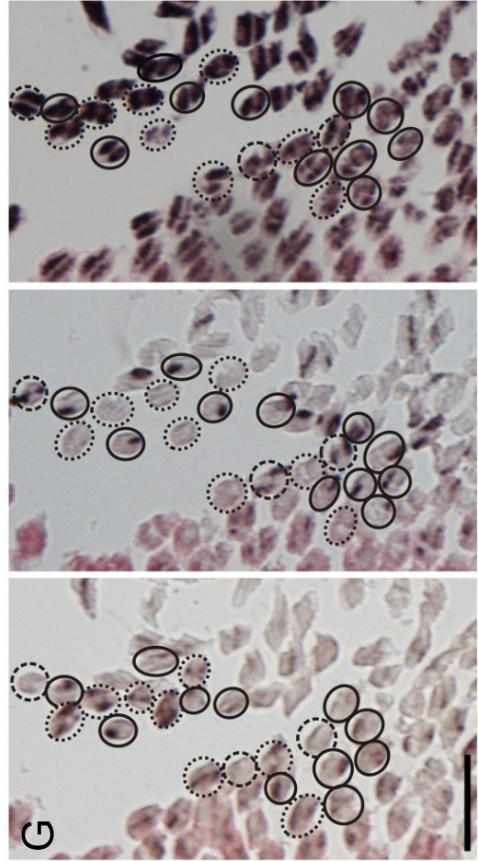
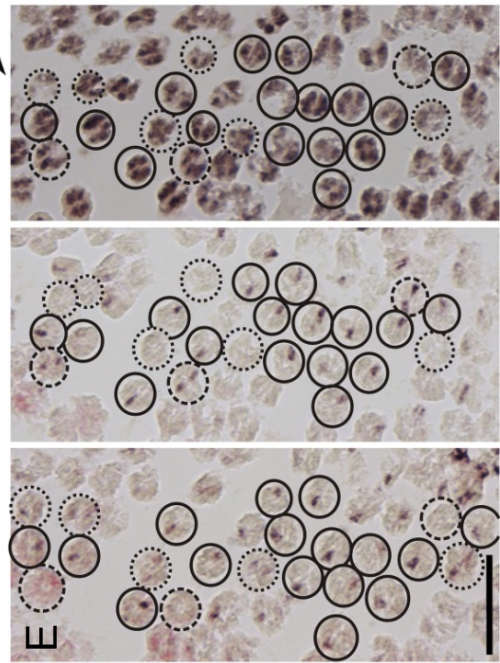
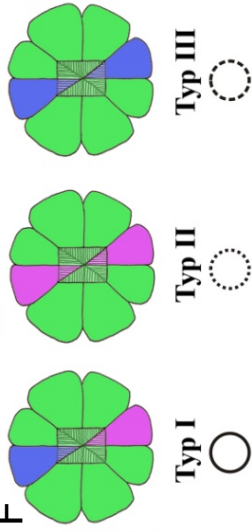
**Ommatidientypen im Dorsalbereich des Drohns**



**Ommatidientypen im Dorsalbereich der Arbeiterin**



**Ommatidientypen im Ventralbereich**



## ELEKTRONENMIKROSKOPIE

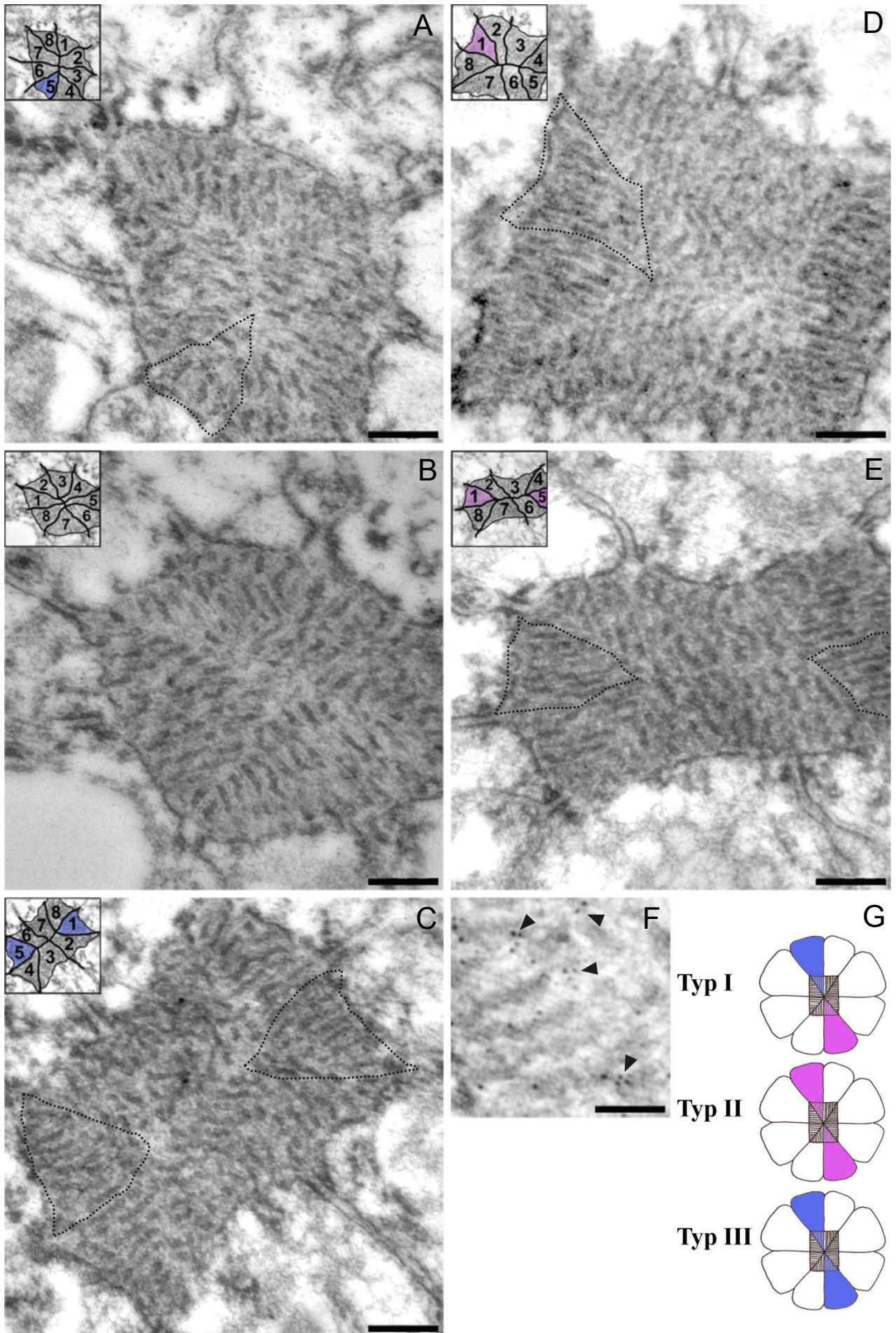
### Gold-Antikörper-Markierung für Immuno-Elektronenmikroskopie

Die Markierung der HM20-Ultradünnschnitte von Arbeiterinnenaugen mit  $\alpha$ -Opsin-Antikörpern zeigt Goldpartikel auf den Schnitten von zwei Grids, eines mit  $\alpha$ -UV AB und eines  $\alpha$ -BL AB markiert. Die Markierung mit  $\alpha$ -GR AB war nicht erfolgreich.

Auch hier wurden die drei bekannten Ommatidientypen gefunden (Abb. 8). Auf den mit  $\alpha$ -UV AB markierten Schnitten, wurden Rhabdome mit Goldpartikeln in einem (Typ I, Abb. 8 D), zwei (Typ II, Abb. 8 E) oder keinem Rhabdomer (Typ III, nicht gezeigt) gefunden. Komplementär dazu sind auf den mit  $\alpha$ -BL AB markierten Schnitten Goldpartikel in einem (Typ I, Abb. 8 A), keinem (Typ II, Abb. 8 B) oder zwei Rhabdomeren (Typ III, Abb. 8 C) pro Ommatidium vorhanden zu finden.

Die Verteilung der Goldpartikel zeigt, dass die Markierung des Opsins mittels anti-Opsin-Antikörpern sehr spezifisch und hauptsächlich im Rhabdomer vorhanden ist. Hintergrundmarkierung ist kaum vorhanden. Einige wenige Goldpartikel werden in den Zellen jener Rhabdomere gefunden, welche das betreffende Opsin enthalten. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um sekundäre Lysosome bzw. multivesikuläre Körper, welche Opsin enthalten (Suzuki & Hirosawa 1991).

**Abb. 8:** Ultradünnschnitte (70 nm) von Retinae von *Apis mellifera* Arbeiterinnen, markiert mit spezifischen Primärantikörper gegen Blau- (A, B, C) und UV-Opsin (D, E) und Sekundärantikörpern konjugiert mit 5 nm Goldpartikeln (Messbalken 0.2  $\mu$ m). Die gestrichelte Linie umrandet jene Rhabdomere in denen Goldpartikel zu sehen sind, die Inserts zeigen die Grenzen zwischen den einzelnen Rhabdomeren. **A, D** Ommatidium vom Typ I mit einem Blau- (A) und einem UV-Rezeptor (D). **B, E** Typ II-Ommatidium, welches zwei UV-Rezeptoren (E) und keinen Blau-Rezeptor (B) enthält. **C** Typ III-Ommatidium mit zwei Blaurezeptoren und keinem UV-Rezeptor. **F** Auf der Vergrößerung eines Ausschnittes der 5. Zelle von C sind die 5 nm-Goldpartikel deutlich zu erkennen (Pfeilkopf, Messbalken 0.1  $\mu$ m). **G** Schematische Darstellung der gefundenen Ommatidientypen.



**DISKUSSION**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Retina der Honigbienenarbeiterin drei Ommatidientypen enthält, welche sich bezüglich der Zusammensetzung der Fotorezeptoren unterscheiden. Nur in einem der drei Typen sind alle drei Fotorezeptortypen (Typ I: UV, Blau, Grün) vorhanden, während die beiden anderen Typen nur zwei Rezeptortypen enthalten (Typ II: UV & Grün; Typ III: Blau & Grün). Die Untersuchung des Drohnenauges zeigt, dass bei der Honigbiene ein Sexualdimorphismus bezüglich der Ommatidientypen und -verteilung existiert. Das Drohnenauge ist im Gegensatz zum Arbeiterinnenaug in zwei Bereiche unterteilt, welche sich in der Zusammensetzung der Fotorezeptoren in den Ommatidientypen unterscheiden. Die ventrale Retina setzt sich aus denselben drei Ommatidientypen wie die Arbeiterinnenretina zusammen. Im Dorsalbereich wurden neue, bisher unbeschriebene Ommatidientypen gefunden (Typ A-C).

Dass spektrale Heterogenität ein prinzipielles Baudesign von Komplexaugen ist, wurde mittlerweile mehrfach und bei verschiedensten Insektenarten gezeigt (z.B. bei Honigbienen: Wakakuka et al. 2005, Hummeln: Spaethe & Briscoe 2005, Grabwespen: Ribi 1978, Schmetterlingen: Arikawa 2003, Rückenschwimmern: Schwind et al. 1984). Obwohl schon sehr lange bekannt ist, dass die Honigbiene *Apis mellifera* Farben wahrnehmen kann und ein trichromatisches Sehsystem besitzen (von Frisch 1914), sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht restlos untersucht und aufgeklärt. Unter anderem sind weder die räumliche Anordnung noch die Funktion der spektralen Heterogenität der Ommatidien genau verstanden. Diese Arbeit zeigt, dass es neben den drei Ommatidientypen (Typ I-III), die in der Hauptretina der Arbeiterinnen und im ventralen Bereich des Drohnenauges vorkommen, und den beiden weiteren Typen, welche in der DRA der Arbeiterin vorkommen (Spaethe et al., unveröffentlichte Daten) noch mindestens drei weitere Ommatidientypen (Typ A-C) in der Dorsalregion des Drohnenauges vorkommen.

Im Gegensatz zum Arbeiterinnenaug gibt es im Drohnenauge eine klare Zonierung in einen Ventral- und Dorsalbereich (Menzel et al. 1991, Velarde et al. 2005). Die beiden Bereiche sind durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Fotorezeptoren klar voneinander unterscheidbar (Menzel et al. 1991, Peitsch et al. 1992, Velarde et al. 2005). Der ventrale Bereich ist aus denselben drei Ommatidientypen zusammengesetzt wie das Arbeiterinnenaug (Abb. 7). Mit diesem Teil erfüllt der Drohn ähnliche Aufgaben wie die Arbeiterin. Es ist die Zone, mit der der Nesteingang gesehen wird (van Praagh et al. 1980) und mit welcher auch Farbsehen möglich ist (Menzel et al. 1988). Der dorsale Bereich, der zwei Drittel des Auges ausmacht, unterscheidet sich dadurch, dass in jedem Ommatidium Blaurezeptoren; ein, zwei oder kein UV-Rezeptor; jedoch keine Grünrezeptoren gefunden wurden (Abb. 3, 4, 6, 7). Die drei Ommatidientypen des Dorsalbereichs wurden anhand der Anzahl der UV-Rezeptoren in drei Typen eingeteilt: Typ A mit einem, Typ B mit zwei und Typ C mit keinem UV-Rezeptor (Abb. 7 A, B). Bei der Markierung mit Antikörpern wie auch bei der *In situ* Hybridisierung war das Signal der Blau-Rhabdomere bzw. -Rezeptoren so

stark, dass keine einzelnen Zellen unterschieden werden konnten. Daher kann keine Aussage über die genaue Anzahl von Blaurezeptoren und damit etwaige in diesem Versuch nicht markierte Rezeptortypen gemacht werden. Da im dorsalen Bereich (fast) keine Grün-Rezeptoren gefunden wurden (Abb. 7 A, B) könnte es sein, dass ein zusätzlicher Rezeptortyp vorhanden ist, der ein Opsin exprimiert, das sich von den drei bekannten unterscheidet. Ein möglicher Kandidat wäre das zweite Langwellenopsin (Lop2), das bisher nur in den Ozellen von Arbeiterinnen gefunden wurde (Velarde et al. 2005). Velarde et al. (2005) fanden keine Expression dieses Opsins in der Retina von Arbeiterinnenaugen, die Expression von Lop2 im Drohnenauge kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Falls tatsächlich ein weiterer Rezeptortyp existieren sollte ist es wahrscheinlich, dass er sein spektrales Maximum im Langwellenbereich hat, da bei elektrophysiologischen Untersuchungen bisher keine von den drei Rezeptortypen der Arbeiterin abweichende Absorptionsmaxima gefunden wurden (Peitsch et al. 1992). Allerdings erscheint es bei genauerer Überlegung am wahrscheinlichsten, dass die dorsalen Dronenommadien sechs (Typ B), sieben (Typ A) oder acht (Typ C) Blaurezeptoren enthalten. Für eine endgültige Determinierung der Ommatidienzusammensetzung im dorsalen Drohnenauge sind allerdings zusätzliche ultrastrukturelle Untersuchungen notwendig.

Die präsentierten Ergebnisse bezüglich des Drohnenauges decken sich mit früheren elektrophysiologischen (Autrum & Zwehl 1962, 1963; Peitsch et al. 1992), funktionellen (Menzel et al. 1991) und molekularbiologischen Untersuchungen (Velarde et al. 2005), welche zeigten, dass im Auge des Drohns dorsal nur UV- und Blaurezeptoren jedoch keine Grünrezeptoren vorkommen. Nur bei einem Drohn wurden bei der immunohistochemischen Untersuchung mit  $\alpha$ -GR AB vereinzelte Fluoreszenzsignale im Dorsalbereich gefunden, welche jeweils ein Rhabdomer zeigten, in welchem Grünopsin exprimiert wird (Abb. 3). Bei der *In situ* Hybridisierung von Grün-Opsin-mRNA wurde hingegen keine Färbung im dorsalen Bereich gefunden (Abb. 6 C, 7 A). Es könnte sich bei dem einen Individuum, welches immunohistochemisch untersucht wurde, um eine Fehlexpression gehandelt haben, oder aber diese vereinzelten Grünrezeptoren wurden bei der *In situ* Hybridisierung nicht markiert. Da mit beiden Techniken nur jeweils ein Individuum detailliert untersucht werden konnte, sind hier weitere Untersuchungen mit höherer Individuenzahl nötig.

Mit Sicherheit gesagt werden kann, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der ventralen und dorsalen Region des Drohnenauges gibt. So unterscheiden sich diese Regionen neben den bisher bereits beschriebenen morphologischen Unterschieden (Ommatidien-durchmesser, Interommatidialwinkel, Länge der Rhabdome und Form und Fläche des Rhabdomquerschnittes; Menzel et al. 1991, van Praagh et al. 1980) auch in der Verteilung der drei Fotorezeptortypen, wie hier gezeigt werden konnte (Abb. 7).

Menzel et al. (1991) zeigt, dass sich mit den Größenunterschieden der Rhabdome auch die Facettengröße ändert, welche äußerlich auf der Cornea sichtbar ist. Dabei wurde eine schmale Zone gefunden, wo zwei Gruppen von Facetten unterschiedlicher Größe aufeinander treffen (Menzel et al. 1991, Seidl 1982). Diese Zone wurde als „eye equator“ (Augenäquator)



bezeichnet und befindet sich zwischen dem unteren Augendrittel und dem dorsalen restlichen Auge (Menzel et al. 1991, Abb. 2 & 3). Die Lage dieser Linie lässt sich auch anhand der unterschiedlichen Epifluoreszenz bei Beleuchtung mit blauem Licht bestimmen (Menzel et al. 1991). Die Grenze zwischen ventralem und dorsalem Bereich der Drohnenauges, wie sie in dieser Arbeit anhand der unterschiedlichen Fotorezeptorverteilung beschrieben wurde, liegt ebenfalls über dem ventralen Augendrittel. Sie deckt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Augenäquator. Die Existenz einer Übergangszone bezüglich der Verteilung der Fotorezeptoren zwischen dorsalem und ventralem Bereich, in welcher nur Blaurezeptoren vorkommen (Peitsch et al. 1992), kann nicht bestätigt werden.

Es ist anzunehmen, dass es sich bei den dorsalen Modifikationen des Drohnenauges um Anpassungen an das Paarungsverhalten handelt. Diese dorsale Region ist durch große Facettendurchmesser und kleine Interommatidialwinkel ausgezeichnet, was in einer höheren räumlichen Auflösung resultiert. Sie eignet sich daher gut für die Verfolgung kleiner Objekte, wie beispielsweise einer Königin (Menzel et al. 1991). Da die Drohnen ausschließlich den oberen frontalen Bereich des Auges für die Fixierung der Königin beim Hochzeitsflug nützen, ist die höhere räumliche Auflösung in diesem Bereich sinnvoll. Der Hochzeitsflug findet in den frühen Nachmittagsstunden ausschließlich bei Schönwetter stattfindet, daher muss die Königin gegen den hellen Himmel wahrgenommen werden können. Dies bietet einen hohen Kontrast und vermindert Detektionsprobleme (van Praagh et al. 1980). Da sich das Himmelslicht vorwiegend aus Licht im ultravioletten und blauen Wellenlängenbereich zusammensetzt, ist es sinnvoll diese Augenregion mit Rezeptoren auszustatten, die für diesen Wellenlängenbereich maximal empfindlichen sind (siehe oben).

Durch die Vergrößerung des Linsen- und des Rhabdomdurchmessers ist die Lichtempfindlichkeit der dorsalen Ommatidien stark erhöht. So erzeugt ein dunkles Objekt, wie die Königin, den stärksten Kontrast gegen den blauen Himmel für die UV- und Blaurezeptoren. Außerdem gibt es eine weitere Besonderheit des Dorsalbereichs. Hier ist das Schirmpigment rötlich und vor allem auch für längerwelliges (grünes) Licht durchlässig, während es im Ventralbereich dunkel und daher prinzipiell undurchlässiger ist (Menzel et al. 1991). Das rötliche Schirmpigment im Dorsalbereich absorbiert gestreutes Licht weit weniger effektiv. Dadurch kann nicht absorbiertes Licht höherer Wellenlängen von Metarhodopsin absorbiert werden. Dieses entsteht aus Rhodopsin bei der Absorption von Licht und wird durch die Absorption von Licht höherer Wellenlänge wieder in den erregbaren Zustand des Rhodopsins zurück konvertiert. Durch diese Regenerierung ist es möglich Rhodopsin schneller für die vorhandenen UV- und Blau-Rezeptoren wieder zur Verfügung zu stellen, deren Sensitivität wird dadurch zusätzlich erhöht (Stavenga 1992).

Optische Eigenschaften des dioptrischen Apparates limitieren außerdem die räumliche Auflösung (Beugung, chromatische Abberation). Diese Fehler sind für kurzwelliges Licht geringer. Dadurch dass im Dorsalbereich nur zwei Kurzwellenrezeptortypen vorhanden sind, kann die räumliche Auflösung möglicherweise verbessert werden (Land 1995, Land & Nilsson 2002).

Eine weitere Frage, die sich durch das Fehlen von Grünrezeptoren im Dorsalbereich aufwirft, bezieht sich auf das Bewegungssehen. Bei der Honigbiene ist der Grün-Rezeptor als jener Rezeptortyp bekannt, welcher den Input für den Bewegungskanal liefert (Srinivasan 1989). Es ist daher fraglich, ob im Dorsalbereich der Drohnenretina Bewegungssehen überhaupt möglich ist und wenn ja, welcher Rezeptortyp diese Funktion übernimmt.

Bei den Arbeiterinnen kommen die drei Ommatidientypen in der gesamten Retina außer der DRA vor, ihr Verhältnis unterscheidet sich allerdings je nach betrachteter Augenregion. Verglichen mit den Ergebnissen von Wakakuwa et al. (2005) unterscheiden sich die Resultate der Auszählung der unterschiedlichen Farbrezeptoren pro Ommatidium (Tab. 2). In beiden Arbeiten war Ommatidientyp II (2 UV-Rezeptoren) der häufigste und Typ III (2 Blau-Rezeptoren) der seltenste, allerdings unterscheiden sich die in dieser Arbeit ermittelten Werte für Typ I (36.6%) und Typ II (50.1%) von jenen in der Literatur (Typ I mit 44.0 % und Typ II mit 46.1%; Wakakuwa et al. 2005). Dies lässt sich einerseits mit möglichen individuellen Schwankungen in der Verteilung und andererseits mit der unterschiedlichen Anzahl der ausgezählten Ommatidien erklären (519 vs. 2696 in der Literatur). Weiters wurde die Arbeiterinnenretina bei Wakakuwa et al. (2005) in jeweils zwei am distalen Augenrand gelegenen kleinere dorsale und ventrale Bereiche und einen verhältnismäßig großen ungeteilten frontalen Bereich unterteilt. In dieser Arbeit wurde das Auge hingegen in einen ventralen und dorsalen Bereich geteilt, wodurch die Daten nicht direkt vergleichbar sind, da die feinere Unterteilung bei Wakakuwa et al. (2005) nicht direkt mit der dorso-frontalen Aufteilung in dieser Arbeit verglichen werden können. Rechnet man allerdings die beiden ventralen Bereiche zusammen, so ergibt sich für Typ III mit 13.8% der selbe Wert wie in dieser Arbeit. Der Wert der dorsalen Bereiche (4.3%) weicht aber stark von den hier gefundenen 11.5% ab, da in den am Rand gelegenen dorsalen Bereichen weniger Typ III-Ommatidien gefunden wurden.

Vergleicht man die Verteilung der Ommatidientypen des ventralen Bereichs zwischen Arbeiterinnen und Drohnen, so fällt auf, dass bei der Arbeiterin Typ II am häufigsten und Typ I am zweithäufigsten vorkommt. Beim Drohn zeigt sich hingegen dass Typ I, welcher alle drei Rezeptortypen enthält, am häufigsten vorkommt. Und obwohl Typ III beim Drohn wie bei der Arbeiterin am seltensten gefunden wurde, so kommt er beim Drohn doch häufiger vor (Tab. 2). Da die Drohnen nur im unteren ventralen Augendrittel alle drei Rezeptortypen besitzen und auch nur in dieser Region trichromatisches Farbsehen möglich ist (Menzel et al. 1988), ist es für den Drohn durchaus von Vorteil hier auch jenen Ommatidientypen am häufigsten zu expremieren, welcher alle drei Rezeptortypen enthält. Im Dorsalbereich kommen die Ommatidientypen A, B und C im Vergleich mit der Ventralregion etwas ausgewogener vor. Hier ist Typ A, welcher einen UV-Rezeptor enthält, auch der häufigste, jedoch macht Typ C (ohne UV-Rezeptor) immerhin knapp über 27% aus. Wieso die Verteilung im dorsalen Bereich des Drohnenauges keine Konzentration eines Ommatidientyps zeigt, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Zudem ist weitgehend unerforscht, welche Funktion die UV-Rezeptoren in dieser Augenregion übernehmen.

Bezüglich der DRA konnten in dieser Arbeit weitere Hinweise darauf gefunden werden, dass sich dort wie in der Literatur schon mehrfach angenommen, mehr UV-Rezeptoren befinden (Labhardt 1980, Labhardt & Meyer 1999). Die Methode der Lichtmikroskopie bietet allerdings eine zu geringe Auflösung, um die Zusammensetzung der Fotorezeptoren in den Ommatidien zeigen zu können. Hier würde Ultrastruktur und die Anwendung von Elektronenmikroskopie in Kombination mit Immuno-Gold-Markierung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, mehr Klarheit bringen. Dies gilt auch für die Erforschung der spektralen Eigenschaften der verkürzten neunten Zelle. Die Technik des Hochdruckgefrierens von Gewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf Bienenaugen angewendet. Die verwendeten Protokolle müssten für weitere Untersuchungen noch besser auf dieses Gewebe adaptiert werden um optimale Ergebnisse zu erzielen. Dafür wäre es auch nötig, die Ursache dafür zu finden, dass lediglich mit dem  $\alpha$ -BL AB gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Markierung mit  $\alpha$ -GR AB zeigte nur einmal ein sehr schwaches Signal. Der  $\alpha$ -UV AB funktionierte nur im Rahmen der Immuno-Gold-Markierung für die Elektronenmikroskopie, nicht jedoch bei den Cryoschnitten. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine Maskierung der Epitope im Rahmen des angewendeten Protokolls, oder dass überhaupt zu wenig Epitope für eine sichtbare Markierung vorhanden sind. Trotzdem ist die Verwendung der Antikörpermarkierung auf lichtmikroskopischem Niveau wichtig und unersetzbar als Voraussetzung für die Elektronenmikroskopie.

Nahezu dasselbe gilt für die *In situ* Hybridisierungen. Mit dieser Technik sind die einzelnen Zellen im Querschnitt etwas besser auflösbar. Wenn allerdings viele Zellen eines Rhabdoms gefärbt und die Zellgrenzen nicht gut sichtbar sind, ist es nicht möglich eine sichere Aussage über ihre Zugehörigkeit zu machen (siehe oben). Daher müssten zur weiteren Untersuchungen der DRA und der Dorsalregion des Drohns elektronenmikroskopische Techniken angewendet werden. Dabei empfiehlt es sich zur besseren Sichtbarkeit Antikörper zu wählen, die mit größeren Goldpartikeln konjugiert sind (z.B. 10 nm Gold), oder ein Silber-Enhancement durchzuführen.

Zusammenfassend bestätigt die Untersuchung der Hauptretina der Arbeiterinnen die bisher bekannten Ergebnisse und gibt weitere Hinweise darauf, dass die DRA bei beiden Geschlechtern wie bisher angenommen mehr UV-Rezeptoren pro Ommatidium enthält als die restliche Retina. Für das Drohnenaugen konnte erstmals auf Zellniveau gezeigt werden, dass das Auge deutlich in zwei Regionen unterteilt ist. Eine Ventralregion, in der die Rezeptorenzusammensetzung jener des Arbeiterinnenauges gleicht, und eine anders gestaltete Dorsalregion. In dieser befinden sich deutlich mehr Blau-Rezeptoren als in der Ventralregion, jedoch keine Grün-Rezeptoren. Bezüglich der UV-Rezeptoren wurden drei neue Ommatidientypen aus dieser Augenregion beschrieben. Solche die einen (Typ A), zwei (Typ B) oder keinen (Typ C) UV-Rezeptor enthalten. Um die genaue Zusammensetzung der Fotorezeptoren in den Ommatidien des Dorsalbereichs des Drohns und der DRA beider Geschlechter zu untersuchen, müsste die hier angewendete Technik der Immuno-Elektronenmikroskopie weiter entwickelt und optimiert werden.

**LITERATUR**

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Arikawa K.** (2003). Spectral organization of the eye of a butterfly, *Papilio*. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 791-800.
- Autrum H. & von Zwehl V.** (1962). Zur spektralen Empfindlichkeit einzelner Sehzellen der Dohne (*Apis mellifica* ♂). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 46: 8-12.
- Autrum H. & von Zwehl V.** (1963). Ein Grünrezeptor im Drohnenauge (*Apis mellifica* ♂). *Naturwissenschaften* Vol. 50: 698.
- Carlson S.D. & Chi C.** (1979). The functional morphology of the insect photoreceptor. *Annual Reviews of Entomology* 24: 379-416.
- Eckert R., Randall D., Burggren W. & French K.** (2002). *Tierphysiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4. Auflage: 275-297.
- Von Frisch K.** (1914). Der Farbensinn und Formensinn der Biene. *Zoologische Jahrbücher (Physiologie)* 37: 1-238.
- Von Frisch K.** (1965). *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gribakin F.G.** (1975). Functional morphology of the compound eye of the bee. In: Horridge G.A. (ed). *The compound eye and vision of the insects*. Clarendon Press, Oxford: 154-176.
- Von Helverson O. & Edrich W.** (1974). Der Polarisationsempfänger im Bienenaugenauge: ein Ultraviolettzeptor. *Journal of Comparative Physiology* 94: 33-47.
- Land M.F. & Nilsson D.-E.** (2002). *Animal eyes*. Oxford University Press, Oxford.
- Labhart T.** (1980). Specialized photoreceptors at the dorsal rim of the honeybee's compound eye: Polarizational and angular sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 141: 10-30.
- Labhart T. & Meyer E.P.** (1999). Detectors for polarized skylight in insects: A survey of ommatidial specializations in the dorsal rim area of the compound eye. *Microscopy Research and Technique* 47: 368-379.
- Maksimovic S., Cook T.A. & Buschbeck E.K.** (2009). Spatial distribution of opsin – encoding mRNAs in the tiered larval retinas of the sunburst beetle *Thermonectus marmoratus* (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Experimental Biology* 212: 3781-3794.

- Menzel J.G., Wunderer H. & Stavenga D.G.** (1991). Functional morphology of the divided compound eye of the honeybee drone (*Apis mellifera*). *Tissue and Cell* 23: 525-535.
- Menzel R.** (1975). Polarisation sensitivity in insect eyes with fused rhabdomes. In: Snyder A.W. & Menzel R. (eds.) *Photoreceptor Optics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 372-387.
- Menzel R. & Backhaus W.** (1991). Colour vision in insects. In: Gouras P. (ed) *Vision and visual dysfunction (Vol. 7): Perception of colour*. Macmillan, London: 262-288.
- Menzel R., Backhaus W., Chittka L. & Hoffman M.** (1988). Honeybee drones are trichromates. In: Elsner N. & Barth F.G. (eds.). *Sense organs*. Thieme Stuttgart: 217.
- Menzel R. & Blakers M.** (1975). Color receptors in bee eye – Morphology and spectral sensitivity. *J Comp Physiol* 108: 11-33.
- Menzel R. & Snyder A.W.** (1974). Polarised light detection in the bee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology* 88: 247-270.
- Van Praagh J.P., Ribi W., Wehrhahn C. & Wittmann D.** (1980). Drone bees fixate the queen with the dorsal frontal part of their compound eyes. *Journal of Comparative Physiology A* 136: 263-266.
- Peitsch D., Fietz A., Hertel H., de Souza J., Ventura D.F. & Menzel R.** (1992). The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A* 170: 23-40.
- Qiu X., Vanhoutte K.A.J., Stavenga D.G. & Arikawa K.** (2002). Ommatidial heterogeneity in the compound eye of the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *Cell and Tissue Research* 307: 371-379.
- Reipert S. & Wiche G.** (2008). High-pressure freezing and low-temperature fixation of cell monolayers grown on sapphire coverslips. *Methods in Cell Biology* 88: 165-180.
- Ribi W.A.** (1978). A unique hymenopteran compound eye. The retina fine structure of the digger wasp *Sphex cognatus* Smith (Hymenoptera, Sphecidae). *Zoologisches Jahrbuch der Anatomie* 100: 299-342.
- Ribi W.A., Engels E. & Engels W.** (1988). Sex and caste specific eye structures in stingless bees and honeybees (Hymenoptera: Trigonidae, Apidae). *Entomologia Generalis* 14: 233-242.
- Scharstein H. & Stommel G.** (1999). Photorezeption. In: Dettner K. & Peters W. (eds.). *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag: 320-348.
- Schinz R.H.** (1975). Structural specialization in the dorsal retina of the bee, *Apis mellifera*. *Cell and Tissue Research* 162: 23-34.

- Schwind R., Schlecht P. & Langer H.** (1984). Microspectrophotometric characterization and localization of three visual pigments in the compound eye of *Notonecta glauca* L. (Heteroptera). *Journal of Comparative Physiology A* 116: 183-207.
- Seidel R.** (1982). Die Sehfelder und Ommatidiendivergenzwinkel von Arbeiterin, Königin und Drohn der Honigbiene (*Apis mellifica*). In: Menzel et al. (1991). *Tissue and Cell* 23 (4): 525-535.
- Spaethe J. & Briscoe A.D.** (2005). Molecular characterization and expression of the UV opsin in bumblebees: three ommatidial subtypes in the retina and a new photoreceptor organ in the lamina. *Journal of Experimental Biology* 208: 2347-2361.
- Srinivasan M.V.** (1989). Motion sensitivity in insect vision: roles and neural mechanisms. In: Singh R.N. & Strausfeld N.J. (eds.). *Neurobiology of Sensory Systems*. Plenum Publishing Corporation New York, London: 97-106.
- Suzuki E. & Hirosawa K.** (1991). Immunoelectron microscopic study of opsin distribution in the photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Electron Microscopy* 40: 187-192.
- Stavenga D.G.** (1992). Eye regionalization and spectral tuning of retinal pigments in insects. *Trends in Neuroscience* 15 (6): 213-218.
- Vallet A.M. & Coles J.A.** (1993). The perception of small objects by the drone bee. *Journal of Comparative Physiology A* 172: 183-188.
- Velarde R.A., Sauer C.A.D., Walden K.K.O, Fahrbach S.E. & Robertson H.M.** (2005). Pteropsin: A vertebrate-like non-visual opsin expressed in the honey bee brain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1367-1377.
- Verkade P.** (2008). Moving EM: The Rapid transfer system as a new tool for correlative light and electron microscopy and high throughput for high-pressure freezing. *Journal of Microscopy* 230: 317-328.
- Wakakuwa M., Kurasawa M., Giurfa M. & Arikawa K.** (2005). Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften* 92: 464-467.
- Wehner R., Bernhard G.D. & Geiger E.** (1975). Twisted and non-twisted rhabdomes and their significance for polarization detection in the bee. *Journal of Comparative Physiology* 104: 225-245.
- Beebase** (2010). Hymenoptera Genome Database. Online: <http://genomes.arc.georgetown.edu/drupal/beebase/>. 16.02.2010.
- GenBank** (2010). National Center for Biotechnology Information. Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. 16.02.2010.

**ABSTRACT**

Spectral heterogeneity seems to be a common design of the insect compound eye. In honeybee workers of *Apis mellifera*, three photoreceptor types - with absorption maximum in the UV, blue and green range of wavelength spectrum - are distributed heterogeneously in the ommatidia. The three known types of ommatidia each contain six green receptors and either two UV, two blue or one UV and one blue receptor. The spectral quality of the short ninth cell at the base of the ommatidium remains unclear. The spectral heterogeneity in drones' eyes has not yet been examined on the cellular level. Based on morphological, physiological and molecular biological data, it is known that the eye is divided in two distinct areas, which are used in different contexts. Likewise, in the dorsal rim area (DRA), a region used for polarization vision in both sexes, there is strong evidence that the photoreceptor distribution differs from the main retina.

The sex-specific differences of photoreceptor distribution in different eye areas of workers and drones were examined with immunohistochemical, molecular biological and ultrastructural techniques. In the main retina of workers, the three known ommatidia types were found. The same three types were found in the ventral area of the drone's eye. In the dorsal area three new ommatidia types with respect to the number of UV-receptors (none, one or two) were identified. Additionally, they contain, in contrast to the known types, blue receptors in all ommatidia while green receptors are absent. It can be assumed that these dorsal modifications are adaptations for mating behavior. Additionally, there is evidence that the DRA of both sexes contains more UV receptors in each ommatidium than in the main retina.

**ZUSAMMENFASSUNG**

Spektrale Heterogenität scheint ein verbreitetes Bauprinzip der Komplexaugen von Insekten zu sein. So sind auch bei der Arbeiterin der Honigbiene *Apis mellifera* die drei Fotorezeptortypen, welche ihr Absorptionsmaximum im ultravioletten (UV), blauen bzw. grünen Wellenlängenbereich haben, unterschiedlich häufig in verschiedenen Ommatidien zu finden. Es gibt drei Ommatidientypen welche neben sechs Grün-Rezeptoren mit zwei UV-, einem UV- und einem Blau- oder zwei Blau-Rezeptoren ausgestattet sind. Die spektralen Eigenschaften der neunten und nur basal am Rhabdom teilhabenden Zelle sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Die Heterogenität im Auge der Drohnen wurde bis heute nicht auf Zellebene untersucht bzw. beschrieben. Bekannt ist aufgrund morphologischer, physiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen, dass das Drohnenauge in zwei sich stark unterscheidende Regionen unterteilt ist. Auch für die dorsale Randregion (DRA), welche bei beiden Geschlechtern vorkommt und dem Polarisationssehen dient, gibt es Evidenzen, dass sich die Zusammensetzung der Fotorezeptoren unterscheidet.

Mit Hilfe immunohistochemischer, molekularbiologischer und ultrastruktureller Techniken wurden die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Augenregionen beschrieben. Dabei wurden in der gesamten Arbeiterinnenretina die drei bekannten Ommatidientypen gefunden. Diese konnten auch in der Ventralregion der Drohnenretina nachgewiesen werden. In der Dorsalregion wurden drei weitere Ommatidientypen entdeckt, welche sich in der Anzahl der UV-Rezeptoren (zwei, einem oder keinem) unterscheiden. Außerdem sind im Gegensatz zu den bekannten Typen in allen Ommatidien Blau-, jedoch keine Grün-Rezeptoren enthalten. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesen dorsalen Modifikationen des Drohnenauges um Anpassungen an das Paarungsverhalten handelt. Weiters wurden in der Retina beider Geschlechter Hinweise darauf gefunden, dass in der DRA mehr UV-Rezeptoren pro Ommatidium vorhanden sind.



## **APPENDIX**

### **VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN**

- 10x PBS („phosphate buffered saline“, 1L pH=7.4):

30.0 g NaCl  
2.0 g KCl  
28.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **Fluoreszenz Antikörper-Markierung für Lichtmikroskopie**

- Blockierlösung zur Inkubation mit dem primären Antikörper:

1.5 - 4% normal goat serum (Sigma-Aldrich)  
0.1 - 0.3% Triton® X-100  
in 1xPBS

### **In situ Hybridisierung**

- Hybridisierungspuffer:

0.3 mol/L NaCl  
2.5 mmol/L EDTA  
20 mmol/L Tris (pH=8)  
50% Formamid  
10% Dextransulfat  
1x Denhardt's Medium  
100 µg/mL Lachssperma DNA)

- Denhardt's Medium (50 mL):

0.5 g Ficoll 400  
0.5 g Polyvinylpyrrolidone  
0.5 g BSA (bovine serum albumin)  
46.7 mL RNase-freies d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O

- 20x SSC (Standard Saline Citrate, 500 mL):

87.66 g NaCl  
53.57 g Na-Citrat  
440.3 mL d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O

- PBX:

0.1% Triton X-100 in 1xPBS

- Blockierlösung:

1.5% normal goat serum in PBX

**Immunogold-Markierung für Elektronenmikroskopie**- Niedrigtemperatur-Harz HM20 (Polysciences, Inc.):

2.98g Crosslinker D  
17.02g Monomer E  
0.10g Initiator C+

- Glycin-Blockierlösung:

0.05M Glycin in 1xPBS

- Protein-Blockier-Puffer:

50 mg/mL BSA  
5% normal goat serum,  
0.002% cold water fish gelatin  
in 1xPBS

- Inkubations-Puffer (pH=7.4):

8mg/mL BSA  
0.002% cold water fish gelatin  
1xPBS



**DANKSAGUNG**

Ich danke meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund für die Unterstützung, die Motivation und den Zuspruch vor und während des Studiums. Auch für die Stärkung und das Verständnis während und am Ende der Diplomarbeit möchte ich allen, besonders aber meinem Freund, danken.

Weiterer Dank gebührt allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für Hilfe, Rat und vor allem mentale Unterstützung und Stärkung. Auch Martin Hepner bin ich dafür dankbar, dass er dafür gesorgt hat, dass ich während dieser ganzen Zeit meinen Humor nicht verloren habe.

Zu tausend Dank bin ich außerdem allem verpflichtet, die mich während der Arbeit mit Rat, Tat und Material unterstützt haben:

- Adriana Briscoe von der University of California, Irvine, für das zur Verfügung stellen der anti-Opsin-Antikörper.
- Der Arbeitsgruppe um Ulrich Technau, vor allem Grigory Genikhovich und Patrick Steinmetz, nicht nur für die wirklich enorme Hilfe sondern auch fürs zur Verfügung stellen von Materialien und die Nutzungserlaubnis für ihre Laborgeräte.
- Jaqueline Montanaro und Siegfried Reipert für den Kurs „Hands-on Cryo Electron Microscopy and Tissue in-situ Hybridization Techniques“ im Wintersemester 2009/10 und die Nachbetreuung in jeder Hinsicht.
- Erneut Siegfried Reipert und Harald Kotisch vom Max F. Perutz-Institut für Hilfe und Unterstützung bei der Anwendung der neu gelernten Techniken HPF gekoppelt mit FS und die Einbettung in Lowicryl, zudem für die Unterstützung, Hilfe und Rat beim Schneiden des benutzerunfreundlichen HM20.
- Der Abteilung für Ultrastruktur und Elektronenmikroskopie, vor allem Daniela Gruber, Vanessa Zheden und Niko Leisch, welche mir viele nützliche Tipps und Ratschläge bei der Handhabung des Elektronenmikroskops und dem Umgang mit Ultradünnschnitten gegeben haben.
- Niels Heindl fürs Anfertigen der Sonden für die *In situ* Hybridisierung und die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der ersten *In situ* Hybridisierungs-Versuche.
- Ulrich Dirks für das offene Ohr und die Tipps für die Antikörpermarkierungen und das Trouble shooting, auch für die Bestärkung meines Tuns.
- Flo Etl und Martina Knapp fürs zur Verfügung stellen der Bienen und die Hilfe beim Auftreiben von Drohnen und Königinnen.

Dank auch an Prof. Hannes Paulus, dass ich die Arbeit am Department für Evolutionsbiologie durchführen durfte. Zuletzt möchte ich mich noch bei Johannes Spaethe für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung bedanken. Ich habe wirklich viel gelernt!

## LEBENS LAUF

<b><u>ANGABEN ZUR PERSON</u></b>	
<b>Name</b>	Sarah Maria Pfabigan
<b>e-mail</b>	sarah.pfabigan@gmx.net
<b>Geburtsort</b>	Dinslaken/Deutschland
<b><u>SCHUL- UND BERUFSBILDUNG</u></b>	
<b>1988-1991</b>	Öffentliche Volksschule
<b>1991-1995</b>	Bundesrealgymnasium und Wirtschaftskundliches Bundesrealgymnasium 16
<b>1995-2000</b>	Bildungsanstalt für Kindergartenpädagogik 8
14.06.2000	Reife- und Diplomprüfung für Kindergärten und Horte
<b>2004-2010</b>	Universität Wien
	Studienrichtung Biologie
Ab 01.06.2006	Studienrichtung Zoologie (Stzw.)
<b>Diplomarbeit</b>	„Geschlechtsspezifische Verteilung der Fotorezeptoren im Auge der westlichen Honigbiene <i>Apis mellifera</i> L., 1758 (Apidae, Hymenoptera)
<b><u>BERUFSERFAHRUNG</u></b>	
<b>21.08.2000-30.09.2004</b>	Kindergartenpädagogin Wiener Kinderfreunde
<b>Ab 2005</b>	Lernunterstützung, Kindergarten- und Hortpädagogin Wiener Kinderfreunde
<b><u>STUDIENBEZOGENE AKTIVITÄTEN</u></b>	
<b>09.-12.10.2009</b>	Teilnahme an der IUSI
<b>20.03.2010</b>	Vortrag im Rahmen des Kolloquium der Österreichischen Entomologischen Gesellschaft

Wien, am 10. August 2010

gezeichnet Sarah Pfabigan