

DER METASOMALE LICHTSINN DES SKORPIONS:

EINE IMMUNHISTOLOGISCHE UND FEINSTRUKTURELLE UNTERSUCHUNG

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Kirsten Schuchardt
aus Hamburg

Frankfurt 2003
(D F 1)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe "Neurobiologie Circadianer Rhythmen" (NCR) von Prof. Dr. Günther Fleissner und Dr. Gerta Fleissner angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich für die äußerst herzliche und persönliche Aufnahme, die exzellente Betreuung, die ausgiebige und kreative Diskussionsbereitschaft sowie die hervorragende Zusammenarbeit bei Dr. Gerta Fleissner und Prof. Dr. Günther Fleissner bedanken. Bei Edeltraud Thielen und Marion Stöhr, die mich bei der Ausführung der immunhistologischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten fachmännisch unterstützt haben, möchte ich mich für die kompetente und stete Hilfe so wie die fröhliche Zusammenarbeit bedanken. Martin Thomas und Thomas Gbenro danke ich für ihre gruppeninterne Unterstützung und allzeit bereite Hilfe jeglicher Art. Prof. Dr. Geetha Bali danke ich für die Einführung in das Thema dieser Arbeit. Bei Prof. Dr. Barbara Battelle möchte ich mich für die großartige und herzliche Unterstützung während meines dreiwöchigen Aufenthaltes in ihrem Labor im Whitney Laboratory in St. Augustin, Florida, USA bedanken. Prof. Dr. Phil Brownell danke ich für die Beschaffung und Überlassung der in dieser Arbeit untersuchten Skorpione. Frau Nöhring sei gedankt für die gute Versorgung dieser Tiere. Priv. Doz. Dr. Helmut Brandstätter danke ich, dass ich in seinem Labor die für diese Arbeit notwendigen Gefrierschnitte anfertigen konnte und dass Elektronenmikroskop des MPI (Max-Planck Institutes für Hirnforschung Frankfurt) unter der Leitung von Herrn Hofer benutzen konnte. Prof. Dr. Leo Peichel, Prof. Dr. Richard White, Prof. Dr. Larry Donoso und Prof. Dr. Barbara Battelle danke ich für die zur Verfügungstellung von den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich in allem so unterstützt und gefördert haben, wie man es sich nur wünschen kann. Danke! Meinem Mann Christian möchte ich für die jahrelange Unterstützung und den einmaligen Beistand in allen Situationen dieser Arbeit danken. Meinem Bruder Peer Dammann danke ich für die hervorragende computertechnische Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Großer Dank gilt auch unserer Tochter Franziska, die mir mit ihrer Fröhlichkeit und unkomplizierten Art geholfen hat.

Die Arbeiten an dem Projekt wurden unterstützt von dem Graduiertenkolleg der "Neuronalen Plastizität" der Johann Wolfgang Goethe-Universität am Main so wie durch ein Stipendium der Graduiertenförderung des Landes Hessen. Der Society for Research on Biological Rhythms danke ich für ein Reisestipendium zum internationalen Kongress der Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) in Amelia Island, Florida, USA. Der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft danke ich für das Stipendium, um meine Ergebnisse auf der internationalen Göttinger Neurowissenschaftlichen Tagung zur Diskussion zu stellen und dem Graduiertenkolleg „Neuronale Plastizität" für die Reisestipendien zu den Kongressen der „International Conference on

Invertebrate Vision“ in Lund, Schweden und der „Central European Conference of Neurobiology“
in Krakau, Polen.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
I.1	Allgemeine Einleitung	1
II.	HINTERGRUNDINFORMATIONEN	7
II.1	Neuroanatomie der Skorpione.....	7
II.2	Immunhistologie bei Photorezeptoren.....	8
II.2.1	Antikörper gegen Enzyme aus der Phototransduktionskaskade.....	10
II.2.2	Neuronale Transmitter der Photorezeptoren.....	13
III.	MATERIAL UND METHODEN	15
III.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	15
III.2	Präparation	16
III.3	Immunhistologische und -cytologische Methoden	17
III.3.1	Immunhistochemische Markierungen.....	17
III.3.2	Kontrollversuche zu den immunhistochemischen Untersuchungen	22
III.4	Konventionelle Elektronenmikroskopie	23
III.4.1	Flacheinbettung in Araldit	23
III.4.2	Semidünnschnitte.....	23
III.4.3	Ultradünnschnitte.....	23
III.4.4	Identifizierung der ultrastrukturell untersuchten Sinneszellbereiche.....	24
III.5	Auswertung	24
IV.	ERGEBNISSE	26
IV.1	Immunhistologische Untersuchungen.....	26
IV.1.1	Immunreaktivität gegen Enzyme der Phototransduktionskaskade	27
IV.1.2	Immunreaktivität gegen afferente und efferente Transmitter von Photorezeptoren	32
IV.1.3	Immunreaktivität gegen regulatorische Enzyme des Membranumbaus	33
IV.2	Elektronenmikroskopische Ergebnisse über den metasomalen Lichtsinn	35
IV.2.1	Feinstruktur der Rezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns	35
IV.2.2	Exogene und endogene Veränderungen der Feinstruktur der Rezeptorzellen.....	38
V.	DISKUSSION	41
V.1	Spezifität der verwendeten Nachweisverfahren.....	42
V.1.1	Antikörper	43
V.1.2	Lichtabhängige Feinstrukturänderungen in Zellen der metasomalen Ganglien.....	45
V.2	Zellgruppen in metasomalen Ganglien des Skorpions als Rezeptororgane des metasomalen Lichtsinns	46
V.2.1	Position und allgemeine Struktur der Lichtsinneszellen	46
V.2.2	Strukturelle und immunhistologische Evidenzen für Photorezeption von bestimmten metasomalen Zellen des Skorpions	47

V.2.3	Cilie versus rhabdomere Photorezeptoren - ein Ausschlusskriterium?.....	52
V.3	Afferente und efferente Verschaltungsmuster des metasomalen Lichtsinns und Hinweise auf seine mögliche Funktion.....	54
V.3.1	Axonverbindungen der ML-Zellen.....	54
V.3.2	Vergleich der Struktur und neuronalen Vernetzung der gefundenen Bauchmarkzellen mit den bisher bekannten rezeptor-physiologischen Eigenschaften des ML.....	56
V.4	Ein Ausblick: Mögliche Bedeutung des metasomalen Licht-sinns, insbesondere bei der Zeitgeberperzeption im circa-dianen Uhrensystem des Skorpions.....	57
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	62
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	64
 Anhang		
	Verwendete Rezepturen	i
	Verwendete Chemikalien mit Quellenangabe	x
	Antikörperliste	xi
	Abkürzungsverzeichnis	xiii



I. EINLEITUNG

I.1 Allgemeine Einleitung

Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten ist Photorezeption ein weit verbreitetes Phänomen, das in einer Vielzahl von Studien bezüglich Struktur und Funktion und insbesondere auch im Hinblick auf die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht worden ist (z.B. Übersicht bei Autrum 1979). Die Photorezeptorzellen haben sich meist aus epidermalen Geweben zu Sehorganen (Augen) entwickelt. Teilweise haben sie auffällige strukturelle Spezialisierungen, die die physikalischen Eigenschaften der wahrnehmbaren elektromagnetischen Strahlung (z.B. Richtung, Spektralbereich, Intensität, Polarisationssebene) beeinflussen. Auch wenn aufgrund neuester genetischer Untersuchungen noch diskutiert wird, ob die Photorezeptoren mono-, bi-, oligo- oder polyphyletisch entstanden sind (z.B. Gehring 2001, Zuker 1994), so laufen doch die photochemischen und rezeptorphysiologischen Vorgänge in den verschiedenen Photorezeptorzellen der Tiere nach prinzipiell dem gleichen Muster der "Phototransduktionkaskade" ab.

Unterscheidung zwischen visuellen und nicht visuellen Photorezeptoren

Lichtsinneseorgane können in ganz unterschiedliche Funktionskreise eingebunden sein, z.B. Orientierung im Raum, Erkennen von Futter, von Partnern oder Feinden. Ihre Struktur und neuronale Verschaltung bildet die Grundlage für diese speziellen Aufgaben des Bilderkennens. Die Augen sind optimiert für die bestmögliche Unterscheidung von Simultankontrasten und unterliegen in der Regel Adaptationsprozessen, die den Arbeitsbereich, den dynamischen Teil ihrer Reiz-Erregungs-Kennlinie, an die aktuellen Umgebungshelligkeiten anpassen. Nachgeschaltete optische Ganglien ermöglichen differenzierte Auswert- und Filterprogramme, die das Sehvermögen bestimmten physiologischen Zuständen zuordnen, z.B. die schnelle Reizwechselanalyse während des Fluges (Strausfeld und Bassemir 1985) oder die gezielte Farberkennung bei der Futtersuche (Burkhardt 1989). Im Gegensatz zu diesen komplexen bildverarbeitenden Prozessen haben



Photorezeptoren auch zeitverarbeitende Aufgaben. Dabei werden nicht simultane Reizprogramme verarbeitet, sondern Helligkeiten sukzessiv über längere Zeit integriert und ihre Dynamik bewertet. Die Funktion von "Augen" als bildgebende oder visuelle Photorezeptororgane ist an vielen Modellsystemen aus dem gesamten Tierreich in vielen Details untersucht worden. Die Funktion als nicht-visuelle Lichtrezeptoren, die helfen, Zeitmuster von Hell/Dunkelwechseln zu erkennen, ist bisher nahezu "übersehen" worden, obwohl sie wahrscheinlich zu den ursprünglichen Aufgaben von Photorezeptoren gehört. Ihre Strukturen und informationsverarbeitenden Mechanismen sind nur in wenigen Fällen bekannt und damit auch nur ausschnittsweise ihre (vermutlich große) biologische Bedeutung.

Beispiele für nicht-visuelle Photorezeptoren

Nicht-visuelle Photorezeptoren kontrollieren z.B. lichtabhängige Sekretions- und Reife- bzw. Entwicklungsprozesse einzelner Organe wie der Prothorakaldrüse (Vafo-poulou und Steel 1996), den Malpighischen Gefäßen (Hege et al. 1997) oder den Testes der Insekten (Gielbultowicz et al. 1989). Bei Schmetterlingen sind genitale Photorezeptoren entscheidend an der Steuerung der Fortpflanzung beteiligt (Arikawa 1993). Diese nicht bildgebenden Photorezeptoren steuern auch die Flucht vor Licht, bekannt vom Regenwurm als Abplattung des Hinterendes nach einer Belichtung des "Kopfes" oder die Beschleunigung der Schwimmbeinbewegungen beim Krebs (zur Übersicht: Yoshida 1979). Auch Verteidigungsreaktionen wie der Stachel-"Flip" des Skorpions (Geethabali 1976 c) werden von nicht-visuellen Photorezeptoren ausgelöst.

Diese nicht-visuellen Photorezeptoren können auch an komplexen Kontrollprozessen im Zusammenhang mit der Bildverarbeitung durch die Augen beteiligt sein: Die Reizrichtung kann ohne Dioptrik und Reizdynamik durch ausreichend schnelle Reizlichtverarbeitung erkannt oder die Perzeptionsschwelle für andere visuelle Photorezeptorsysteme (z.B. Ocellen der Insekten: Goodman 1981) verändert werden. Wahrscheinlich sind die nicht-visuellen Photorezeptoren auch wesentlich an der Synchronisation der inneren Uhren mit den natürlichen Tag/Nachtwechseln beteiligt (zur Übersicht: Page 2001, Fleissner und Fleissner 2003). Diesem Aspekt



gilt ein Hauptinteresse der Arbeitsgruppe Fleissner, und auch meine Arbeit soll zu dieser Frage einen Beitrag leisten.

Struktur und Lage der nicht-visuellen Photorezeptoren

Grundsätzlich können nicht-bildverarbeitende Photorezeptoren sich überall im Körper befinden, bevorzugt aber organspezifisch, sowie am oder im Nervensystem, häufig in Verbindung mit Kommandofasern und konzentriert an den Körperpolen, Kopf oder Schwanz. Ihre Struktur ist kaum bekannt, am ehesten dann, wenn diese Rezeptoren Abwandlungen von visuellen Rezeptoren sind, die noch als "Augen" oder Augenderivate erkannt werden können. Das bekannteste Beispiel ist das Pinealorgan der Wirbeltiere (zur Übersicht: Meissl und Dodt 1981, Oksche 1984), bei dem sich die phylogenetische Entwicklung von den Photorezeptorzellen, z.B. im "dritten Auge" der Fische, Amphibien und Reptilien, bis hin zu den endokrinen nicht mehr selbst lichtempfindlichen Drüsenzellen im Pineal der Säugetiere nahezu lückenlos verfolgen lässt. Die nicht-visuellen Photorezeptoren der Invertebraten lassen sich gemäß ihrer Position im Tier in drei unterschiedliche Formenkreise einordnen (zur Übersicht: Fleissner und Fleissner 2003): (1) Rezeptoren in oder auf den optischen Loben, (2) Rezeptoren im Bauchmark und (3) frühere Augen, die immer noch retina-artig angelegt sind, aber ihre bildverarbeitenden Möglichkeiten mehr oder weniger verloren haben.

Manchmal kennt man keinen strukturellen Kandidaten für die extraretinale Photorezeption, meistens sind die Kenntnisse der Funktion und Biochemie noch unzureichend, man weiss aber von ihrer Existenz aus physiologischen Studien, in denen lichtabhängige Aktions-Potentiale außerhalb der Augen abgeleitet (Schaben: Ball 1965, 1972; Krebse: Bernal-Moreno et al. 1996, Edwards 1984, Hama 1961, Kennedy 1958) oder lichtinduzierte Verhaltensreaktionen (Skorpion: Zwicky 1968, 1970 a, Geethabali und Rao 1973) beobachtet werden konnten. In keinem Fall konnten bisher bei den Invertebraten Strukturen, physiologische Mechanismen und biologische Funktionen am gleichen nicht-visuellen Rezeptor abschließend erforscht werden.



Die deutlichsten Anzeichen für photorezeptive Funktionen wurden durch lichtinduzierte immunhistochemische oder strukturelle Veränderungen gewonnen. Alle diese nicht-visuellen Rezeptoren scheinen die gleichen molekularen und subzellulären Mechanismen zur Lichtverarbeitung zu haben wie die besser untersuchten visuellen Rezeptoren und können daher mit den gleichen neurobiologischen Methoden untersucht werden.

Thema meiner Arbeit

Unter den nicht-visuellen Photorezeptoren sind - nach einer Reihe von Pilotstudien (Fleissner und Fleissner 1998, 2001 a, 2002) – insbesondere auch essentielle Komponenten für die Synchronisation der inneren Uhren durch natürliche Zeitgeberprogramme zu suchen. Diese müssen sich in mehreren Eigenschaften grundlegend von den visuellen Photo-rezeptoren unterscheiden (Nelson und Takahashi 1991). Der Helligkeitswechsel in der Dämmerung, der das markanteste Zeitsignal im Tagesablauf liefert, verläuft z.B. zu langsam für die Augen und wird durch die Hell/Dunkel-Adaptationsprozesse weitgehend kompensiert. Deshalb können diese „Zeitseh“-Mechanismen nur auf der Basis von speziellen neuronalen Verschaltungsmustern und unter Einbeziehung mehrerer Photorezeptorsysteme, insbesondere der nicht-visuellen Rezeptoren, verstanden werden.

Mein Interesse galt den extraretinalen Photorezeptoren des Skorpions. Auf der Basis von neurobiologischen und chronobiologischen Untersuchungen ist ein „Skorpion-Modell“ entwickelt worden (Fleissner und Fleissner 2001 a, 2002), wie die Perzeption natürlicher Zeitgeber ablaufen könnte. Mathematische Modellrechnungen haben diese Annahme bestätigt (Friesen et al. 2001). Aber das "Skorpion-Modell" bedarf noch wichtiger Ergänzungen.

Extraretinale Photorezeptoren wurden als „Metasomaler Lichtsinn“ vor mehr als 30 Jahren in den hinteren Ganglien des Bauchmarks im Metasoma von dem australischen Skorpion *Urodacus spec.* (Zwicky 1968) und dem indischen *Heterometrus fulvipes* (Geethabali und Rao 1973) elektrophysiologisch



nachgewiesen. Die Lage, Struktur und Verschaltung dieser Photorezeptoren blieben aber ebenso unbekannt wie ihre physiologische Bedeutung. Nach Pilotversuchen bewirken Lichtreize auf diesen metasomalen Lichtsinn „Arousal“ (Geethabali 1976) und steuern das phototaktische Verhalten (Zwicky 1968, 1970), wie es auch bei Belichtung der Medianaugen beobachtet werden konnte (Fleissner und Fleissner, 2001 b, Fleissner und Hohmann, 1989, Fleissner et al. 1992). Beim nahverwandten Pfeilschwanzkrebs, *Limulus polyphemus*, synchronisieren Lichtpulse auf den metasomalen Photorezeptor die circadiane Uhr (Hanna et al. 1988). Zugleich gibt es bei diesem Organismus Hinweise, dass die Schwelle für die Synchronisation durch Lichtprogramme auf die anderen Augen erniedrigt wird, wenn das Metasoma mit beleuchtet wird (Hanna et al. 1985). Erste Versuche mit dem Skorpion *Androctonus australis* haben diese Befunde bisher nicht bestätigen können (Lüttgen 1993), vermutlich aus dem Grund, dass noch nicht die geeigneten Paradigmen angewandt wurden.

Die besondere Herausforderung beim Thema meiner Arbeit bestand darin, dass beim Skorpion zum ersten Mal eine neurobiologisch untermauerte Hypothese zur Wahrnehmung natürlicher Zeitgeber entwickelt worden ist (Fleissner und Fleissner 1998, 2002). Aber ein wichtiger Teil dieser Hypothese ist noch ungeklärt, da die genaue Verschaltung der unterschiedlichen Photorezeptorsysteme untereinander und ihr jeweiliger Anteil am Einfluss auf die circadiane Uhr ungeklärt sind.

Es fehlten bisher noch wesentliche Detailkenntnisse:

1. über Struktur und Feinstruktur des metasomalen Lichtsinns,
2. über die afferenten und efferenten Innervationsmuster aller Photorezeptorsysteme, insbesondere die gegenseitigen Verschaltungsmuster und die Signalwege zum circadianen Schrittmacher und
3. über die Signalwege von Arousalreizen insbesondere die Aufschaltung auf die Signalbahnen des photischen Systems.

In unserer Arbeitsgruppe wurden schon andere extraretinale Photorezeptoren bei diversen Insekten (Fleissner et al. 1993, Fleissner et al. 2001) entdeckt, so dass prinzipiell das experimentelle Besteck zur Lokalisierung der metasomalen



Photorezeptoren beim Skorpion zur Verfügung stand. Ich habe dem entsprechend Proteine der Phototransduktionskaskade immunhistologisch lokalisiert und im Elektronenmikroskop Strukturkomponenten beschrieben, die in jedem Photorezeptor vorhanden sein müssen. Ebenso habe ich mit Immunreaktionen auf bekannte Neurotransmitter den zentralnervösen Verlauf der optischen Bahnen und ihre gegenseitige Verschaltung analysiert. Mit diesen Methoden habe ich beim Skorpion potentielle Kandidaten für die bisher unbekanntes Sinneszellen des metasomalen Lichtsinns finden können (Schuchardt et al. 2002).

Anhand dieser Grundkenntnisse sollen dann in weiterführenden Projekten die Signalwege und Kontrollinstanzen für die relevanten Zeitgeberreize gesucht und ihre Umsetzung in phasenverschiebende Signale an den Schrittmacher analysiert werden. So könnte das komplexe Problem der Synchronisation der circadianen Uhr in der natürlichen Umwelt am Modell des Skorpions gelöst werden.



Abb. II.1.1: Amerikanischer Sandkorpion *Paruroctonus mesaensis* Ausgewachsenes Exemplar in der Aufsicht. Diese Art erreicht eine Gesamtlänge von 8 bis 10 cm

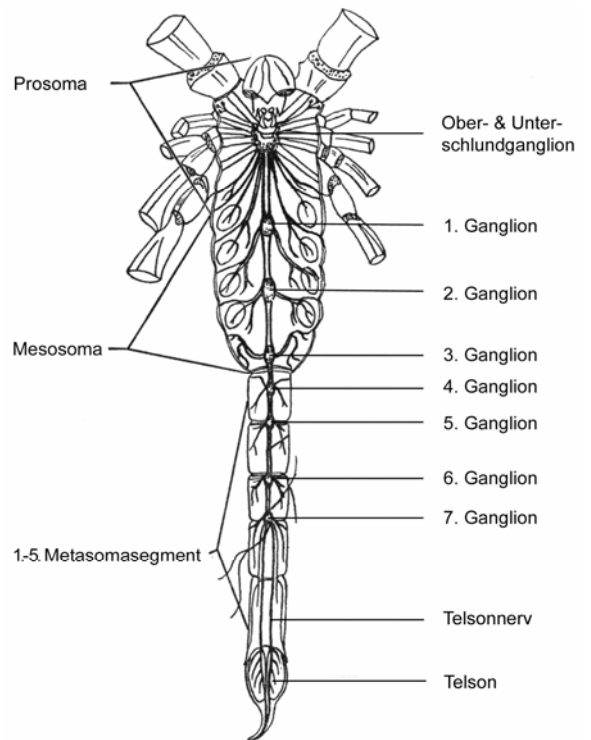


Abb. II.1.2: Schematische Zeichnung des zentralen Nervensystems des Skorpions mit drei mesosomalen und 4 metasomalen Ganglien [nach Babu 1965]



komplex (USGK) und dem Bauchmark (Abb. II.1.2). OSGK und USGK befinden sich im Prosoma der Tiere und werden von Muskelgewebe, dem Endosterniten, Mitteldarmdrüse und Haemolymphgefäßen umgeben. Der Oesophagus verläuft zentral durch das ZNS und stellt annähernd die Grenze beider Ganglienkomplexe dar (Kaestner 1940).

Die Skorpione haben ein langes doppelsträngiges Bauchmark, das mit dem USGK verbunden ist. Es besteht aus sieben einzelnen Ganglienpaare, drei im Mesosoma und vier im Metasoma, die durch doppelte longitudinale Konnektive in Verbindung stehen. Das letzte (siebte) Bauchganglienpaar wird von zwei miteinander verschmolzenen Ganglienpaaren gebildet und innerviert das vierte und fünfte metasomale Segment und den Stachelapparat.

Histologie der Bauchganglien

Der Cortex der Bauchganglien bildet histologisch einen peripheren Bereich aus Nervenzellkörpern (Abb.II.1.3). Das Neurolemma, eine bindegewebige Struktur, begrenzt die Ganglien zur Leibeshöhle hin. Im Zentrum der Ganglien befindet sich das Neuropil (Nervenfasergeflecht), in dem die Fortsätze vieler Neuronen miteinander verschaltet sind. Die Somata der Neuronen befinden sich größtenteils an den ventrolateralen Seiten der Ganglien und sind in der Regel monopolare Neurone mit nur einem abgehenden Axon und vielen kurzen stark verzweigten Projektionen, wie bei anderen Cheliceraten (z.B. Spinnen: Foelix 1992). Aus jedem Ganglion entspringen zwei Paar gleich große Segmentalnerven, von denen der anteriore Nerv den dorsalen Teil des Körpers innerviert und der posteriore Nerv die Ventralregion.

II.2 Immunhistologie bei Photorezeptoren

Die Prozesse bei der Phototransduktionskaskade gelten für das Wirbeltierauge und auch viele der Invertebratenaugen als weitgehend aufgeklärt. Die Sehfärbstoffe und die subzellulären Signalketten sind gut bekannt (Übersicht über den neusten Stand:

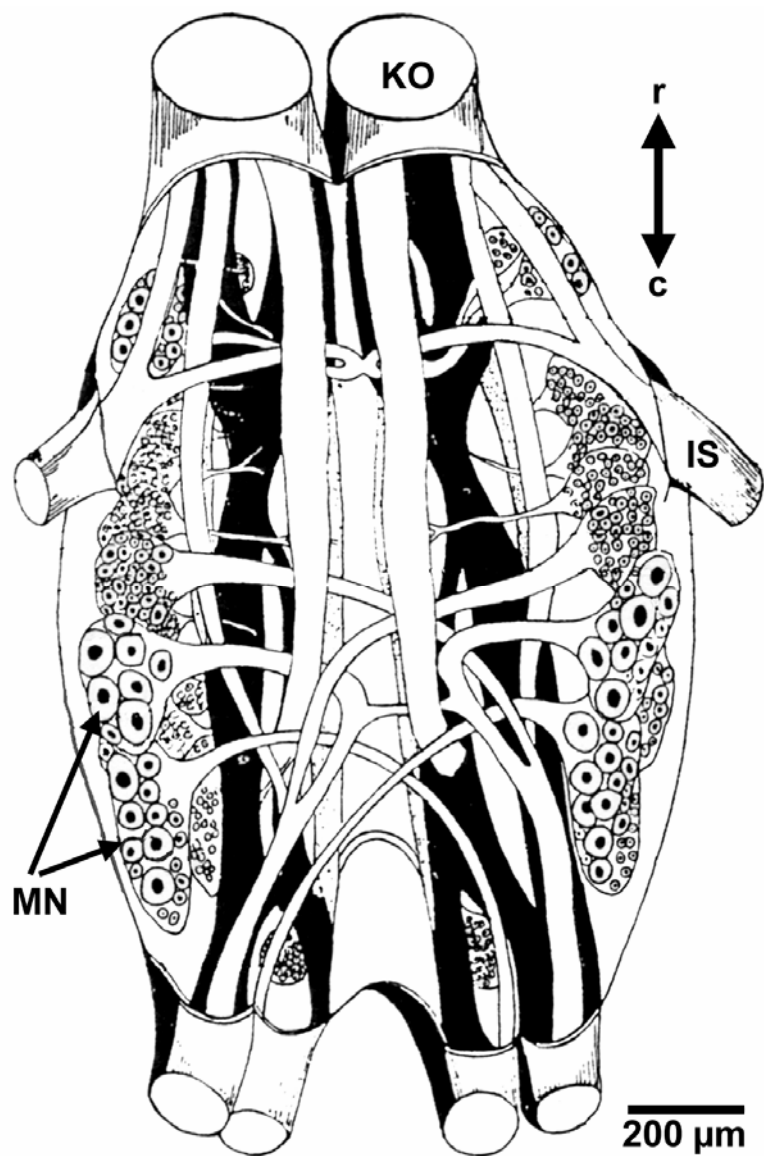


Abb. II.1.3 Schematische Darstellung des 7. Abdominalganglions (4. Metasomalganglion) (Innenansicht modifiziert nach Babu 1965) Das Bild zeigt die nach rostral abgehenden Konnektive (**KO**) und die caudalen Ursprünge der Nerven, die ins Telson und das 5. Metasomale Segment ziehen und so wie die bilateral im rostralen Bereich abgehenden intrasegmentalen Nerven (**IS**). Lateral sind die größeren Gruppen von metasomalen Neuronen (**MN**) mit ihren primären Projektionen zu sehen.
c: caudal, **IS:** intra-segmentale Nerven, **KO:** Konnektive **MN:** metasomales Neuron, **r:** rostral



II. HINTERGRUNDINFORMATIONEN

II.1 Neuroanatomie der Skorpione

Allgemeiner Bau der Skorpione

Der Körper des Skorpions ist dreigeteilt in Prosoma, Mesosoma und Metasoma. Ein Diaphragma, ein vertikaler Muskelwall und Bindegewebe, trennt das Prosoma vom Mesosoma. Im Prosoma befinden sich das ZNS und die Augen. Außerdem besteht es aus Muskeln des Bewegungsapparates und dient neben der Fortbewegung und Orientierung u.a. auch der Nahrungsaufnahme. Reproduktionsorgane, Buchlungen, Herz und große Teile des Verdauungstraktes befinden sich im Mesosoma (Hjelle 1990; Farley 2001). Nach Hjelle (1990) hat der Skorpion 21 Körpersegmente. Sieben Segmente zählen zum Prosoma, mit Cheliceren, die vom dritten Segment abgehen. Zum vierten Segment gehören Pedipalpen, die wie die Cheliceren mit Scheren an ihren distalen Enden ausgestattet sind. Dem fünften bis achten Segment entspringen vier Paar Laufbeine. Die Segmente 10 – 16 bilden das Mesosoma. Dabei sind an das 11. Segment die Kämmen („Pecten“) mit komplexen sensorischen Strukturen angeschlossen (Hjelle 1990, Farley 2001). Das Metasoma besteht aus den letzten fünf rostralen Segmenten (17 - 21). An dem 21. Segment befindet sich am posterioren Ende ein Stachel mit Giftblase.

Außer einigen blinden (troglobionten) Arten (Polis 1990, Polis und Sissom 1990, Sissom 1988, Sissom und Cokendolpher 1998) haben Skorpione ein Paar Medianaugen, das auf einem "Augenhügel" (*ocular tubercle*) in der Mitte des Carapaxes sitzt. Außerdem haben sie auf jeder Seite am antero-lateralen Rand des Carapaxes zwei bis fünf Lateralaugen.

Allgemeiner Aufbau des ZNS von Skorpionen

Das Zentralnervensystem (ZNS) der Skorpione besteht aus zwei kompletten Ganglien, dem Oberschlundganglionkomplex (OSGK), dem Unterschlundganglion-



Neuweiler 2003). Dementsprechend gibt es Antikörper, die für die immunhistologische Darstellung der Wirkorte dieser Moleküle genutzt werden können. Die gleichen Stoffe, insbesondere soweit sie photorezeptorspezifisch sind, wurden und werden unter anderem zur Detektion von bisher versteckten Photorezeptorsystemen eingesetzt. Erfreulicherweise erkennen diese für Wirbeltiere (z.B. Rind, Maus, Ratte, Huhn) hergestellten Antikörper auch Photorezeptorsysteme in Invertebraten. In nur wenigen Fällen (z.B. *Drosophila*, *Limulus*, *Manduca*, *Vanessa*) (Battelle et al. 2001, Briscoe et al. 2003) wurden artspezifische Antikörper für Invertebraten insbesondere gegen Opsine und visuelle Arrestine, als erste und letzte Moleküle der Transduktionskaskade hergestellt. Sie sind allerdings oftmals so spezifisch, dass sie selbst in nahverwandten Arten nicht mehr binden.

Darüber hinaus kennt man aufgrund von immunhistologischen und biochemischen Arbeiten an Vertebraten und Invertebraten Verfahren, mit denen man die exogenen von endogenen Veränderungen bei der Lichtperzeption darstellen kann. Dieser wichtige Prozess konnte bisher im Wesentlichen mit komplexen elektrophysiologischen Versuchen (Langzeitableitungen) oder in aufwändigen bildgebenden Verfahren (z.B. Calcium-Imaging) analysiert werden. Die Bedeutung der Dämmerung als natürlicher und hochwirksamer Zeitgeberreiz wurde auf subzellulärer Ebene eindrucksvoll bei Ratten zufällig erkannt. Histologisch konnten sehr deutliche Unterschiede in der c-fos-Konzentration im SCN nicht nur zwischen Tag und Nacht sondern vor allem während der Morgen- und Abenddämmerung gezeigt werden (Cooper et al. 1998). Bei *Limulus* ist bekannt, dass sich die Feinstruktur und Färbbarkeit der Rhabdom-Turnoverprodukte in den Lateralaugen je nach subjektiver Tageszeit und vorhergehendem Belichtungsprogramm in charakteristischer Weise ändert (Battelle et al. 2002).



II.2.1 Antikörper gegen Enzyme aus der Phototransduktionskaskade

A) Opsin

Die Sehfärbstoffe in tierischen Photorezeptoren sind komplexe Eiweißmoleküle, Rhodopsine, die in hoher Konzentration in speziellen Membranabschnitten der Photorezeptorzellen vorliegen. Sie bestehen aus einem 7fach gefalteten Eiweißteil, dem Opsin, in das ein lichtempfindlicher Baustein, das Retinal, eingelagert ist. Auf der intrazellulären Seite des Opsinmoleküls ist die Bindungsstelle für ein G-Protein, das Transducin. Schon bei Bakterien kommen Rhodopsine vor, die dann bei den Metazoen in wesentlichen Teilen nur wenig verändert wurden. Dadurch ist Immunhistologie mit Antikörpern gegen Opsin ein sicherer Nachweis von Sehpigment. Allerdings gibt es vielerlei artspezifische und sogar rezeptorspezifische Variationen an bestimmten Teilen dieses Eiweißmoleküls, die eine geänderte spektrale Absorption des Photorezeptors zur Folge haben. So gibt es z.B. ein Opsin aus den Blauzapfen der Maus oder den UV-Rezeptoren eines Schmetterlings. Wendet man solche Antikörper auf die Augen anderer Arten an, kann dann aber nur sehr vorsichtig geschlossen werden, dass ein mit diesem Antikörper reagierender Rezeptor die gleiche spektrale Empfindlichkeit hat.

B) Transducin

Das membrangebundene Photopigment Opsin bindet bei Belichtung an intrazelluläre G-Proteine. Diese photorezeptorspezifischen G-Proteine, die auch Transducin genannt werden, lassen sich in drei Untereinheiten α , β und γ gliedern. G-Proteine werden von den vielen verschiedenen Signalrezeptoren des Typ III aktiviert. Sie bilden eine Familie von Guanin-Nucleotid-bindenden Proteinen, welche chemische oder physikalische Reize von Rezeptoren auf der Zelloberfläche an die Zelle weiterleiten. Dadurch steuern sie die Bindung von „second messengern“. G-Proteine sind Heterotrimere aus drei verschieden großen Untereinheiten, die in vielen Isotypen vorkommen und sich vielfältig miteinander kombinieren können. Die Aktivierung der G-Proteine führt zu einem Austausch des von der α -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP. Dadurch dissoziiert das Trimer in zwei Untereinheiten



(α -GTP und $\beta\gamma$). Die α -Untereinheit bindet an Effektorsysteme (Membranenzyme, Ionenkanäle) und steuert deren Aktivität. Ob die α -Untereinheit aktivierend oder hemmend auf ihr Effektorsystem wirkt, hängt von ihrem Isotyp und dem Effektorsystem ab, an das sie bindet.

Die meist verwendete Einteilung der G-Proteine geht von ihrer Funktion aus: Gs (stimulierend), Gi (inhibitorisch), Go (andere Wirkungen; engl. `other`) und Gt (Transducin). Auf Grund der Primärstruktur der α -Untereinheit (mit mehr als 20 Isotypen) können die G-Proteine auch in die Familien Gs, Gi, Gq und G12 eingeteilt werden. Auch die β und γ α -Untereinheiten kommen in verschiedenen Isotypen vor.

Relativ neu ist die Beobachtung, dass Analoge der α -Untereinheiten der geschilderten G-Proteine auch in anderen Bereichen der Zelle vorkommen, z.B. am endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. Sie sind dort an der Steuerung der Protein-Biosynthese und des vesikulären Transports beteiligt.

G-Proteine sind auf der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert und können dort enzymatisch modifiziert werden. Lichtaktiviertes Rhodopsin tritt mit einem G-Protein zusammen, das das gebundene GDP gegen GTP austauscht. Der Komplex zerfällt, das aktivierte Rhodopsin kann wieder an den Anfang der Reaktionsfolge eintreten (Verstärkereffekt), das G-Protein ist damit aktiviert und vermag den Inhibitor I von der Phosphodiesterase (PDE) abzulösen. Die so aktivierte Diesterase spaltet cGMP zu GMP. Das Ende des Signals wird eingeleitet durch die Inaktivierung des G-Proteins unter Freisetzung des Inhibitors I infolge Hydrolyse von GTP sowie durch Phosphorylierung des aktivierten Rhodopsins, die wahrscheinlich auch zur Ablösung des trans-Retinals führt.

Bei Invertebraten verläuft die G-Proteinkaskade deutlich schneller als bei Vertebraten. Die Proteine sind aber so ähnlich, dass die meisten Antikörper kreuzreaktiv sind. Daher kann man mit Immunmarkierungen gegen Gq Photorezeptormembranen, in denen Opsin und somit auch Gq enthalten ist, gut hervorheben.



C) Arrestin

Der photochemische Zyklus muß schnell abgeschaltet werden, damit die Dynamik der optischen Reize nicht verwischt wird. In tag- und nachtaktiven Tieren kann man deshalb in ihren Ruhe- und Aktivitätszeiten deutliche Unterschiede in diesem Abschaltvorgang beobachten. Schlüsselmolekül bei diesem Steuervorgang ist Arrestin als Stopper in der Photorezeptorkaskade. Das Molekül blockiert die Bindungsstelle zwischen Opsin und Transducin. Visuelles Arrestin ist daher wie Opsin, Myosin III und Calmodulin (siehe unten) konzentriert in der photosensitiven rhabdomeren Membran vorhanden. In Invertebraten, wo diese Membranen zur Restitution einen Umbauzyklus durchlaufen, findet man visuelles Arrestin zusammen mit Opsin auch im gesamten Zytoplasma der Rezeptorzelle in den Membranen der extra-rhabdomeren Vesikel. In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass z.B. der Gehalt an Arrestin über Gene geregelt wird, die der Kontrolle durch die circadiane Uhr unterliegen (*Limulus*: Battelle et al. 2000, *Drosophila*: Claridge-Chang et al. 2001, *Apis*: Sasagawa et al., 2003).

Die Arrestine bestehen aus großen Eiweißketten, die in einigen Bereichen artspezifisch variieren, in anderen über alle phylogenetischen Grenzen hinweg konservativ erhalten bleiben. Diese konservativen Bereiche werden als Antigene für immunhistologische Untersuchungen genutzt, um photosensitive Strukturen zu markieren. Man muss allerdings dabei berücksichtigen, dass G-Proteine und damit Arrestine nicht nur in Photorezeptoren sondern auch z.B. in Chemorezeptoren vorkommen. Für einige Arten wurden bestimmte Antikörper gegen „visuelle Arrestine“ hergestellt. Deshalb müssen generell bei diesen Immunfärbungen sehr sorgfältige Negativ- vor allem aber auch Positivkontrollen durchgeführt werden. Hierbei wird geprüft, ob im gleichen Tier bekannte Rezeptoren markiert werden können.



II.2.2 Neuronale Transmitter der Photorezeptoren

A) Histamin

Histamin gehört zu den biogenen Aminen, die durch enzymatische Decarboxylierung einer Aminosäure (hier: Histidin) entstehen. Histamin, ein Indolamin, ist bei zahlreichen Invertebraten und im Nervensystem von Arthropoden ein weitverbreiteter Neurotransmitter und dort vielfach nachgewiesen worden (Elias und Evans 1983 und 1984, Elste et al. 1990, Wikgreen et al. 1990, Battelle et al. 1991). Es fungiert sowohl als Transmitter und Modulator als auch als Hormon (Prell und Green 1986). Histamin wirkt inhibitorisch indem es direkt die Leitfähigkeit postsynaptischer Chlorid-Kanäle beeinflusst (Hardie 1989, McClintock und Arche 1989) oder neuromodulatorisch, indem es durch Änderung der Calcium-Leitfähigkeit die synaptische Effektivität verändert (Richard et al. 1997).

Die Transmitterfunktion von Histamin ist insbesondere für das visuelle System von Arthropoden bekannt. Es ist dort offenbar der einzige Neurotransmitter der Photorezeptorzellen. Hierzu liegen analoge Ergebnisse von vier Klassen der Arthropoden vor (Merostomata, Arachnida, Crustacea und Insecta) (Ausnahme: die GABA-ergen R7 Zellen der Rhabdome mancher Dipteren; Callaway und Stuart 1989; Battelle et al. 1991; Nässel 1991; Pollack und Hofbauer 1991). So wurde Histamin biochemisch und immunocytochemisch in den Photorezeptoren der Komplexaugen und Ocelli von Insekten (Hardie 1987, Nässel et al. 1988, Simmons und Hardie 1988, Schlemmermeyer et al. 1989, Pirvola et al. 1988 und Sarthy 1991), in den Photorezeptoren von *Balanus* (Cirripedia, Crustacea; Callaway und Stuart 1989) und sämtlichen Photorezeptoren von *Limulus* (Xiphosura, Merostomata: Battelle et al. 1991) gefunden. Battelle et al. 1999 zeigten, dass bei *Limulus polyphemus* anatomische und biochemische Untersuchungen darauf hinweisen, dass Histamin ein Neurotransmitter in den primären Retinaafferenzen ist und wahrscheinlich am visuellen Informationsprozess des Lateralauges beteiligt ist. In den genannten Taxa treten außerdem in den optischen Loben verschiedene Klassen Histamin-immunreaktiver Interneurone auf. Zum Nachweis eines funktionierenden Photorezeptors bei Invertebraten gehört nach diesen Befunden der Nachweis, dass die fragliche Struktur sich mit Anti-Histamin-Antikörpern färben lässt.



B) Efferente Signale der nicht-visuellen Photorezeptoren

Während die afferenten Informationen der Invertebratenaugen offensichtlich obligatorisch histaminerg sind, (s.o.), gibt es eine größere Vielfalt bei efferenten Kontrollsignalen dieser Rezeptorsysteme. So dient z.B. Octopamin bei allen Arachniden als circadianes Signal zur Kontrolle der visuellen Empfindlichkeitsrhythmik (Übersicht für den Skorpion: Fleissner und Fleissner 1988, 2001; für den Pfeilschwanzkrebs: Battelle 1991, 2002; für Spinnen: Yamashita 2002). Bei Insekten wird diese Aufgabe von Serotonin erfüllt (Übersicht: Fleissner und Fleissner 1988). Peptide sind bei Crustaceen in diesen Funktionskreis eingebunden (Übersicht: Eguchi 1999). Wieder andere Transmitter dienen der Verknüpfung von unterschiedlichen Sinnessystemen und der Kontrolle des Verhaltens (z.B. Borst und Egelhaaf 1994). Immunmarkierungen mit Antikörpern gegen diese Substanzen können deshalb nicht dem Nachweis einer Photorezeptorfunktion dienen, sondern geben Hinweise auf die neuronalen Verschaltungsmuster.



III. MATERIAL UND METHODEN

Vorbemerkung:

Alle im Folgenden aufgeführten Verfahren sind im Anhang mit genauen Rezepturen und einer vollständigen Liste der verwendeten Chemikalien (incl. Bezugsquellen) detailliert beschrieben.

III.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die anatomischen und histologischen Untersuchungen wurden mit dem amerikanischen Sandskorpion *Paruroctonus mesaensis* durchgeführt (Abb. II.1.1). Dieser ist ein nachtaktiver Wüstenbewohner. Die Gattung/Art *Paruroctonus mesaensis* gehört zu der Familie Vaejovidae, zu der Ordnung Scorpiones in der Klasse der Arachnida und der Überklasse Chelicerata und ist dem Stamm der Arthropoda zuzuordnen. Dieser amerikanische Sandskorpion lebt in Sandwüsten (z.B. der Mojave-Wüste, CA, USA) der nordamerikanischen Staaten Arizona und Kalifornien und in Mittelamerika, vornehmlich in Mexiko. Die Tiere werden ca. 8 bis 10 cm lang. Die heißen Tage verbringen sie in selbst gegrabenen Höhlen unter der Oberfläche. Nachts verlassen sie ihre Verstecke und jagen nach kleinen Beutetieren vornehmlich Insekten aber auch Kleinsäugetern und sogar ihren Artgenossen.

Die für die Versuche eingesetzten Skorpione wurden einzeln in 9 x 15 cm großen, mit Sand gefüllten Behältnissen, im Tierhaus des Zoologischen Institutes der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main gehalten. Wasser stand ad lib. aus einem kleinen Reservoir zur Verfügung. Damit die Tiere auch im Labor den Tag-Nacht Rhythmus wie in ihren unterirdischen Höhlen wahrnehmen konnten, befanden sie sich in einem fast geschlossenen Schrank. Das Raumlicht war 12 Stunden an und 12 Stunden aus. Gefüttert wurden die Skorpione alle drei Wochen mit einer Grille, die der Größe der Skorpione entsprach. Die Temperatur betrug tagsüber durchschnittlich 27°C und sank nachts auf etwa 20°C ab. Die relative Luftfeuchtigkeit lag am Tag bei 60% und in der Nacht bei 70%. Für die histologischen Untersuchungen wurden Tiere des 5. und 6. Häutungsstadiums verwendet. Da die Skorpione die Osmolarität ihrer peripheren



Hämolymphe mit der Umgebungsfeuchtigkeit und der Möglichkeit Wasser aufzunehmen verändern, wurden die Tiere voll "hydratisiert" in die Versuche aufgenommen. Damit konnten gleichmäßig gute Fixierungsergebnisse erzielt werden, ohne dass jedes Mal die Osmolarität bestimmt werden musste.

III.2 Präparation

Von den Skorpionen wurden Tag- und Nachtpräparate des Zentralen Nervensystems und der Ganglien angefertigt. Die Tagpräparationen erfolgten zwischen 11:00 Uhr und 15:00 Uhr. Die Nachtpräparationen erfolgten zwischen 0:00 Uhr und 4:00 Uhr. Diese Tiere wurden bis zur Präparation für zwei Tage im Dunkeln gehalten, im Kühlschrank oder im Gefrierfach betäubt und für eine bessere Strukturhaltung (Stop der Autolyse) mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) als Vorfixierung über das Herz perfundiert. Zur Perfusion diente für die EM-Präparate ein Gemisch aus 0,1% Glutaraldehyd und 4% PFA, für die Histaminfärbungen 4% Carbodiimid in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und für die Antikörperfärbungen nach Battelle ein Methanolfixativ (siehe Chemikalienliste). Die Nachtpräparation erfolgte bei Infrarotlicht. Die Tag-, wie auch die Nachtpräparationen wurden in Ringer (Skorpionringer, siehe Chemikalienliste) von dorsal durchgeführt. Zunächst wurde die Linse der Medianaugen herausgelöst und anschließend wurden die Lateralaugen entfernt. Sie dienten später der Kontrolle für die Immunhistologie. Zum Teil wurden auch die Medianaugen zusammen mit dem ZNS herauspräpariert, geschnitten und immunbehandelt und als Kontrolle für die Immunfärbungen verwendet. Nach der Entfernung des Carapaxes, der Mitteldarmdrüse, des Magens, der Leber und der Muskulatur wurde das Bauchmark mit allen sieben Ganglien herausgenommen. Anschließend wurde der Endosternit durchtrennt und das gesamte ZNS mit Unterschlund- und Oberschlundganglion freipräpariert, um es dann zusammen mit den Sehnerven und Medianaugen herausnehmen zu können. Die freipräparierten Organe wurden zur Durchfixierung für mehrere Stunden in das entsprechende Fixativ gelegt (siehe Kapitel Immunhistochemische Markierungen).



III.3 Immunhistologische und -cytologische Methoden

III.3.1 Immunhistochemische Markierungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahrensweisen zum Lokalisieren und Identifizieren des metasomalen Lichtsinns und zum Identifizieren und Kartieren der unterschiedlich organisierten Systeme der aminergen und peptidergen Neurone und ihrer weitläufigen Neuriten in den Ganglien von *Paruroctonus* eingesetzt: (A) DAB (Diaminobenzidin)-Peroxidase Immunmarkierungen für Serotonin und Glutamat (alle kommerziell) und Opsin (aus Rinderaugen, Quelle Peichl) an Paraffinschnitten, (B) Histamin (kommerziell) und (C) Arrestin (aus Rinderaugen, Quelle Donoso) erfolgten an Paraffinschnitten, die mit Hilfe der DAB (Diaminobenzidin)-Peroxidase Technik markiert wurden. Die DAB (Diaminobenzidin)-Peroxidase Technik ist eine extrem spezifische Methode, mit der auch winzige Nervenendigungen gut erkannt werden können. (D) Lichtmikroskopische Doppelfärbungen von Komponenten der Phototransduktionskaskade an Gefrierschnitten: Arrestin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Rinderaugen, Quelle Peichl; aus Manduca, Quelle White), Calmodulin, Myosin III und Komponente des G-Proteins (G α q), (E) lichtmikroskopische Doppelfärbungen von Komponenten der Phototransduktionskaskade an Paraffinschnitten: Arrestin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Rinderaugen, Quelle Peichl; aus Manduca, Quelle White), Calmodulin, Myosin III und Komponente des G-Proteins (G α q), (F) lichtmikroskopische Doppelfärbungen von Komponenten der Phototransduktionskaskade an Wholemounts (ungeschnittene Präparate): Arrestin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Limulus, Quelle Battelle), Opsin (aus Rinderaugen, Quelle Peichl), Calmodulin, Myosin III und Komponente des G-Proteins (G α q).



A) DAB-Peroxidase Immunmarkierungen für Serotonin, Glutamat und Opsin an Paraffinschnitten

Die betäubten Tiere wurden mit frisch angesetztem 4% PFA perfundiert (siehe Skorpion Präparation). Nach der Präparation in Skorpionringer (siehe Chemikalienliste) wurden das ZNS und die Ganglien des Skorpions bei 4°C für 4 h noch einmal mit 4% PFA nachfixiert und anschließend 3 x 10 min in 0,01 M PBS gewaschen. Für die Paraffineinbettung wurden die Präparate zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe je nach Größe für 10 bis 30 min dehydriert (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% Ethanol) je einmal und 100% Ethanol zweimal. Anschließend kamen sie für 10 bis 30 Minuten zweimal in Rotihistol. Dann wurden die Präparate über Nacht in ein 55°C warmes Gemisch von 1:1 Rotihistol und Paraffin überführt. Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal für jeweils zwei Stunden in jeweils neues Paraffin (58°C) überführt, um vor dem endgültigen Einbetten alle Rotihistolreste zu entfernen. Nach dem Aushärten wurden die Präparate im Paraffin als Blöcke zurecht getrimmt, aufgeblockt und mit einem Schlittenmikrotom (Leitz,) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden auf beschichtete Histobond Objektträger aufgezogen und mindestens für einen Tag im Wärmeschrank getrocknet (37°C). Vor der Immunbehandlung wurden die Paraffinschnitte wieder rehydriert (2 X Rotihistol, 2 X 100% Ethanol für 10 min und je 5 min in 96%, 90%, 80%, 70% und 50% Ethanol). Dann wurde die endogene Peroxidase mit 0,3% H₂O₂ in PBS für 15 min bei Raumtemperatur blockiert. Um Wasserstoffperoxid wieder zu entfernen, wurden die Präparate zweimal 10 min mit 0,01 M PBS gespült und einmal 10 min mit PBS mit 0,25% Triton X 100. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einem Normalserum (entsprechend des zweiten Antikörpers, siehe Antikörperliste) blockiert. Die Inkubation mit dem primären, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper (siehe Antikörpertabelle) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in 0,01% PBS mit Triton (zur besseren Penetration der Antikörper) und 1% NGS sowie 0,05% bis 0,1% BSA (Rinderserumalbumin) zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen. Nach anschließendem Waschen in 0,01 M PBS mit Triton (3 x 10 min) wurden die Präparate mit einem Biotin-konjugierten sekundären Antikörper, der gegen das Tier gerichtet war, aus dem der jeweilige primäre Antikörper stammte (siehe Antikörpertabelle) zusammen mit 3% Normalserum und 0,05% bis 0,1% BSA für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert (jeweilige Verdünnung



der Antikörper siehe Antikörpertabelle). Nach erneutem Waschen in PBS (3 x 10 min), wurden die Präparate 45 min mit einem Komplex aus Avidin und biotinierter Meerrettichperoxidase (Vectastain Elite ABC Kit PK-6100) Verdünnung von A und B: 1:50 in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Präparate gewaschen (2 x 10 min in 0,01 M PBS und 1 X 10 min in 0,05 M Tris mit HCL mit einem pH-Wert von 7,6) und durch das Chromagen 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) wurden die Antikörperimmunreaktionen für die Lichtmikroskopie visualisiert, indem sie in 0,025% DAB und 0,01% Hydrogen-Peroxid (DAB/H₂O₂) in 0,05 M Tris HCL (pH 7,6) für 5 min transferiert wurden, was zum Start der DAB-Reaktion führte. Die Reaktion wurde nach etwa 5 min (je nach Schnittserie 3 bis 7 min) durch Transfer der Schnitte in 0,05% Tris (pH 7,6) gestoppt. Nach erneutem Waschen in PBS (5 x 10 min) wurden die Präparate wieder dehydriert (70%, 90%, 96% Ethanol a 3 min, zweimal 100% Ethanol und zweimal Rotihistol für 10 min) und anschließend mit Entellan eingedeckt.

B) DAB-Peroxidase Immunmarkierungen für Histamin

Die lichtmikroskopischen Histamin-Immunmarkierungen wurden entsprechend der Immunmarkierungen (1a) durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass als Fixativ 4% Carbodiimid für die Perfusion und die vierstündige postpräparative Fixierung verwendet wurde. Außerdem war der primäre Antikörper ein polyklonaler anti-Histamin Antikörper aus Kaninchen (Delichon Biotechnology Ltd., Finnland), der in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde.

C) DAB-Peroxidase Immunmarkierungen für Arrestin (C10/C10)

Die Immunmarkierungen gegen Arrestin erfolgten nach den gleichen Schritten wie die Serotonin Immunmarkierungen. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler anti Arrestin Antikörper aus Maus (1:600) verwendet. Getestet wurde als Fixativ für diese Immunmarkierung auch das Fixativ (nach Donoso et al. 1990), um zu sehen, ob der Antikörper mit dieser ursprünglich vom Autor verwendeten Fixierung spezifischer, mit weniger Hintergrund und stärker färbt. Doch die Immunfärbungen waren in jeder



Hinsicht identisch mit den 4% PFA fixierten Präparaten. Daher verwendete ich in den folgenden Versuchsreihen weiterhin 4% PFA als Fixativ.

D) Lichtmikroskopische Arrestin-Opisin (L), Gq-Calmodulin, Arrestin-Myosin und Calmodulin-Opisin (MPI) Doppelfärbungen an Gefrierschnitten

Die Doppelfärbungen von Arrestin (L) (monoklonal.; aus Maus; 1:50) mit Opisin (L) (polyklonal; aus Kaninchen; 1:1000); von Arrestin (L) mit Gq (General Galpha q/11; polyklonal; aus Kaninchen; 1:500), von Calmodulin (monoklonal; aus Maus; 1:100) mit Arrestin (L), Myosin (polyklonal; aus Kaninchen; 1:2000), von Calmodulin mit Opisin (MPI) (polyklonal; aus Kaninchen; 1:1000) wurden alle im Whitneylabor von B. Battelle in Florida, USA, angefertigt. Die Präparate wurden mit eiskaltem Methanolfixativ nach Battelle (siehe Chemikalienliste) für 6 bis 8 Stunden oder über Nacht bei 4°C fixiert, dann zur Vorbereitung für Gefrierschnitte rehydriert, über eine absteigende Methanolreihe (60%, 50%, 25% Methanol in 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) (pH 7,2) bis zum reinen 0,1 M PBS, jeweils zweimal für 5 min. Nach der Rehydrierung wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C in 30% Saccharose in 0,1 M PB inkubiert (zum Gefrierschutz). Anschließend wurden die Präparate in Tissue TEK (Einbettmedium für Gefrierschnitte Tissue TEK Miles, 4583) eingebettet und bei -46°C tiefgefroren. Nachdem die Präparate in dem gefrorenen Tissue TEK zu Blöcken zurechtgetrimmt waren, wurden bei -18°C in 12 bis 14 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden auf den Objektträgern mindestens über Nacht bei -20°C tiefgefroren, bevor sie 3 x 5 min in 1,05 M TBS (Tris Pufferlösung; pH 7,6) gespült wurden. Anschließend kam für 15 min 0,4% Triton X-100 in TBS auf die Schnitte, das dann wieder durch 3 x 5 min Spülen mit TBS entfernt wurde. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine sechzigminütige Inkubation mit 10% NGS, 1,82% Lysine in TBS geblockt. Nach fünfminütigem Spülen mit TBS wurden der erste und zweite primäre Antikörper (Verdünnung siehe Antikörpertabelle) in 0,1% Triton X-100 und 1% NGS in TBS über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben. Hierbei war zu beachten, dass die beiden primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten, damit sie im zweiten Schritt durch entsprechend unterschiedliche fluorchromierte sekundäre Antikörper [die jeweils gegen



die Tierart gerichtet waren, aus der die Primärantikörper stammten: FITC (Fluorescein isothiocyanate): Ziege anti Kaninchen; und TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat): Ziege-anti-Maus] markiert und sichtbar gemacht werden konnten. Die Schnitte wurden wieder 3 x 5 min mit TBS gespült, bevor die Schnitte mit den zweiten Antikörpern (FITC 1:25 und TRITC 1:100) bei Raumtemperatur für 60 min im Dunkeln inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte wieder 3 x 5 min mit TBS gespült und in 60% Glycerol PDE (Phenylenediamine), in H₂O gelöst, eingedeckelt.

E) Lichtmikroskopische Arrestin-Opsin (L), Gq-Calmodulin, Arrestin-Myosin und Calmodulin-Opsin (MPI) Doppelfärbungen an Paraffinschnitten

Diese Doppelfärbungen wurden entsprechend der Immunfärbungen angefertigt, nur dass sie nach 6 - 8 stündiger Fixierung in Paraffin eingebettet und in 10 µm Paraffinschnitte geschnitten wurden (siehe Kapitel zu Paraffinschnitten). Die Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend erfolgten die selben Schritte wie oben begonnen mit 15 min 0,4% Triton X-100 in TBS auf den Schnitten.

F) Wholemoutfärbungen für lichtmikroskopische Arrestin-Opsin (L), Gq-Calmodulin und Calmodulin-Opsin (MPI) Doppelfärbungen

Die lichtmikroskopischen Doppelfärbungen an Wholemouts für Arrestin-Opsin (L), Gq-Calmodulin, Arrestin-Myosin und Calmodulin-Opsin (MPI) wurden entsprechend der vergleichbaren Einzelfärbungen an Schnitten durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Inkubations- und Spülzeiten länger waren. So lagen die Präparate eine Stunde in 0,2% Triton X 100 in TBS, wurden 3 x 5 min in TBS gewaschen, dann 1 Stunde mit dem entsprechenden Blocker blockiert, einmal mit TBS gewaschen, mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, 3 x 30 min in a) TBS, b) TBS c) in der Antikörperverdünnung gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper für 2 Stunden inkubiert und 3 x 30 min mit TBS gespült. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper betragen: Opsin (L) = 1:500; Arrestin (L) = 1:50; Gq = 1:500; Calmodulin = 1:100 und Opsin (MPI) = 1:1000. Myosin-III-Färbungen



habe ich bei den Wholemounts nicht angewendet, da die Färbungen an den Schnitten ergaben, dass Myosin-III in dem Skorpiongewebe zu schwach zu erkennen ist.

An Gefrierschnitten sowie an Paraffinschnitten und Wholemounts wurde die Methanolfixierung nach Battelle angewandt. Lichtmikroskopische Immunmarkierungen wurden über sekundäre fluorchromgekoppelte Antikörper an Cryostat- und Paraffinschnitten und an Wholemounts dargestellt. Diese Methode zeigt sehr spezifisch die Antikörperbindungsstellen mit sehr wenig Hintergrundmarkierung.

III.3.2 Kontrollversuche zu den immunhistochemischen Untersuchungen

Mit Hilfe von Kontroll-Präparaten wurde festgestellt, ob die beobachteten Fluoreszenzaktivitäten oder DAB-Reaktionen der immunhistochemisch gefärbten Präparate tatsächlich auf die Bindung der primären Antikörper zurückzuführen waren. Hierzu wurde bei allen Versuchsansätzen im ersten Inkubationsschritt der primäre Antikörper weggelassen. Alle weiteren Versuchsschritte verliefen identisch zu den regulären Versuchsansätzen.

Da die Antikörper Arrestin und Opsin von Battelle speziell aus den Lateralaugen von *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkrebs, der den Skorpionen sehr nah verwandt ist, hergesellt wurden, also dort sehr spezifisch reagieren, sollte die Anwendung dieser Antikörper beim Skorpion einen Hinweis auf die Funktionalität des vermuteten metasomalen Photorezeptors liefern. Als weitere Positivkontrolle sowie als Beweis, dass die verwendeten Antikörper spezifisch für den Skorpion sind, dienten die Färbungen der Medianaugen. Die getesteten Antikörper Opsin (L), Opsin (P), Arrestin (L) und Gq färbten deutlich die Photorezeptorzellen der Medianaugen (besonders im Bereich der Rhabdome).



III.4 Konventionelle Elektronenmikroskopie

III.4.1 Flacheinbettung in Araldit

Die betäubten Tiere wurden mit einem frisch angesetzten Fixativ aus 4% Glutaraldehyd mit 3,4% Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer perfundiert. Nach anschließender Präparation der Ganglien wurden diese in dem gleichen Fixativ für 2 h bei 4°C weiter inkubiert und danach in Cacodylatpuffer in Glutaraldehyd gewaschen (4 x 10 min). Nach 15 minütiger Nachfixierung in 0,5% O_3O_4 wurden die Präparate erneut in Cacodylatpuffer gewaschen (4 x 10 min). Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Über das Intermedium Propylenoxid waren die Proben in ein Propylenoxid / Aralditgemisch gebracht, wo sie über Nacht verblieben. Nach anschließender Überführung in reines Araldit erfolgte dann eine Flacheinbettung in Araldit. Zum Auspolymerisieren des Araldits kamen die Präparate für 48 Stunden bei 60°C in den Brutschrank.

III.4.2 Semidünnschnitte

Die in Araldit eingebetteten Wholemout Präparate wurden am Mikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Wien, Österreich) semidünn geschnitten (2 bis 4 μm), auf beschichtete Objektträger aufgelegt und auf einer 80°C warmen Heizplatte gestreckt und getrocknet. Anschließend wurden sie für eine lichtmikroskopische Auswertung und zur Orientierung und Selektierung für weitere Ultradünnschnitte mit 0,05% Methylenblau gefärbt. Anhand dieser Semidünnschnitte war es möglich, die genaue Lage der elektronenmikroskopisch zu untersuchenden Bereiche relativ genau zu ermitteln. Zuvor wurden Aufnahmen dieser mit Methylenblau gefärbten Semidünnschnitte angefertigt (siehe Abb. IV.1).

III.4.3 Ultradünnschnitte

Die ausgewählten Semidünnschnitte wurden mit frischem Araldit in Gelatine kapseln umgebettet und nach 48 stündigem Aushärten (bei 60°C) mit einem Diamantmesser am



Mikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Wien, Österreich) ultradünn geschnitten (50-60 nm). Die Schnitte wurden auf Pioloform befilmte Lochgrids (Kupfer- bzw. Nickelgrids) überführt. Bei der Schnittkontrastierung wurden die Grids mit den Ultradünnschnitten zunächst in Uranylacetat (10%ig in Methanol gelöst) für 10 min inkubiert, dann durch eine absteigende Methanolreihe (100% Methanol, 50% Methanol : 50% Aqua bidest., 100% Aqua bidest.) geführt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesogen. Anschließend kamen die Grids für 7 min in Reynold´s Bleicitrat (Reynolds 1963). Die Schnitte wurden dreimal in zweifach destilliertem Wasser gewaschen, wobei im ersten Waschgang 0,01M NAOH im Aqua bidest. enthalten war. Zum Schluss wurden überschüssige Tropfen des Waschwassers vorsichtig mit Filterpapier entfernt und die Grids wurden mindestens eine Stunde getrocknet, bevor sie im TEM betrachtet werden konnten .

III.4.4 Identifizierung der ultrastrukturell untersuchten Sinneszellbereiche

Die Ultradünnschnitte wurden an Elektronenmikroskopen (TEM Hitachi 500 und Zeiss 10C/CR) betrachtet und dokumentiert. Aufgrund der guten Gewebeerhaltung nach GA/PFA-Fixierung, konnten die Präparate ohne eine weitere Färbung oder Immunmarkierung für eine ultrastrukturelle Analyse und Darstellung der Struktur und Anatomie der extraretinalen Photorezeptoren herangezogen werden. Zur besseren Übersicht wurde vereinzelt die gesamte Sinneszelle durch mehrere Ultradünnschnittserien rekonstruiert.

III.5 Auswertung

Die Auswertung der Fluoreszenzimmunmarkierungen erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen. Hierbei isoliert man aus dem Spektrum einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 50 W/AC) mit einem Sperrfilter (BP 520/554 bzw. 488 für das Fluorochrom TRITC bzw. FITC) die Wellenlänge, die von dem fluoreszenzfähigen Stoff absorbiert wird. Nur mit diesem Licht wird das fluorochromierte Präparat bestrahlt. Durch den Langpassfilter (LP bzw. 582 520 für TRITC bzw. FITC),



der das Erregerlicht im Betrachtungsstrahlengang möglichst vollständig absorbiert, wird die vom Präparat emittierte Fluoreszenz beobachtet und fotografiert. Die Immunmarkierungen (sowohl mit Fluoreszenzmarkern wie auch DAB-markierte) wurden mit einem Polyvar Lichtmikroskop (Reichert-Jung, Wien, Österreich) ausgewertet, an dem digitale Fotoaufnahmen über eine digitale Mikroskopkamera (SPOT; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, IL, USA) mit der Software "Meta View 3.6" (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA) dokumentiert wurden. Darüber hinausgehende lichtmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Leitz Laser Scanning Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) erstellt.

Alle in der vorliegenden Arbeit präsentierten Abbildungen wurden digital an einem Personal Computer im Adobe Photoshop-Programm 5.0 bzw. 6.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) bearbeitet.



IV. ERGEBNISSE

Photorezeption und die dazu eingesetzten Rezeptororgane kann man durch verschiedene ineinandergreifende neurobiologische Untersuchungsmethoden nachweisen:

- durch Verhaltensreaktionen nach selektiver Beleuchtung bestimmter Körperregionen,
- durch elektrophysiologische Untersuchungen zur Reiz-Erregungstransduktion und rezeptorphysiologischen Charakterisierung,
- durch den histologischen Nachweis von photorezeptortypischen Strukturelementen und
- durch den immunhistochemischen Nachweis von Sehpigmenten, Enzymen und anderen Komponenten der Phototransduktionskaskade.

Schon vor langer Zeit konnte der metasomale Lichtsinn (ML) des Skorpions durch Verhaltensversuche und chronobiologische Studien (Geethabali 1974, Zwicky 1968) wahrscheinlich gemacht und durch elektrophysiologische Untersuchungen (Geethabali und Rao 1973, Geethabali 1974) nachgewiesen werden. Allerdings fehlten bisher jegliche Kenntnisse über seine Struktur, Lage und neuronale Verschaltung, Kenntnisse, die zur Aufklärung der biologischen Funktion notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit konnten durch immunhistologische Analysen und feinstrukturelle Untersuchungen erstmals Zellen als Kandidaten für den ML aufgezeigt und als funktionelle extraretinale Photorezeptoren wahrscheinlich gemacht werden.

IV.1 Immunhistologische Untersuchungen

Lichtmikroskopische Immunhistologie wurde in der vorliegenden Arbeit beispielhaft mit Antikörpern gegen unterschiedliche Komponenten der lichtverarbeitenden Prozesse durchgeführt:



- Bestandteile von Enzymen der Phototransduktionskaskade (Opsine als Photopigmente, G-Proteine (Transducin) am Anfang des photochemischen Zyklus und Arrestin als Protein zur Beendigung dieser Reaktionskette),
- Signale der neuronalen Informationsübertragung (Calmodulin und Histamin) und
- Bestandteile des lichtabhängigen Membranumbaus (Myosin III).

Diverse Immunmarkierungen ermöglichen die exakte Lokalisation des ML. Sie haben insgesamt ergeben, dass es sich nicht um ein kompaktes Organ mit hoch differenzierten Reizleitungsstrukturen (wie z.B. Schirmpigmente oder Linsen) handelt, wie es z.B. von den anderen Photorezeptortypen bekannt ist (siehe Kapitel Hintergrundinformationen). Statt dessen besteht der ML aus vier Gruppen von Zellen, die bilateral nahe des Ursprungs der Konnektive auf der Ventralseite der letzten metasomalen Ganglien gefunden werden können (Abb. IV.1.1). Die kleinen spindelförmigen Rezeptorzellen (Abb. IV.1.1 B, Inset) liegen in der Nähe einer großen Hämolympflakune, die die Zellen des ML von den metasomalen Nervenzellen abtrennt (Abb. IV.1.1 A). Dadurch wird *in vivo* ein relativ sicheres Auffinden der Photorezeptorzellen für weiterführende Untersuchungen ermöglicht, obwohl die Zellkörper selbst z.B. wegen ihrer geringen Größe und fehlender Pigmentierung nicht sichtbar sind.

IV.1.1. Immunreaktivität gegen Enzyme der Phototransduktionskaskade

A) Opsin

Opsin als Proteinanteil der Photopigmente in tierischen Photorezeptoren ist generell in speziell vergrößerten Membranabschnitten, z.B. in den Rhabdomen bei Invertebraten, und ihren lichtinduzierten Umbauprodukten (siehe Abb. IV.1.2) enthalten. Damit sind Opsin-Immunreaktionen nicht nur in den Mikrovillissäumen der Rhabdome sondern im gesamten Soma von Photorezeptorzellen zu erwarten. Tatsächlich konnten in den potentiellen Rezeptorzellen des ML beim Skorpion die kompletten Somata mit Anti-Opsin-Antikörpern gefärbt werden (Abb. IV.1.2 und Abb. IV.1.3).

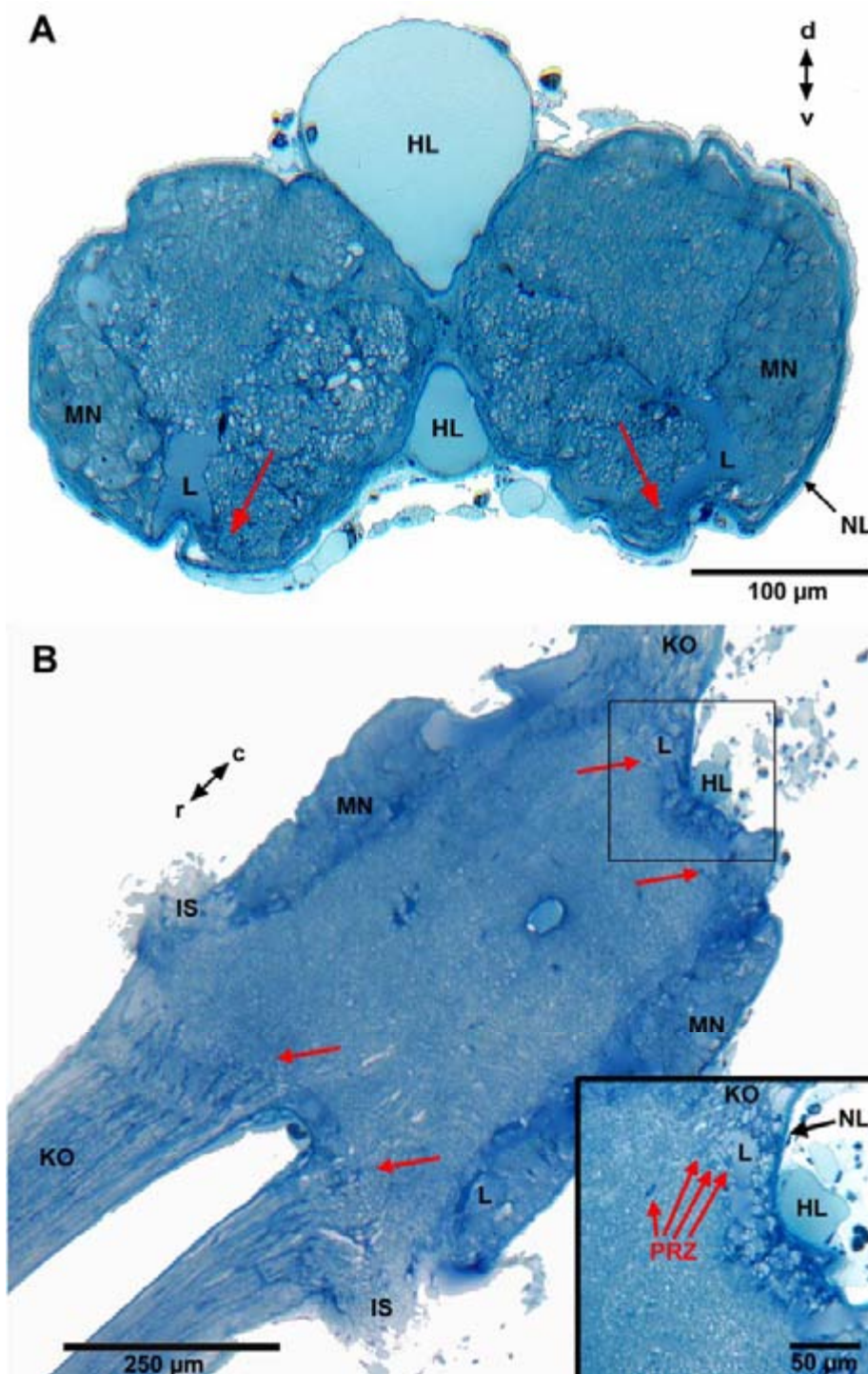


Abb.IV.1.1 A und B: Lage der putativen Photorezeptorzellen in einem metasomalen Ganglion

Transversaler (A) und horizontaler (B) Semidünnschnitt (Methylenblau gefärbt) durch ein siebtes Ganglion (viertes Ganglion im Metasoma) von *Paruroctonus mesaensis*. Das **Inset in (B)** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt (**kleines Viereck**) aus der caudalen Region des Ganglions. Diese Semidünnschnitte wurden in Ultradünnschnittserien weiter analysiert in bezug auf feinstrukturelle Charakteristika der putativen Rezeptorzellen (siehe **Teil IV.2**. Elektronenmikroskopische Befunde). Die **roten Pfeile** zeigen jeweils die Bereiche mit immunzytologisch markierten und/oder feinstrukturell beschriebenen potentiellen Photorezeptorzellen an: Auf der Ventralseite des Ganglions, in der Nähe der Ursprungsorte der Konnektive liegen die markierbaren Zellen deutlich getrennt von den Somata der metasomalen Ganglien. Eine intracerebrale Hämolympflakune nahe dem ventralen Neurolemma ist eine weitere Landmarke zum Auffinden der Rezeptorzellen (siehe auch **Abb. IV.2.8**).

HL: Hämolympfgefäß, **IS:** Ursprungsort der intrasegmentalen Nervenstränge, **KO:** Konnektiv, **L:** intracerebrale Lakune, **MN:** Somata der metasomalen Nervenzellen, **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle, **Doppelpfeil mit „d“ und „v“** (in A): Dorsoventralausrichtung, **Doppelpfeil mit „r“ und „c“** (in B): Rostrocaudalausrichtung.



DAB-Peroxidasemarkierungen von Anti-Blauzapfenopsin-Immunreaktionen an Paraffinschnittserien

Ein gegen die Blauzapfen-Opsine von Kuhaugen hergestellter Antikörper bewirkt Immunmarkierungen von mehreren kleinen Zellgruppen, die ganz nah am Neurolemma liegen (Abb. IV.1.2 A – C). Sie befinden sich bilateral am rostralen und caudalen Ende der 5., 6. und 7. metasomalen Ganglien. Die so markierten Zellen haben ein stark reaktives Soma (Abb. IV.1.2 A) mit einer nur schwach färbbaren Kappe (Abb. IV.1.2 C). Der Zellkern (Abb. IV.1.2 B) und eine kleine Lakune (Abb. IV.1.2 C) innerhalb der Kappe bleiben ungefärbt.

FITC-Peroxidasemarkierungen von Anti-Blauzapfenopsin-Immunreaktionen an Wholemounts

Benutzt man den gleichen Opsin-Antikörper zur Immunfärbung von ganzen Ganglien, kann man die Position und Gruppierung der potentiellen Rezeptorzellen noch besser erkennen. Die Ganglienpräparate verformen sich insgesamt durch die fehlende Stabilisierung eines dauerhaften Einbettmediums und damit die relative Lage der Zellen des ML (Abb. IV.1.2 D und E). Allerdings sind die Zellen des ML mit dem confocalen Laserscanmikroskop in ihrer Gesamtstruktur besser zu erkennen. Anders als bei den Paraffinschnitten kann man sehr deutlich eine gemeinsame große Kappe aus feinfädigem schwach immunreaktivem Material (Abb. IV.1.2 D) über den stark reagierenden Somata von jeweils vier bis sechs Zellen sehen (Abb. IV.1.2 E). Diese Kappe ist nach den elektronenmikroskopischen Befunden aus rhabdom-ähnlichen Mikrovilli zusammengesetzt (siehe unten z.B. Abb. IV.2.10).

FITC-Peroxidasemarkierungen von Anti-Limulus-Opsin-Immunreaktionen an Wholemounts

Mit speziell gegen das Opsin aus den Lateralaugen von *Limulus polyphemus* (dem Skorpion sehr nah verwandten Pfeilschwanzkrebs) hergestellten Antikörpern (von Battelle) konnten die Färbeergebnisse mit dem Anti-Kuhaugen-Opsin-Antikörper spezifiziert und abgesichert werden. Wieder zeigen sich bilateralsymmetrisch nahe der Konnektive auf der Ventralseite pro Ganglion insgesamt 4 Gruppen reaktiver Zellen (Abb. IV.1.3 A) von spindelförmiger Gestalt, die sich klar von den metasomalen Ganglienzellen abheben.

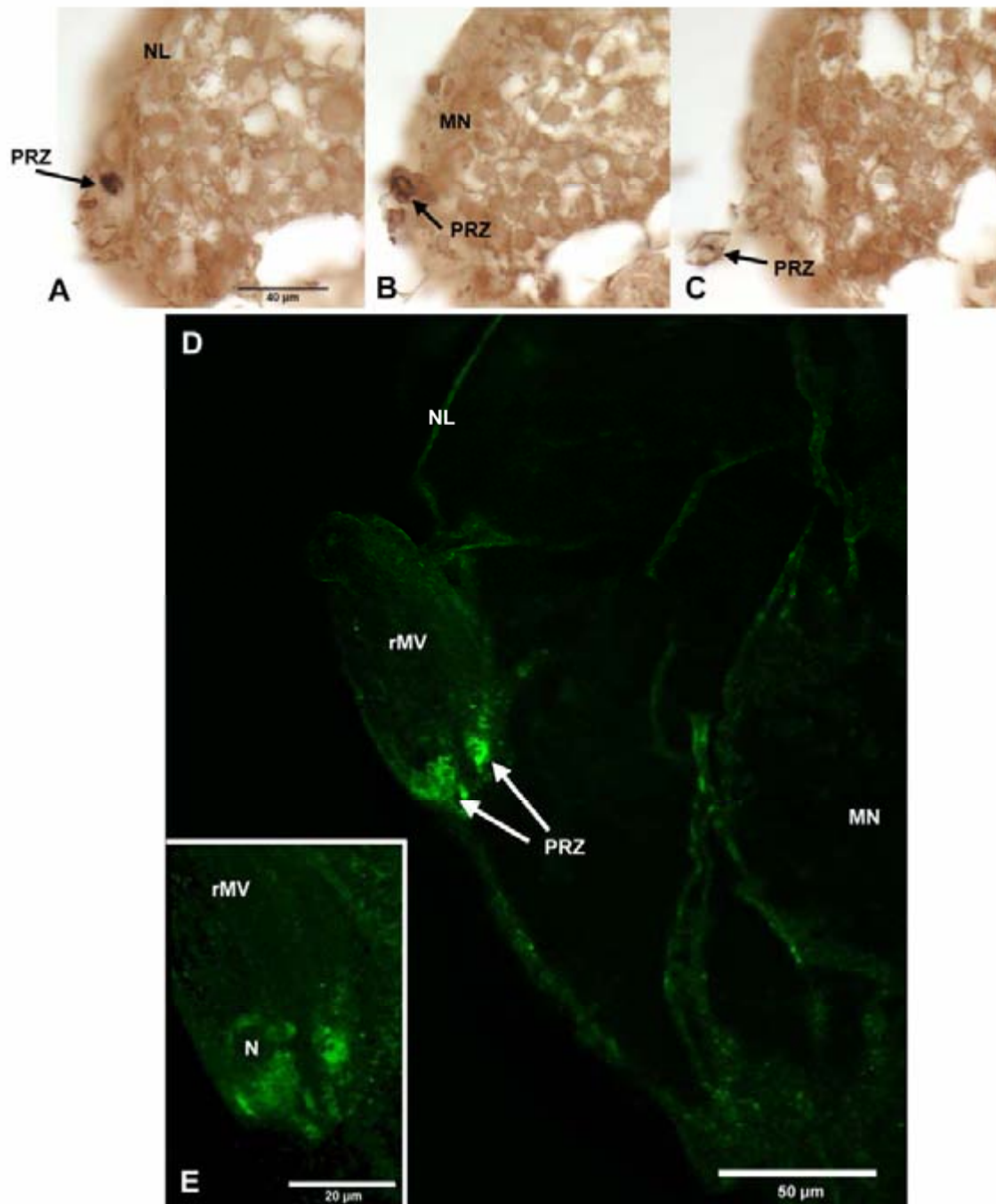


Abb. IV.1.2 A bis E: Immunmarkierungen mit Antikörpern gegen Rinderopsin Photopigmente in Invertebraten- und Vertebratenaugen sind in der Regel Opsine. Anti-Opsin-Antikörper sowohl aus Vertebratenaugen (gegen das Blauzapfenopsin aus Rinderaugen, wie in dieser Abbildung) und auch aus Invertebratenaugen (gegen das Opsin aus den Lateralaugen von *Limulus*, siehe nächste **Abb. IV.1.3**) markieren die retinalen und extraretinalen Photorezeptoren des Skorpions. **A bis C:** Anti-Opsin-Immunfärbung von 3 aufeinanderfolgenden Paraffinschnitten (10 µm, DAB-Färbung) durch das siebte Ganglion des Skorpions *Paruroctonus mesaensis*. Von links nach rechts kann man den basalen Teil des Somas (**A**) mit einer Vielzahl von Membranumbauprodukten (vgl. z.B. **Abb. IV.2.11**), den Somabereich um den nicht gefärbten Zellkern (**B**) und die Kapsel mit den nur schwach reaktiven rhabdomeren Mikrovilli (**C**) nahe am Neurolemma erkennen. **D und E:** "Whole-Mount"-Präparat des siebten Ganglions, das ebenfalls mit dem Antikörper gegen das Rinderaugen-Opsin gefärbt wurde (Immunnachweis: Fluorochromierung des Sekundär-AK mit FITC; **E** Vergrößerter Ausschnitt aus **D**, Confocal-Mikroskop). Auch mit dieser Methode werden die gleichen Zellen nahe dem Neurolemma im siebten Ganglion angezeigt. Ihre stark gefärbten Somata mit klaren Zellkernen (**Pfeile**) setzen sich in einer zart markierten "Fahne" aus rhabdomeren Mikrovilli fort.
MN: metasomale Neurone, **N:** Zellkern, **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle, **rMV:** rhabdomere Mikrovilli.

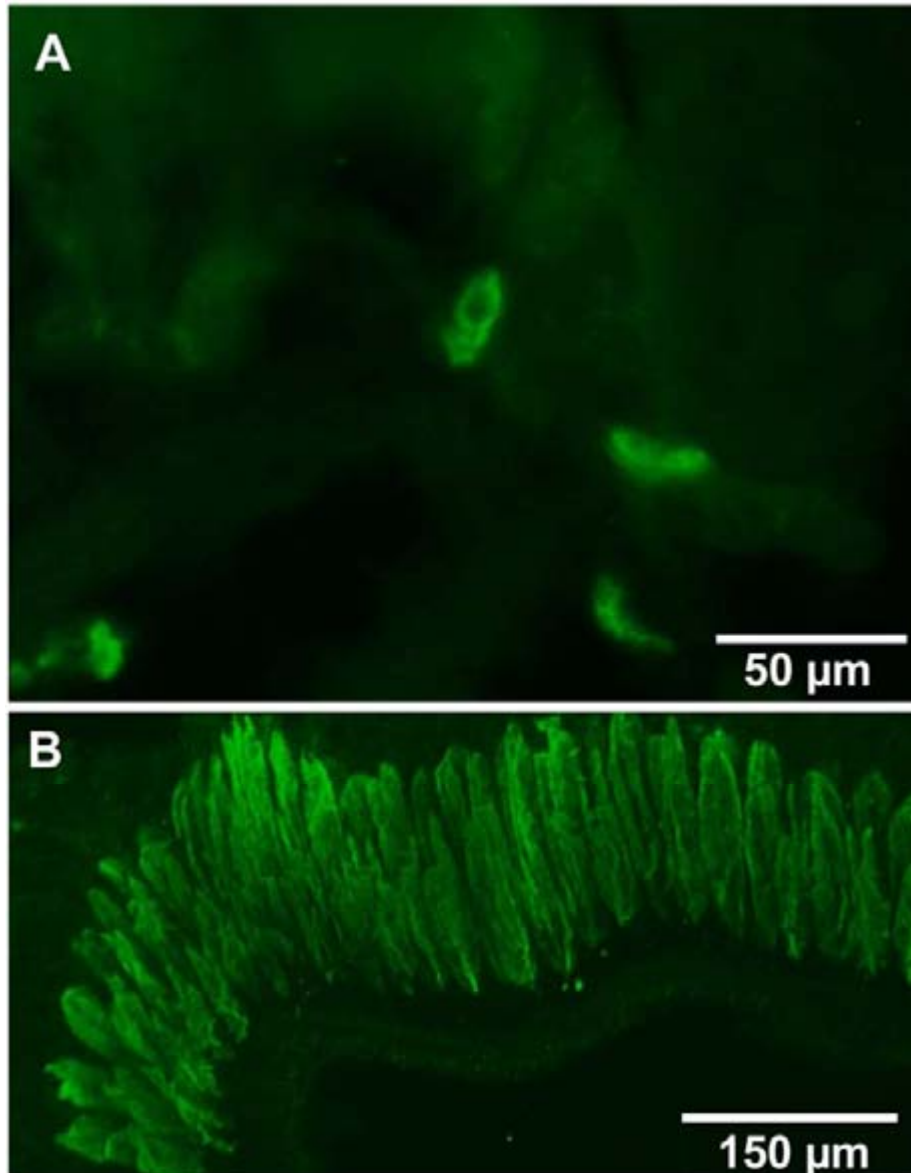


Abb. IV.1.3: Immunmarkierungen mit Antikörpern gegen Limulusopsin

Immunfärbungen mit Anti-*Limulus*-Opsin von "Whole-mount"-Präparaten des siebten Ganglions des Skorpions *Paruroctonus mesaensis* (**A**) und einer Medianaugenretina (**B**) (Immunnachweis: Fluorochromierung des Sekundär-AK mit FITC, Confocal-Mikroskop). (**A**) Relativ dicht beieinander liegen vier opsin-immunreaktive spindelförmige Zellen, an denen bei dieser Präparation (whole-mount) keine weiteren Details erkennbar sind. (**B**) In der Medianaugenretina werden die Rhabdome der Sehzellen über ihre gesamte Länge klar markiert, so dass man sogar die im Querschnitt sternförmige Anordnung der Rhabdomere in den einzelnen Ommatidien erkennen kann. Dieser Reaktionsnachweis in den retinalen Photorezeptoren des Skorpions kann als Positivkontrolle für den Antikörper gewertet werden.



Kontrollpräparate

Als Spezifitätskontrollen wurden sowohl Positiv- wie auch Negativ-Kontrollpräparate hergestellt: Als Negativ-Kontrollen dienten Wholemounds, bei denen die beiden primären Antikörper weggelassen wurden. Die Ganglien zeigten keinerlei Immunreaktivität. Als Positiv-Kontrollen haben wir die Retinae der Median- und Lateralaugen mit den Opsin-Antikörpern gefärbt. Hierbei wurden die photopigmentbeladenen Rhabdome klar gezeichnet (Abb. IV.1.3 B). Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass die hier eingesetzten Antikörper in dem getesteten Skorpiongewebe spezifisch an Opsine binden.

B) Transducin

Der erste Schritt bei der Reizerregungstransduktion bei einem Photorezeptor erfolgt durch das Enzym Transducin, ein an das Opsin gekoppeltes G-Protein. Immunreaktionen mit Antikörpern gegen Teile dieses Moleküls sollten daher im Prinzip die gleichen Zellorganellen aufzeigen wie die Anti-Opsin-Antikörper.

FITC-Peroxidasemarkierungen von Anti-Gαq-Immunreaktionen an Wholemounds

Für die Analyse des ML des Skorpions wurde ein Antikörper gegen das α Protein des Transducins verwendet. Die lichtmikroskopische Visualisierung der Gαq -Protein-Immunreaktion erfolgte über einen fluorchromierten sekundären Antikörper (FITC). Am besten sichtbar in Präparaten von vollständigen Ganglien (Abb. IV.1.4) zeigen sich - wie zuvor bei den Anti-Opsinfärbungen - kleine Zellgruppen an der Ganglienunterseite nahe den Konnektiven mit dicht bei einander liegende Zellen (Abb. IV.1.4 C), die eine längliche Haube aus feinfädigem Material tragen (Abb. IV.1.4 A). Zusätzlich kann ein Axon verfolgt werden, dass aus dem stark gefärbten Somabereich der Zellen entspringt (Abb. IV.1.4 A). Es zieht in den zentralen Ganglienbereich. Nach Lage, Zahl und Größe der Zellen entsprechen diese den Opsin-positiven Zellen.

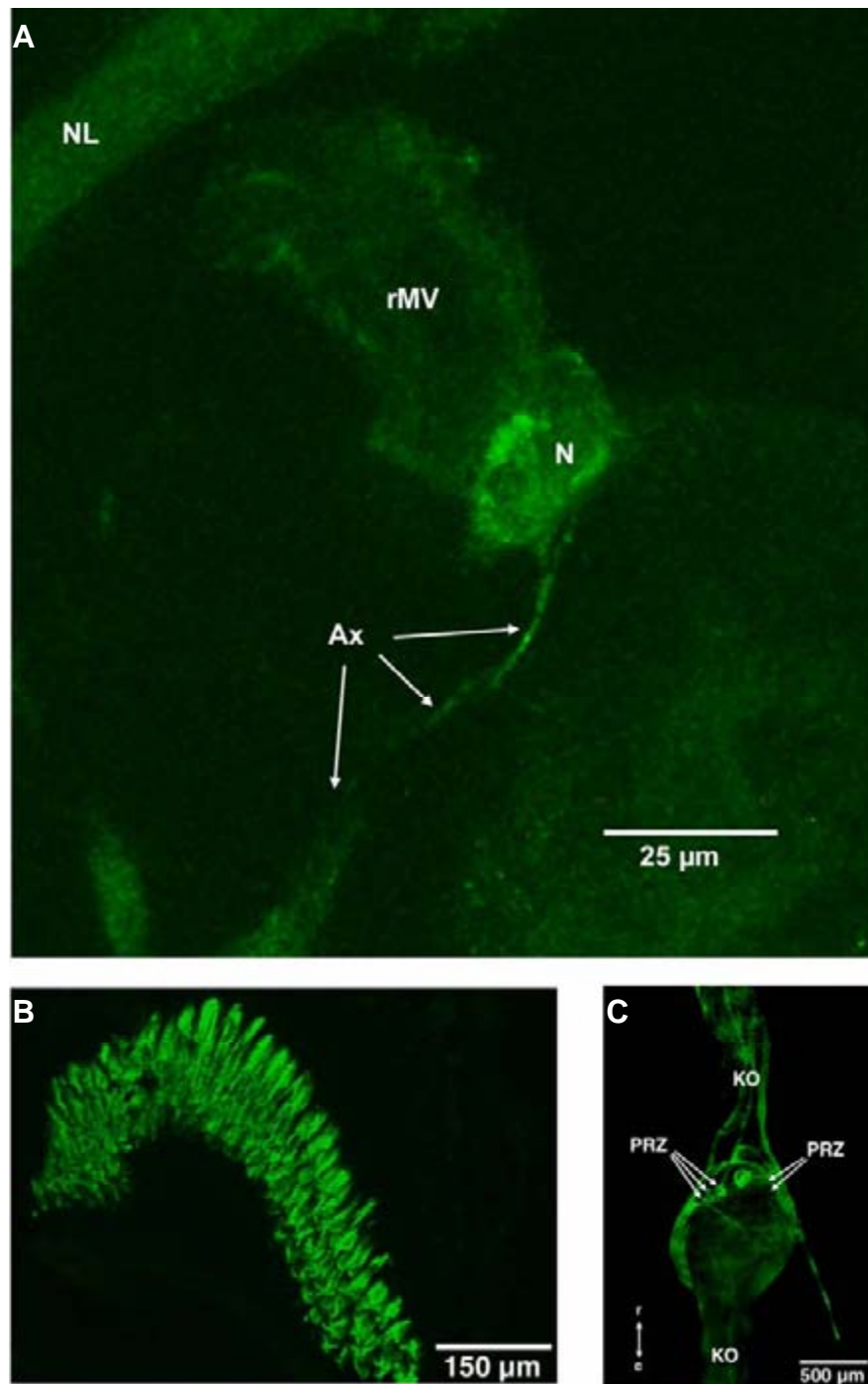


Abb. IV.1.4 A bis C: Immunmarkierungen mit einem Anti-Transducin-Antikörper ($G\alpha_q$)

Der Transduktionsprozess von Lichtenergie in eine Erregung der Photorezeptormembran erfolgt generell über die Bindung von Opsinen an spezielle G-Proteine. Dabei findet eine erste Verstärkung des Signals um mehrere log Einheiten statt. Immunmarkierungen mit einem Bestandteil des G-Proteins (hier z.B: die α -Untereinheit) zeigen nahezu die gleichen Zellelemente der Photorezeptorzellen an wie die Opsinmarkierungen. Dies gilt auch für den metasomalen Lichtsinn des Skorpions ("Whole-mount"-Präparate, Immunnachweis: mit FITC fluorochromierter Sekundär-AK, Confocal-Mikroskop): **(A)** Kleine Gruppe von Photorezeptorzellen im siebten Ganglion mit deutlich gefärbten Somata bei Auslassung des Zellkerns und zart getönten rhabdomeren Mikrovilli, die - wie in den Opsin-Färbungen (vgl. **Fig. IV.1.2**) - fahnenartig bis zum Neurolemma reichen. **(B)** Als Positivkontrolle wurde mit dem gleichen Antikörper die Retina eines Medianauges gefärbt. Wie bei der Opsin-Färbung sind die Rhabdome der Rezeptorzellen klar erkennbar. **(C)** Dickschnitt (40 μm) durch ein siebtes Ganglion, in dem am rostralen Rand einige Gruppen von immunreaktiven Zellkörpern zu sehen sind. Die "Axonfortsätze" der reaktiven Zellen sind möglicherweise Artefakte durch losgelöste Teile des Neurolemmas ebenso wie die kugelförmige Struktur zwischen den bilateral angeordneten immunreaktiven Zellkörpern. (Durch das Sampling-Verfahren des confocalen Mikroskops weist die Darstellung schräge Streifen auf).

Ax: Axon, **KO:** Konnektiv, **N:** Zellkern, **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle, **rMV:** rhabdomere Mikrovilli.



Kontrollpräparate

Kontrollpräparate, in denen die primären Antikörper (gegen Anti-Gαq) weggelassen wurden, zeigten keinerlei Immunreaktivität. In der Retina der Medianaugen des Skorpions färben sich dagegen die bekanntermaßen photopigmenttragenden Rhabdome erwartungsgemäß mit diesem Antikörper (Abb. IV.1.4 B) – eine eindeutige Positivkontrolle. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass der hier eingesetzte kommerzielle Antikörper gegen Gαq in den getesteten Skorpiongeweben hochspezifisch Photorezeption nachweist.

C) Arrestin

Entscheidend für die Dynamik der photochemischen Reaktionen ist die Beendigung der Bindung von Opsin und Transducin durch ein „Stopsignal“, das Arrestin. Entsprechend den ökophysiologischen Anforderungen an das Sehvermögen bei verschiedenen Tieren, unterliegt dieses große Molekül vielfältigen Variationen. Dennoch gibt es Bereiche, die in den Arrestinen aus Augen von Kühen, Fliegen, Krebsen und sogar beim Menschen gleich geblieben sind. Ein solcher Bereich ist z.B. die „C10C10“ genannte Region. Für die Untersuchungen am ML des Skorpions wurden Immunreaktionen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Sequenzen des visuellen Arrestins getestet.

FITC und TRITC-Peroxidasemarkierungen von Anti-Arrestin-Immunreaktionen an Wholemounts

Im Labor von Battelle, St. Augustine, wurde ein Antikörper hergestellt und biochemisch charakterisiert, der gegen eine lange Sequenz des visuellen Arrestins aus den Lateralaugen vom Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (ein dem Skorpion sehr nah verwandter Chelicerat) gerichtet ist. Er wurde histologisch in vergleichenden Untersuchungen an Limulusaugen, den Medianaugen des Skorpions, und den metasomalen Ganglien auf seine Spezifität für Photorezeptorzellen des Skorpions getestet. Diese Arrestin-Immunfärbungen an Wholemounts, die mit einem fluorchromierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurden, zeigen in den letzten metasomalen Ganglien reaktive Gruppen von wenigen Zellen, die relativ dicht



beieinander liegen (Abb. IV.1.5 A). Durch die Dokumentation mit einem confocalen Laserscanmikroskop konnten mehrere Ebenen aufeinander projiziert werden. Mit dieser Methode wird sichtbar, dass die potentiellen Photorezeptorzellen Cluster bilden, die in mehreren Ebenen liegen. Ihre Somata sind dicht angefüllt mit Reaktionsprodukten, die Zellkerne sind frei. Keine der metasomalen Ganglienzellen wird mit diesem Antikörper gefärbt. In den Medianaugen des Skorpions (siehe unten Kontrollpräparate, Abb. IV.1.5 B) sind Somata und rhabdomere Mikrovilli durch das anti-Arrestin markiert. Möglicherweise weist die schwache Tönung am rechten Bildrand von Abb. IV.1.5 A auf Arrestin-Bindungsstellen auf der zu dieser Zellgruppe gehörenden Fahne aus rhabdomeren Mikrovilli hin, wie sie mit den Anti-Opsin-Antikörpern (vgl. Abb. IV.1.2 und 3) gefärbt werden konnten.

DAB-Peroxidasemarkierungen von Anti-Arrestin-Immunreaktionen an Paraffinschnitten

Der hier verwendeten monoklonalen Antikörper wurde gegen ein invariantes Teilstück C10C10 des visuellen Arrestins im Labor von Donoso (Philadelphia, USA) aus Rinderaugen hergestellt. In horizontalen Paraffinschnitten durch die letzten abdominalen Ganglien des Skorpions, die mit diesem Antikörper gefärbt wurden, kann man wesentliche Strukturdetails der potentiellen Rezeptorzellen des ML erkennen (Abb. IV.1.5 C). Nicht nur das Soma mit klarem Kern ist erkennbar, sondern auch eine Haube aus einer Vielzahl von Mikrovilli, die vermutlich als eine gemeinsame Struktur aus mehreren dicht bei einander liegenden Rezeptorzellen gebildet wird (vgl. Abb. IV.1.5 A). In dieser Abbildung ist nur eine dieser Zellen angeschnitten. Gemäß den elektronenmikroskopischen Untersuchungen (vgl. Teil IV.2) nimmt die Masse dieser Mikrovillahaube bei Belichtung ab, bei Dunkelheit zu. In der gezeigten Abbildung ist ein dunkeladaptiertes Nachtpräparat geschnitten worden. Der Komplex aus Somata und Mikrovillahaube scheint von einer Bindegewebskapsel umschlossen zu sein (Abb. IV.1.5 C). Die Arrestin-Immunfärbung reicht weit bis in die Axone der Zellen hinein, die innerhalb des metasomalen Ganglions enden, in dem auch ihre Zellkörper liegen. Dieser Befund konnte durch die Histamin-Immunreaktionen bestätigt werden (siehe unten Abb. IV.1.6).

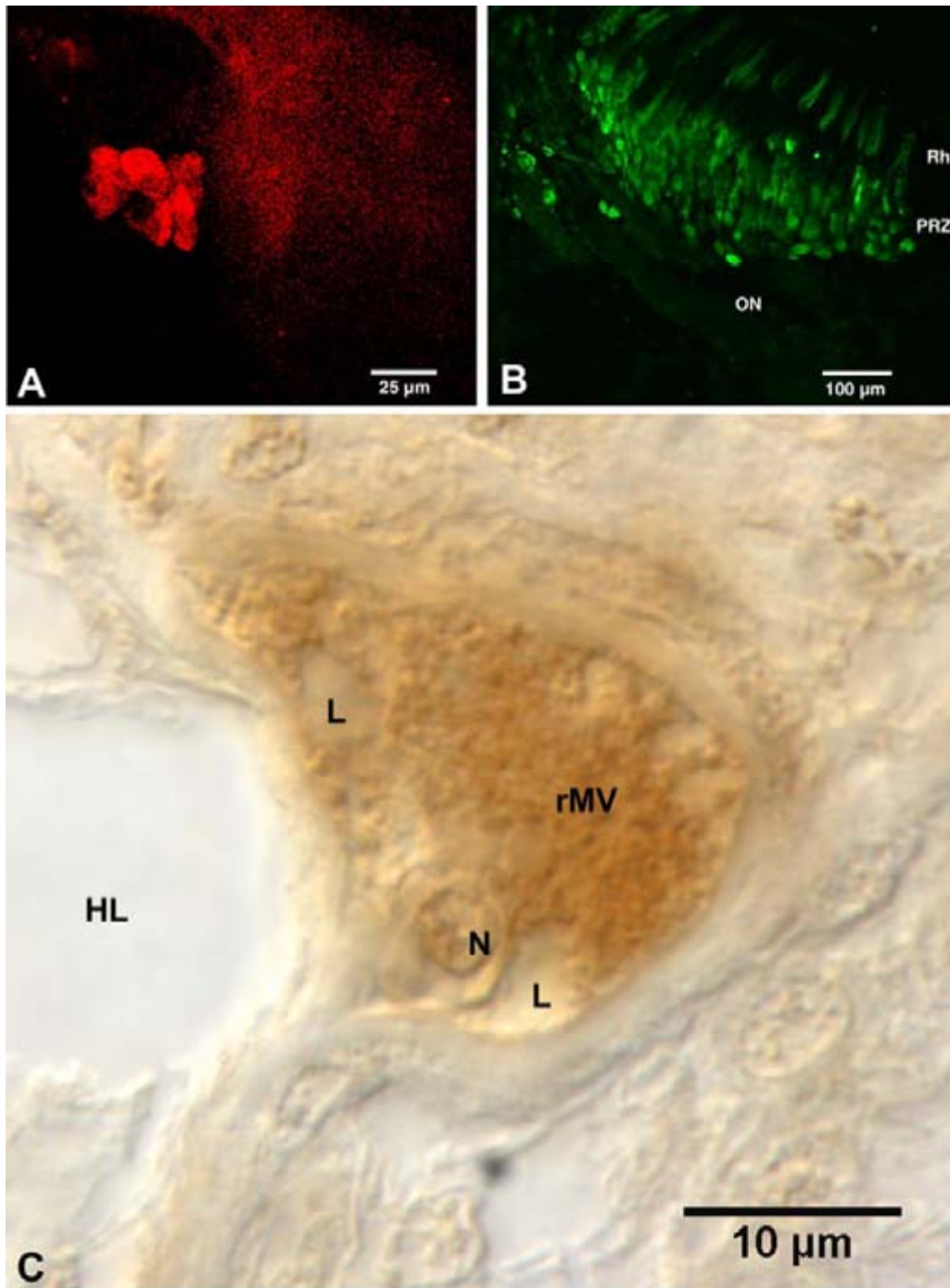


Abb. IV.1.5 A bis C: Immunmarkierungen mit Anti-Arrestin-Antikörpern

Die Enzymkaskade des photochemischen Zyklus wird u. a. durch Arrestin abgeschaltet, das die Bindung von Opsin an die G-Proteine verhindert. Die Arrestine können bei verschiedenen Tieren in mehreren Molekülbereichen stark variieren, andere Bereiche sind invariant und können daher für Immunnachweise genutzt werden. (Immunmarkierungen des siebten Ganglions des Skorpions *Paruroctonus mesaensis* mit einem Antikörper gegen das Arrestin aus Limulusaugen (**A** und **B** Whole-Mount-Präparate, Immunnachweis: fluorochromierter Sekundärantikörper FITC/grün und TRITC/rot, Confocal-Mikroskop) und einem Anti-Arrestin aus Kuhaugen (**C** 10 µm dicke Paraffinschnitte, Immunnachweis: DAB). (**A**) Deutlich zu sehen ist hier eine Gruppierung von mehreren Zellen mit stark angefärbtem Cytoplasma. Die rhabdomeren Mikrovilli sind nicht klar zu erkennen, eventuell geben sie die helle Färbung am rechten Bildrand. (**B**) Der gleiche Antikörper aus Limulus färbt sehr deutlich die Somata und Rhabdome der retinalen Photorezeptorzellen in der Medianaugenretina des Skorpions. Die Sehzellaxone werden nicht dargestellt. (**C**) In einem dunkeladaptierten Nachtpräparat wird durch die Anti-Arrestinfärbung die elektronenmikroskopisch hergeleitete Struktur der Photorezeptorzellen (vgl. **Abb. IV.2.1**) des metasomalen Lichtsinns erkennbar, insbesondere die große Haube aus rhabdomeren Mikrovilli. Vermutlich wird diese Haube von mehreren Somata gebildet, die nicht in dieser Schnittebene liegen.

HL: Hämolympdraum, **L:** Lakune, **N:** Zellkern, **ON:** Sehnerv, **PRZ:** Photorezeptorzellen, **Rh:** Rhabdom, **rMV:** rhabdomere Mikrovilli.



Kontrollpräparate

Kontrollpräparate, in denen die primären Antikörper (MAB C10C10 und *Limulus* Arrestin) weggelassen wurden, zeigten keine spezifische Immunreaktivität (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle wurden die Medianaugen des Skorpions zusammen mit den Lateralaugen von *Limulus* in denselben Färbereihen mit beiden Antikörpern behandelt. Diese in ihrer Struktur bekannten Photorezeptoren zeigten Anti-Arrestinfärbungen in den Somata der Photorezeptorzellen und den Photopigment tragenden Strukturen, den Rhabdomen (Skorpion: Abb. IV.1.5 B). Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass die hier eingesetzten Antikörper auch in den metasomalen Ganglien photorezeptorspezifisches Arrestin und damit zur Photorezeption befähigte Zellen markieren.

IV.1.2 Immunreaktivität gegen afferente und efferente Transmitter von Photorezeptoren

A) Histamin

Die Photorezeptoren der Invertebraten haben in der Regel Histamin als Transmitter der lichtinduzierten Erregung auf die ersten Interneurone. Zusätzlich kommt dieses biogene Amin auch in vielfältigen anderen Funktionskreisen vor und kann insbesondere in den intersegmentalen Bahnen des zentralen Alarmsystems nachgewiesen werden. Für den ML des Skorpions galt es zu zeigen, dass dieser Rezeptor - wie alle anderen Invertebraten-Photorezeptoren - Histamin als Transmitter nutzt. Anti-Histamin-Immunhistochemie hat allerdings den Nachteil der unvermeidbar schlechten Gewebserhaltung, da für die kommerziell verfügbaren Antikörper eine Carbodiimid-Fixierung verwendet werden muss. Dennoch ist die Lokalisation von reaktiven Zellen und ihren Faserverbindungen deutlich gegenüber dem unmarkierten Hintergrund zu erkennen. Die histamin-immunreaktiven Zellen sind im selben Bereich wie die anti-Opsin und anti-Arrestin immunmarkierten Zellen zu finden: nahe dem Neurolemma an der Basis der Konnektive. Die in kleinen Gruppen angeordneten spindelförmigen Zellen mit ungefärbtem Zellkern haben ein kurzes Axon, das in nahegelegenen, ipsilateralen Neuropilen endet (Abb. IV.1.6). Die Mikrovillahaube, die

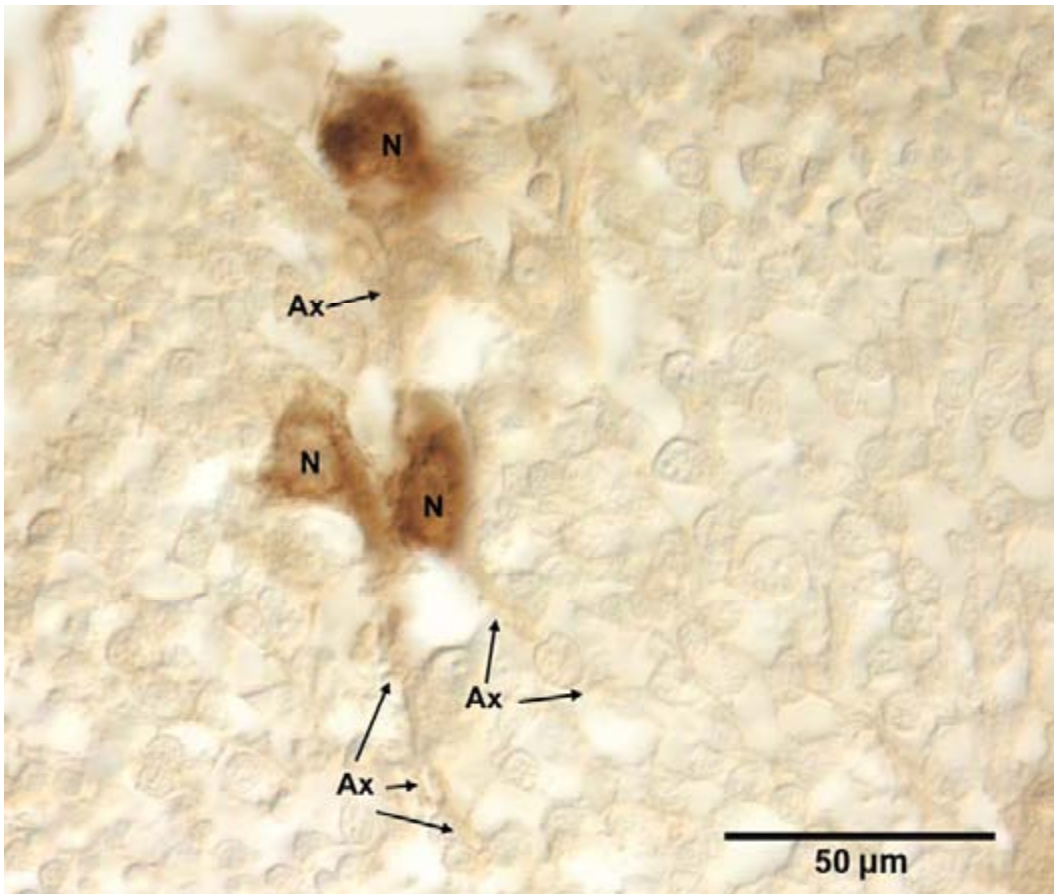


Abb. IV.1.6: Immunmarkierungen mit Anti-Histamin-Antikörpern

Invertebratenphotorezeptoren nutzen generell Histamin als chemisches Signal zur Informationsübertragung auf die ersten Interneurone. (10 μm dicker Paraffinschnitt durch ein siebtes Ganglion, Immunnachweis durch DAB). Die Strukturkandidaten für den metasomalen Lichtsinn zeigen eine passende Anti-Histamin-Immunreaktivität: Drei Zellen sind in diesem Schnitt mit ihren Somata und kurzen Axonfortsätzen deutlich angefärbt und können so von den umgebenden Ganglienzellen unterschieden werden. Dass sich die Mikrovillihaube in den Histaminimmunreaktionen nicht darstellt, kann auch zu der spezifischen Reaktion gerechnet werden.

Ax: Axon, **N:** Zellkern.



in den Immunfärbungen mit Opsin und Arrestin deutlich erkennbar ist, wird von den Anti-Histamin-Antikörpern nicht erkannt. Außerdem zeigen anti-Histaminfärbungen intersegmentale und kontralaterale Axonverbindungen, teilweise mit Terminalen nahe den afferenten Photorezeptorzellen des ML. Mit dieser Methode kann nicht entschieden werden, ob es eine neuronale Verbindung zwischen diesen beiden Systemen gibt.

Kontrollpräparate

Kontrollpräparate, in denen die primären Antikörper (anti-Histamin) weggelassen wurden, zeigten keine Immunreaktivität. Das gleiche Ergebnis zeigten Präabsorptions-Tests mit dem kommerziell verfügbaren Test-Kit zum verwendeten Histamin-Antikörper. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass der hier eingesetzte Antikörper in dem getesteten Skorpiongewebe authentisches Histamin markiert.

B) Serotonin und Glutamat

In denselben Ganglien, dicht neben diesen histaminergen "Pathways", konnten serotonerge und glutaminerge Neurone gefunden werden. Vorläufige TEM-Untersuchungen an mit anti-5-HT-markierten Fasern und ihren Synapsenregionen sprechen für eine serotonerge Innervation des ML (hier nicht gezeigt). Diese Untersuchungen sollen allerdings Gegenstand eines weiterführenden Projekts werden.

IV.1.3 Immunreaktivität gegen regulatorische Enzyme des Membranbaus

A) Myosin III

Die Augen von nachtaktiven Tieren ändern kontrolliert von der inneren Uhr ihre Lichtempfindlichkeit um mehrere Zehnerpotenzen (z.B. Skorpion: 1971, 1974). Durch die Untersuchungen von Battelle (St. Augustine, USA) am Limulusauge konnte gezeigt werden, dass diese efferenten Kontrollsignale die Phosphoproteine der Zelle



regulieren können und so z.B. die Ab- und Umbauprozesse der rhabdomeren Mikrovilli beeinflussen. Ein Schlüsselmolekül hierbei ist ein spezielles Myosin, das Myosin III oder NINA C (Battelle et al. 1998). Das Myosin III von *Limulus* wurde in diesem Labor sequenziert und immunocytochemisch charakterisiert. Es konnte für die vorliegenden Untersuchungen am Skorpion genutzt werden.

Bei den immunhistochemischen Anti-Myosin-III-Färbungen von metasomalen Ganglien des Skorpions in Paraffin- und Gefrierschnitten wie auch Wholemounts wurden die gleichen Zellgruppen markiert, die auch mit den anti-Opsin, anti-Arrestin und anti-Gαq Antikörpern gefunden wurden. Wenige spindelförmige Zellen liegen dicht bei einander nahe dem Ursprungsort der Konnektive (Abb. IV.1.7). Es ist allerdings unklar, weshalb bei den Anti-Myosin-Färbungen die rhabdomeren Mikrovilli nicht erkennbar sind. Dies mag daran liegen, dass hier nur helladaptierte Tagpräparate verfügbar waren. Die Untersuchungen sollten mit Nachtpräparaten wiederholt werden.

Kontrollpräparate

Kontrollpräparate, in denen die primären Antikörper (anti-Myosin-III) weggelassen wurden, zeigten keine Immunreaktivität. Wegen zu geringer photorezeptor-spezifischer Proteinmengen in den metasomalen Ganglien konnten keine Western-Blots durchgeführt werden.

B) Calmodulin

Fluoreszenzmarkierungen am ML

In *Limulus*augen konnte gezeigt werden, dass Myosin-III an Calmodulin bindet, wenn keine Ca^{++} -Ionen vorhanden sind. Damit kann die nächtliche Empfindlichkeitssteigerung über eine Konzentrationskontrolle der Phosphoproteine reguliert werden. Daraus ergibt sich, dass Calmodulin in den gleichen Kompartimenten der Photorezeptoren nachweisbar sein muss wie Myosin-III. Bei den vorliegenden Untersuchungen zum ML des Skorpions sollten sich die potentiellen Rezeptorzellen ebenfalls mit einem Anti-Calmodulin-Antikörper markieren lassen. Die

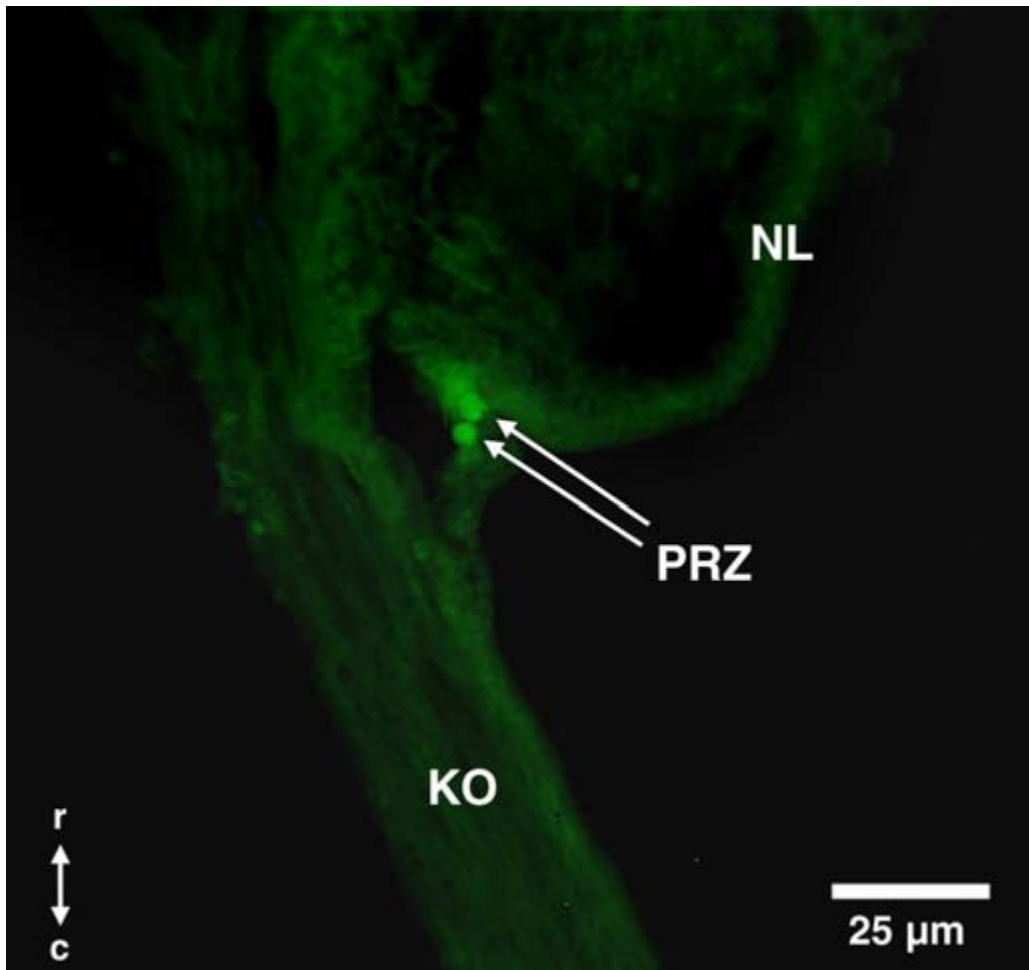


Abb. IV. 1.7: Immunmarkierungen mit Anti-Myosin III-Antikörpern.

Essentieller Bestandteil des Membranumbauprozesses in Photorezeptoren ist ein spezielles Myosin III. (Gefrierschnitt aus einem siebten Ganglion, Immunnachweis: mit DTAF-fluorochromiertem Sekundärantikörper). Die Lokalisation der hier mit Myosin III gefärbten potentiellen Photorezeptorzellen am Ursprung der Konnektive und nahe dem Neurolemma stimmt mit den Befunden aus anderen Färbungen überein.

KO: Konnektiv, **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle, **r:** rostral, **c:** caudal



lichtmikroskopische Visualisierung der Immunantwort erfolgte über fluorochromierte sekundäre Antikörper (FITC und DTAF). Aber anders als in den Limulusaugen haben in den Skorpionganglien offensichtlich auch die umgebenden Neurone so hohe Calmodulin-Level, dass mit beiden Nachweismethoden keine spezifischen Markierungen der potentiellen Rezeptorzellen des ML erkannt werden können. Daher wurden diese Färbungen nicht weiter verfolgt.

IV.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse über den metasomalen Lichtsinn

Mit elektronenmikroskopischen Studien an Ultradünnschnittserien durch die metasomalen Ganglien des Skorpions sind sowohl die feinstrukturellen Details der potentiellen Photorezeptorzellen des ML dokumentiert worden als auch ihre lichtabhängigen Veränderungen. Zusammen mit den Befunden aus den immunhistologischen Untersuchungen (siehe IV.1), die sich sehr gut in den elektronenmikroskopischen Ergebnissen wiederfinden lassen, können damit spezielle Zellen identifiziert werden, welche die strukturelle Basis für den ML des Skorpions darstellen.

IV.2.1 Feinstruktur der Rezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns

Schematische Darstellung der Zellstruktur

Die potentiellen Photorezeptorzellen des ML, die der Einfachheit halber im folgenden Text nur noch Rezeptorzellen genannt werden, scheinen eine einheitliche Grundstruktur zu haben, die ihr Auffinden im TEM und ihre Unterscheidung von den Somata der metasomalen Neurone erleichtert. Diese Grundstruktur ist in Abb. IV.2.1 zusammenfassend schematisch dargestellt. Die spindelförmigen Zellen, die jeweils zu 2 bis 6 in einer kleinen Gruppe zusammenliegen, tragen am apikalen Pol eine Haube aus rhabdom-ähnlichen Mikrovilli und am entgegengesetzten Zellende ein

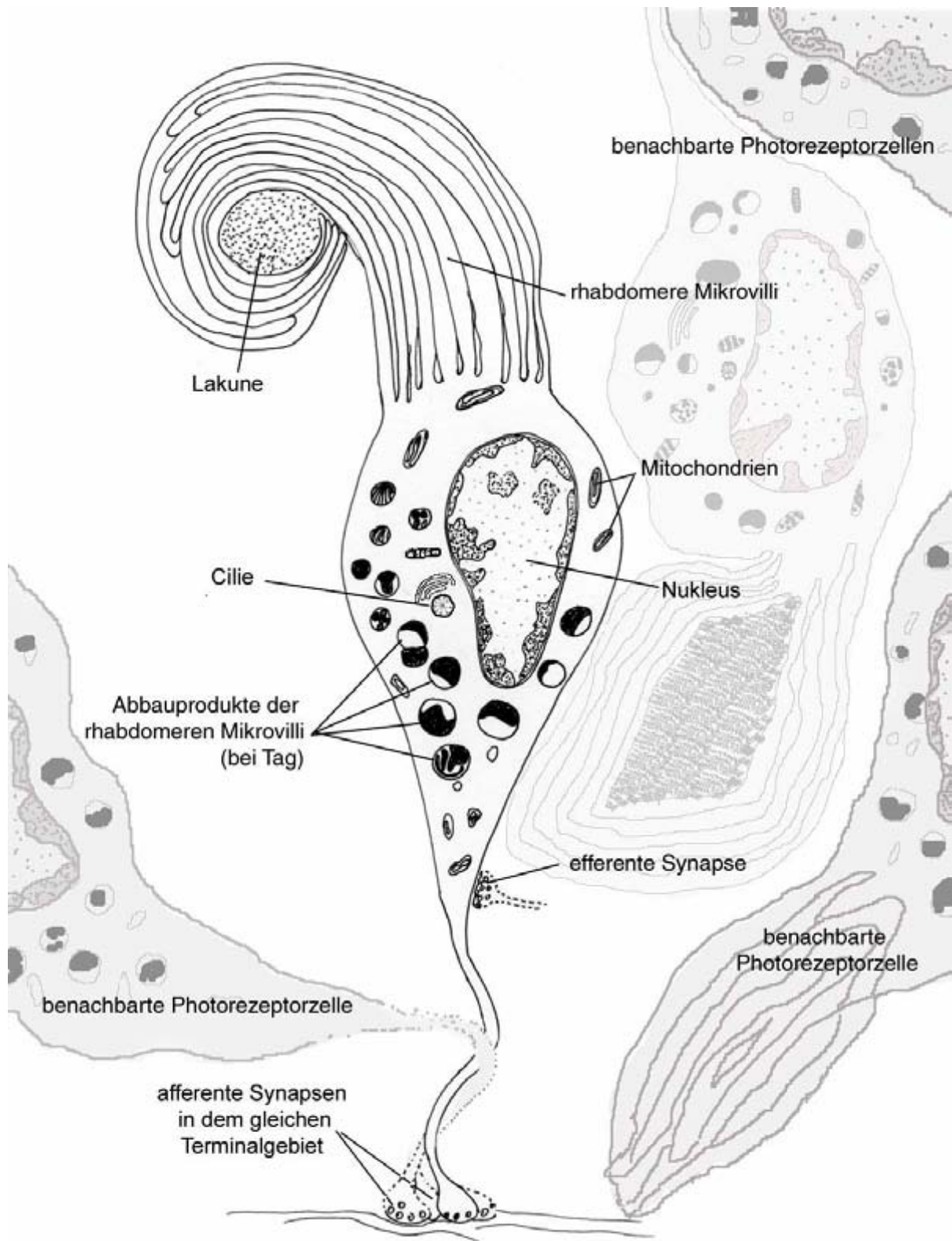


Abb. IV.2.1: Schematische Rekonstruktion der Feinstruktur einer putativen Rezeptorzelle des metasomalen Lichtsinns des Skorpions (nach mehreren Serien von Ultradünnschnitten durch das sechste und siebte Ganglion). Die Zellen haben drei markante Teile: (1) einen Somabereich, der in der Regel durch eine größere Anzahl von Organellen gekennzeichnet ist, die beim Membranumbau der rhabdomeren Mikrovilli entstehen, (2) eine Haube aus langen rhabdom-ähnlichen Mikrovilli, die in unregelmäßiger Anordnung eine Lakune umfassen, und (3) ein afferentes Axon, das noch vor seiner Synapse mehrfach efferenten Input erhält. Eine große Anzahl relativ kleiner Mitochondrien, ein an Ribosomen reiches Cytoplasma und ein Kern mit relativ viel Heterochromatin deuten auf einen hochaktiven spezifischen Metabolismus dieser Zellen hin. Als Besonderheit haben diese Zellen eine kurze Cilie, die meist in der Nähe von Kern und Golgi-Apparat liegt. Oftmals liegen mehrere solcher Zellen dicht beieinander, so dass ihre Mikrovilli eine gemeinsame - auch im Lichtmikroskop gut sichtbare - Kappe bilden.

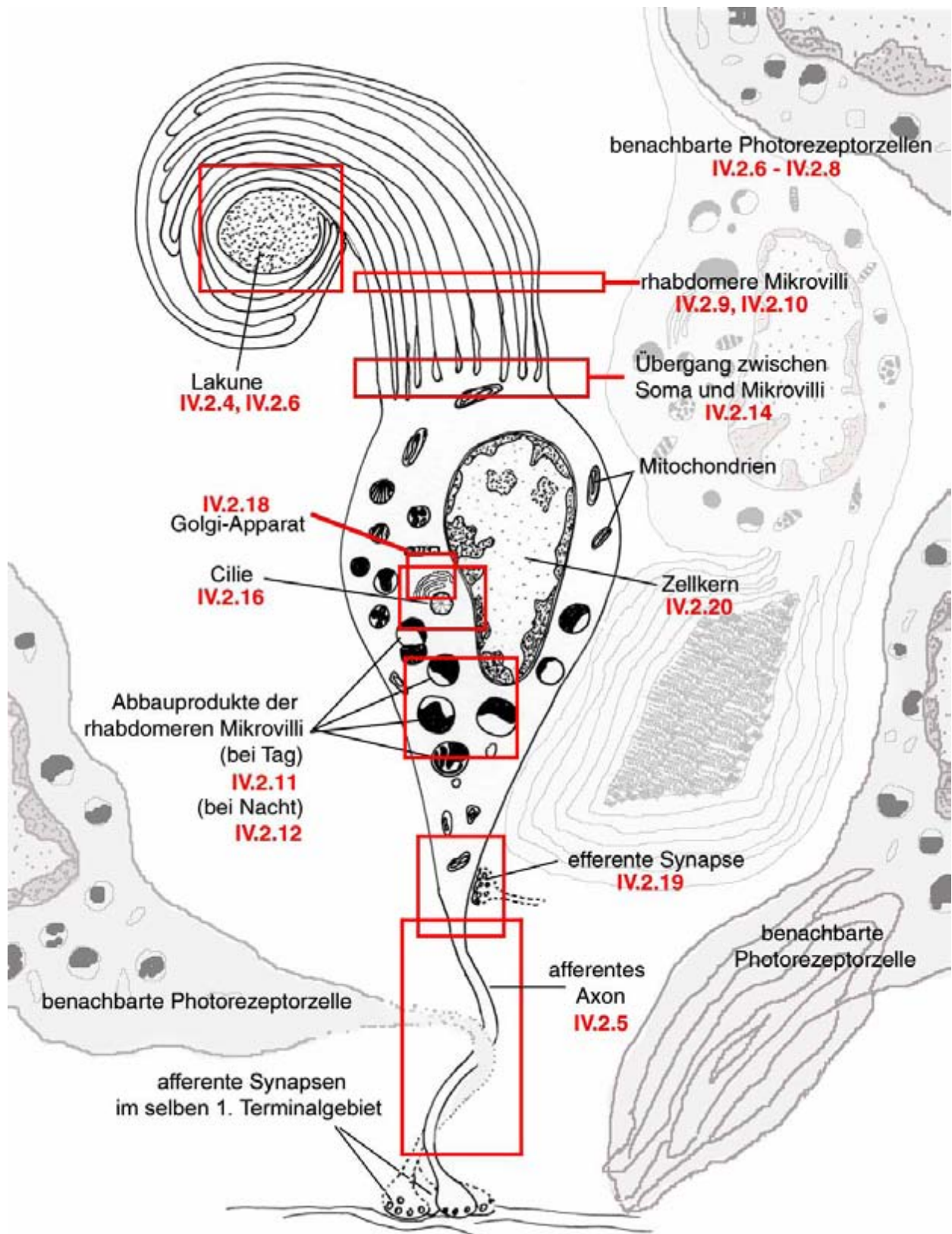


Abb. IV.2.2: als Übersicht für die Zuordnung der nachfolgenden TEM-Bilder

Rote Rahmen markieren die ungefähre Lage und Ausschnitte der TEM-Bilder in Bezug auf die Rekonstruktion einer mit ihren Abbildungsnummern (in rot).

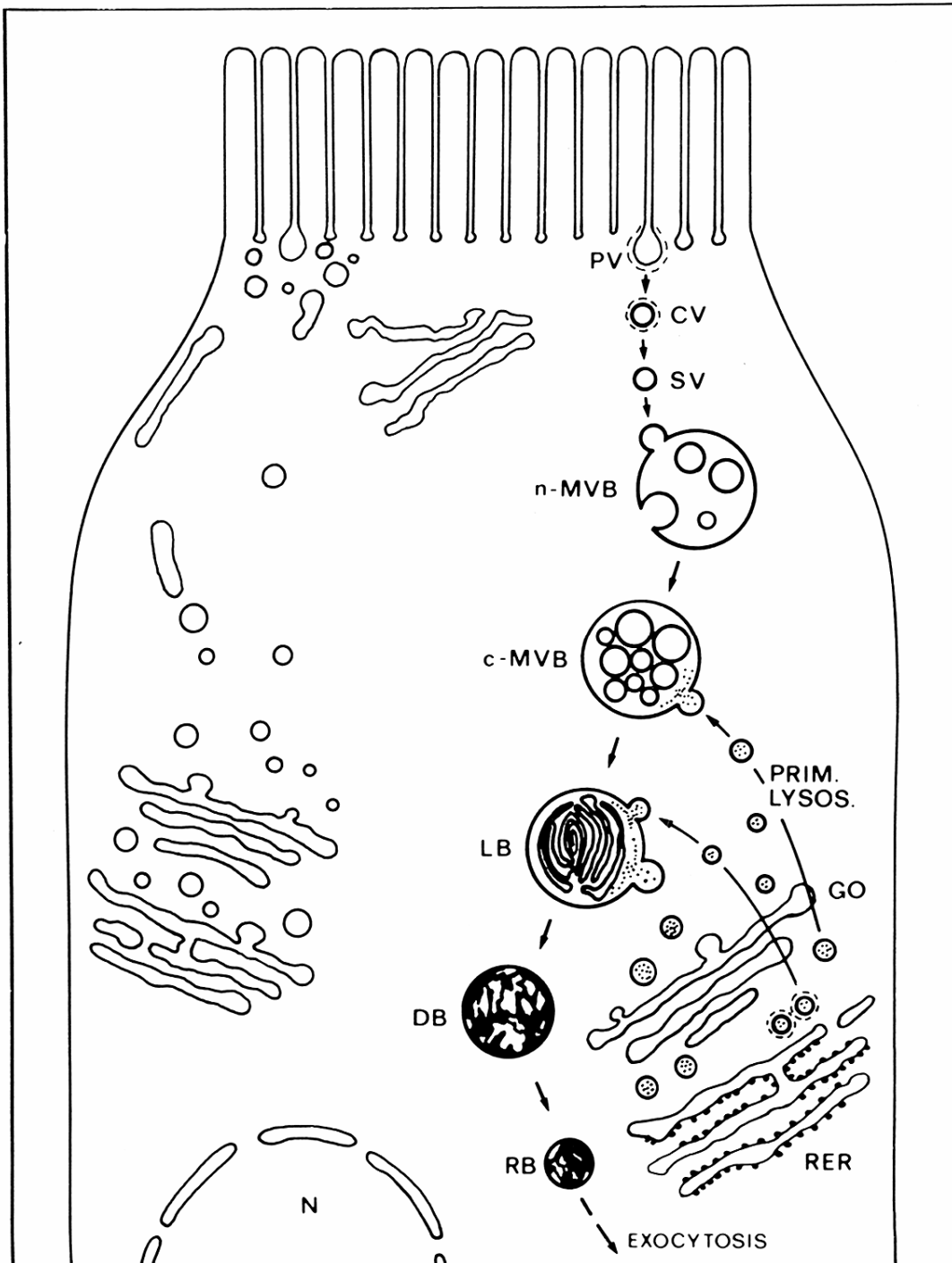


Abb. IV.2.3: Schematischer Ablauf des rhabdomeren Membranabbaus in Photorezeptorzellen von Arthropoden Als Ergebnis von vielfältigen Untersuchungen zum Ab- und Umbau der Photopigmente tragenden Mikrovillimembranen in den Rhabdomen der Komplexaugen von Insekten hat Schwemer ein allgemein gültiges Schema der Stadienabfolge veröffentlicht (*Schwemer 1984*). Diese (englische) Nomenklatur ist auf die Abbaustadien der rhabdomeren Mikrovilli in den putativen Photorezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns des Skorpions angewandt worden und in den Abbildungslegenden jeweils in kursiv gesetzt.

c-MVB: *compact multivesicular body* (dicht gepackter multivesikulärer Vesikel), **CV:** *coated vesicle* (rauhe Vesikel), **DB:** *dense body*, **GO:** Golgi-Apparat, **LB:** *lamellar body*, **N:** Zellkern, **n-MVB:** *nascent multivesicular body* (frühes Stadium der multivesikulären Körper), **PRIM. LYSOS.:** primäre Lysosomen, **PV:** *nascent pinocytotic vesicle*, **RB:** *residual body* (Restkörperchen), **RER:** rauhes endoplasmatisches Reticulum, **SV:** *smooth vesicle* (glattrandiger Vesikel).



kurzes Axon. Das Soma beinhaltet alle Zellorganellen, die auch typischer Weise in den retinalen Photorezeptorzellen von Arthropoden zu finden sind.

Um das Auffinden der vielfältigen elektronenmikroskopischen Detailaspekte dieser Grundstruktur zu erleichtern, soll Abb. IV.2.2 als Wegweiser dienen.

B) Das Soma und seine Organellen

Die Somata der spindelförmigen Rezeptorzellen sind etwa 6 μm dick und mindestens 15 μm lang (Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.6). Das Cytoplasma ist durch eine Vielzahl von Ribosomen recht dunkel gefärbt (Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.18), die teilweise an kurzen Stücken von RER aufgereiht sind (z.B. Abb. IV.2.9). Der Zellkern ist meist länglich und unregelmäßig gelappt, er hat dunkle Flecken aus Heterochromatin. Am auffälligsten sind die in nahezu jedem Anschnitt der Rezeptorzellen sichtbaren diversen Umbauformen der Mikrovillimembranen (z.B. Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.5). An ihnen kann man modellhaft den für Insekten-Photorezeptoren beschriebenen lichtinduzierten Auf- und Abbau der rhabdomeren Mikrovilli verfolgen (siehe dazu das Schema von Schwemer, 1984, Abb. IV.2.3 und unten Kapitel IV.2.2.). Zahlreiche kleine Mitochondrien liegen in der Nähe des Zellkerns oder entlang der Zellmembran (Abb. IV.2.12 A, Abb. IV.2.18), aber ohne erkennbare Anhäufung zum Mikrovillisaum oder dem afferenten Axon. Jede Zelle hat einen offensichtlich hoch aktiven Golgi-Apparat (Abb. IV.2.18), in dessen Nachbarschaft oftmals eine kurze Cilie (Abb. IV.2.15, Abb. IV.2.16) zu entdecken ist. Niemals konnten in Photorezeptorzellen, d.h. Zellen mit Turnoverprodukten, „Doppelcilien“ gefunden werden, die als Centriolen an der Organisation des Zellteilungsprozesses beteiligt sind (Abb. IV.2.17 C). Diese Centriolen treten in den metasomalen Ganglien des Skorpions bisweilen in solchen Zellen auf, die um ihren Kern nur einen schmalen Cytoplasmasaum haben (Abb. IV.2.17 A und B). In manchen Schnitten gibt es in den Somata aller metasomalen Zelltypen gehäuft elektronenoptisch hellgrau erscheinende homogene Kugeln, die nicht durch eine Vesikelmembran vom Cytoplasma abgetrennt werden (Abb. IV.2.22). Sie sind aus der Literatur als sog. Phaosomen bekannt (Review für den Skorpion: Locket 2001) und stellen keine photorezeptortypischen Organellen dar.



C) Die Photopigment tragenden Membranen

Bereits durch die immunhistologischen Untersuchungen (Ergebnisteil IV.1) konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die Rezeptorzellen in den metasomalen Ganglien eine Haube aus „wolligen“ Zellorganellen tragen (z.B. Abb. IV.1.5 C). Diese Befunde können im elektronenmikroskopischen Bild der Zellen voll bestätigt werden. Bei somanahen Dünnschnitten am apikalen Pol der Zellen werden in der Regel mehrfach unregelmäßige Schläuche angeschnitten (Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.5), die sich als Querschnittprofile von rhabdom-ähnlichen Mikrovilli (Abb. IV.2.10) deuten lassen. Diese Ansatzstellen bilden keine ebene Platte am Rezeptorzellsoma, die Mikrovilli scheinen vielmehr aus mehreren Vertiefungen am Soma zu entspringen. Nahe ihrem Ursprung werden die Mikrovilli durch Desmosomen verbunden (Abb. IV.2.14) bevor sie sich als unregelmäßige Struktur um eine kleine Lakune anordnen (z.B. Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.20). Diese Lakune kann eindeutig von den cerebralen Kapillaren unterschieden werden, weil sie weder eine Wandung aus Endothelzellen hat noch in ihrem Lumen einen Belag aus fibrillärem Material (Abb. IV.2.21). An der Ursprungsstelle der Mikrovilli treten im Cytoplasma deutlich kleine klare Vesikel auf (Abb. IV.2.9), die mit der Mikrovillimembran verschmolzen sind und ganz frühe Stadien des lichtinduzierten Abbaus oder ganz späte Stadien des Wiederaufbaus dieser Membranen sein können (siehe Schema IV.2.3 aus Schwemer, 1984 und auch unten Kapitel IV.2.2).

D) Das afferente Axon

Aus dem Soma der Rezeptorzellen entspringt ein kurzes Axon, das sogleich in den Neuropilbereich des Ganglions eintaucht (Abb. IV.2.5). Aus den immunhistologischen Untersuchungen ist bekannt, dass dieser Nerv nur kurz ist und noch im gleichen Ganglion endet und nicht auf die kontralaterale Seite des Ganglions wechselt (vgl. Arrestin-ir in Kapitel IV.1.1). Elektronenmikroskopisch kann man die afferente Endigung an ihrem Gehalt an späten Stadien des rhabdomeren Membranumbaus erkennen (Abb. IV.2.19). Afferente Synapsen treffen dabei auf efferente Endigungen, die insgesamt ein recht komplexes Bild der Informationsübertragung vermitteln.



E) Die Umgebung der Rezeptorzellen

In den immunhistologischen Untersuchungen konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die Rezeptorzellen des ML vom Skorpion getrennt von den Neuronen der metasomalen Ganglienzellen dicht am Neurolemma liegen. Dabei treten vier relativ lockere Zellgruppen aus 4-6 Zellen nahe der Basis der Konnektive auf. Im elektronenmikroskopischen Schnitt erkennt man diese Lagebeziehungen noch deutlicher (Abb. IV.2.6, Abb. IV.2.7, Abb. IV.2.8). Eine intracerebrale Lakune, die mit einem extracerebralen Hämolymphraum in Verbindung steht, bildet eine verlässliche Landmarke zum Auffinden der Rezeptorzellen (Abb. IV.2.8). Sie sind durch diese Struktur von den metasomalen Nervenzellen abgegrenzt, die in diesem medialen Bereich der Ganglien nicht bis an das Neurolemma heranreichen. Die Nervenzellen – erkennbar an ihren großen runden und mit wenig Heterochromatin ausgestatteten und daher hellen Zellkernen (Abb. IV.2.20) - liegen immer eher lateral zu den Rezeptorzellen (siehe auch Schema in Teil III Methoden). Gliazellen mit kleinen elektronenoptisch dichten Kernen schieben sich ebenfalls selten zwischen die Rezeptorzellgruppen und das Neurolemma (Abb. IV.2.7, Abb. IV.2.8).

IV.2.2 Exogene und endogene Veränderungen der Feinstruktur der Rezeptorzellen

A) Lichtabhängiger Umbau

Die Lichtwahrnehmung bei Tieren erfolgt durch strukturelle Änderungen eines Sehpigments, Rhodopsin, das bei dieser Lichtabsorption „verbraucht“ bzw. deaktiviert wird, und erst wieder rückverwandelt werden muss, bevor es wieder Licht in Rezeptorerregung transduzieren kann. Das Sehpigment liegt in hoher Konzentration in speziellen Membranabschnitten vor, die in der Regel spektakulär vergrößern, z.B. als Mikrovillanhäufungen in „Rhabdomen“ (bei Invertebraten) oder Scheibchenstapel in den Aussengliedern (bei Vertebraten) die Struktur der Photorezeptorzellen kennzeichnen. Das Sehpigment der Invertebraten ist – anders als bei den Vertebraten - ein integraler Membranbestandteil mit der Konsequenz, dass der Reparaturprozess des Sehpigments auch eines Ab- und Wiederaufbaus der



Pigment tragenden Membran bedarf. Als Zusammenfassung von mehreren vergleichenden Untersuchungen an Insekten und anderen Arthropoden hat Schwemer (1984) ein generelles Schema dieses lichtabhängigen Turnover-Prozesses von Photopigment tragenden Zellmembranen entworfen (Abb. IV.2.3). In den Rezeptorzellen des ML beim Skorpion konnten alle Stadien dieses Membranumbaus in erstaunlicher Übereinstimmung mit dem Schwemer-Schema gefunden werden.

Nahe an der Basis der rhabdomeren Mikrovilli gibt es die frühen Abschnürungsformen, dies sind Vesikel mit elektronenlichtem Inhalt und verdickten (CV, *coated vesicles*) oder dünnen Membranen (SV, *smooth vesicles*) (Abb. IV.2.9). Diese Vesikel entfernen sich von den rhabdomeren Mikrovilli und verschmelzen allmählich zu größeren Einheiten, in denen mehrere der kleinen Vesikel locker in eine gemeinsame Membran verpackt werden (n-MVB, *nascent multivesicular body*) (Abb. IV.2.9, Abb. IV.2.11 A und B). Sobald die Vesikelpackung dichter wird (c-MVB, *compact multivesicular body*) (Abb. IV.2.9, Abb. IV.2.11 A und B, Abb. IV.2.16 F, Abb. IV.2.18), verformen sich die kleinen Vesikel zu Lamellen und der gesamte Inhalt des großen Vesikels wird elektronendichter (LB, *lamellar body*) (Abb. IV.2.12 B, Abb. IV.2.13 B, Abb. IV.2.19). In einem noch späteren Abbaustadium lösen sich die Lamellen auf und der Vesikelinhalt wird allmählich gleichmäßig schwarz (DB, *dense body*) (Abb. IV.2.14, Abb. IV.2.18, Abb. IV.2.19). Zuletzt zieht sich dieser elektronendichte Inhalt zusammen und lässt entweder einen Teil des Vesikellumens frei (T, *turn-over product*, als pauschaler Name für diese späte Umbauform) (Abb. IV.2.4, Abb. IV.2.11 A, Abb. IV.2.14 A) oder die gesamte Struktur verbleibt nur noch als verkleinerter elektronendichter Restkörper (RB, *residual body*) (Abb. IV.2.13 B, Abb. IV.2.16 C, Abb. IV.2.18), der dann über Exozytose entsorgt wird. In den Rezeptorzellen des ML lassen sich alle Übergangsstadien zwischen diesen Umbauprodukten finden (z.B. LB/DB: Abb. IV.2.19, DB/RB: Abb. IV.2.12 C).

Neben diesem Abbauweg zur exozytotischen Entsorgung der verbrauchten Mikrovillimembranen gibt es den Umbauweg über den Golgi-Apparat zur Wiedereingliederung der Vesikelmembranen in die rhabdomeren Mikrovilli. Diese Stadien lassen sich als kleine elektronendichte Vesikel (PRIM. LYSOS., *primary*



lysosomes) mit beschichteter oder dünner Vesikelmembran in unmittelbarer Nähe des Golgi-Apparates auffinden (Abb. IV.2.18).

Hell- und dunkeladaptierte Schnittpräparate der metasomalen Ganglien unterscheiden sich insbesondere dadurch, dass in den dunkeladaptierten Nacht-Präparaten vor allem die frühen (CV, SV) und mittleren Abbaustadien (n-MVB, c-MVB) vorkommen, weniger die Strukturen mit zusammengezogenem elektronendichtem Inhalt (T, RB). Zugleich gibt es in allen am Tag fixierten helladaptierten Präparaten eine auffällig größere Zahl von Umbauprodukten (vgl. z.B. für die Nacht: Abb. IV.2.12 A und für den Tag: Abb. IV.2.11 A).

B) Hinweise auf endogenen/efferent induzierten Umbau

Nach Untersuchungen an den Lateralaugen des Pfeilschwanzkrebse (Sacunas et al. 2002) unterliegt dieser Membranumbauprozess wenigstens zum Teil der efferenten Kontrolle durch die circadiane Uhr. Die Autoren zeigen typische Unterschiede der Umbaustadien bei intakten und defferentierten Augen (Inset in Abb. IV.2.13 A).

Auch in den Rezeptorzellen des ML beim Skorpion konnten in Nachtpräparaten die lockeren MVBs (Abb. IV.2.13 B) und in Tagpräparaten die kompakten MVBs (Abb. IV.2.13 A) gefunden werden. Auch wenn bisher keine Zeitreihen von Schnittpräparaten angefertigt werden konnten, muss dieser Strukturunterschied als ein starker Hinweis auf endogene Faktoren bei den rhabdomeren Umbauprozessen gewertet werden. Dieses Signal könnte über die präsynaptischen efferenten Endigungen (Abb. IV.2.19) an die Photorezeptoren des ML geliefert werden.

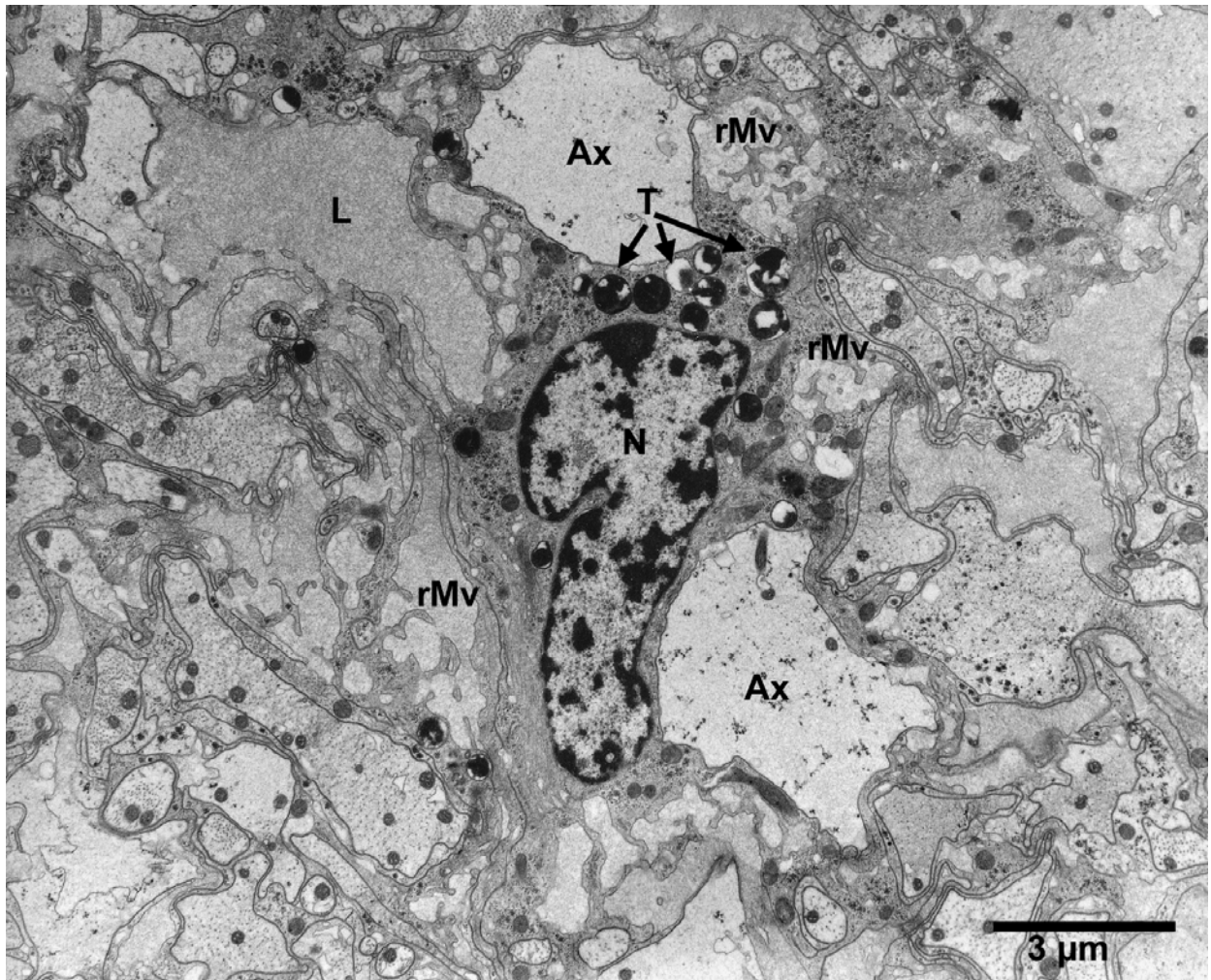


Abb. IV.2.4: Typische Ansicht einer möglichen Photorezeptorzelle des metasomalen Lichtsinns in ihrer Umgebung im sechsten Ganglion Übersichtsaufnahme einer quergetroffenen „Tag“-Zelle, in der mehrfach die Basis der rhabdomeren Mikrovilli und die zentrale Lakune im Mikrovillisaum angeschnitten wurden.

Ax: Axon eines benachbarten Neurons, **L:** Lakune, **rMv:** Anschnitt von rhabdomeren Mikrovilli, **N:** Zellkern der Photorezeptorzelle, **T:** sekundäre Lysosomen.

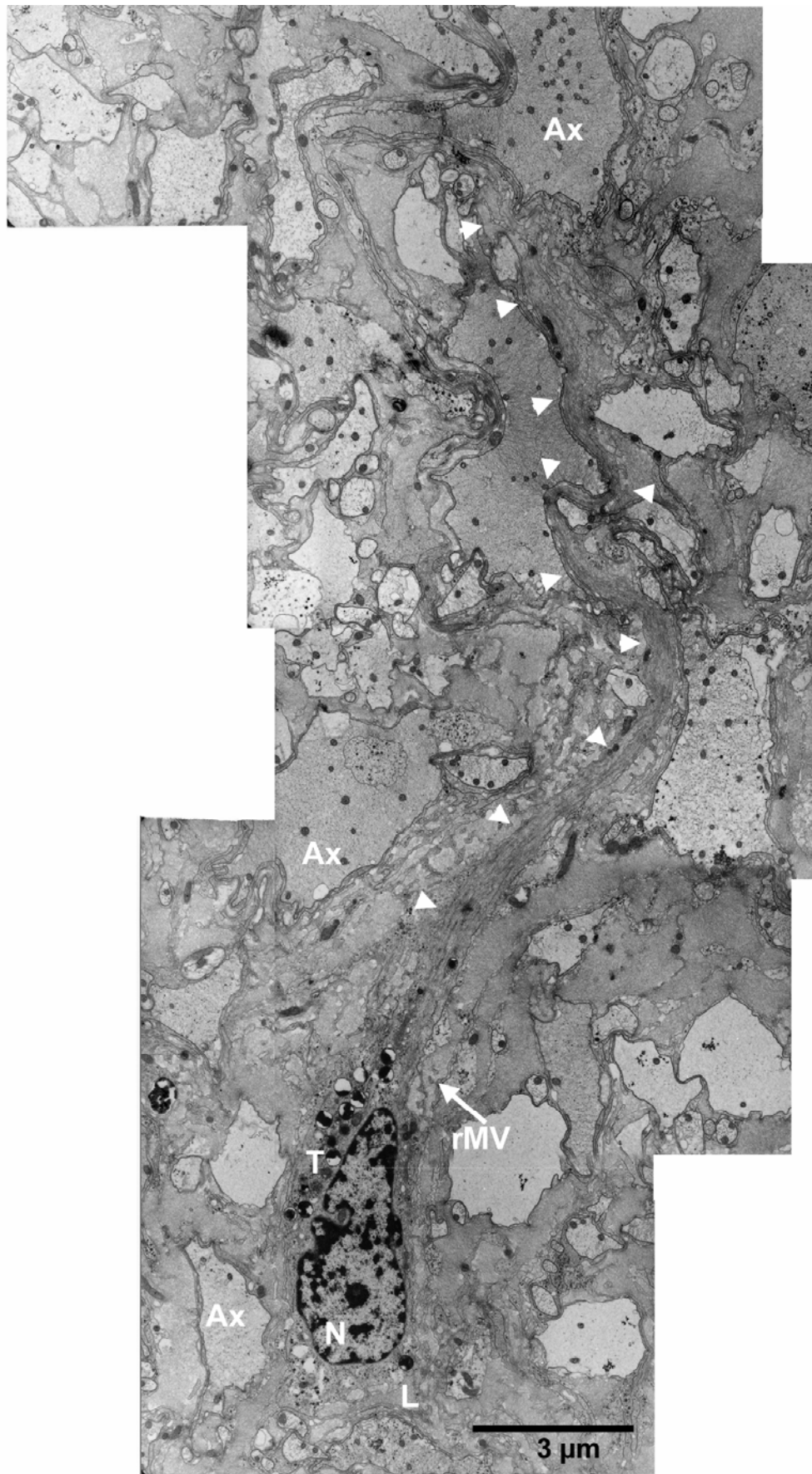


Abb IV.2.5: Photorezeptorzelle mit afferentem Axon Die putative Photorezeptorzelle, die durch die vielen Organellen des Membranbaus und den unregelmäßig geformten Zellkern von den ungebundenen Neuronen unterscheidbar ist, setzt sich in einem gewundenen Axon fort. Dieses Axon verlässt den Bereich der Somata der Ganglienzellen in Richtung auf den Neuropilbereich.
Ax: Axon, **L:** Lakune, **N:** Zellkern, **rMV:** Anschnitt der Basis von rhabdomeren Mikrovilli, **T:** Membranumbauprodukte, **weiße Pfeilköpfe** markieren den Verlauf des afferenten Axons.

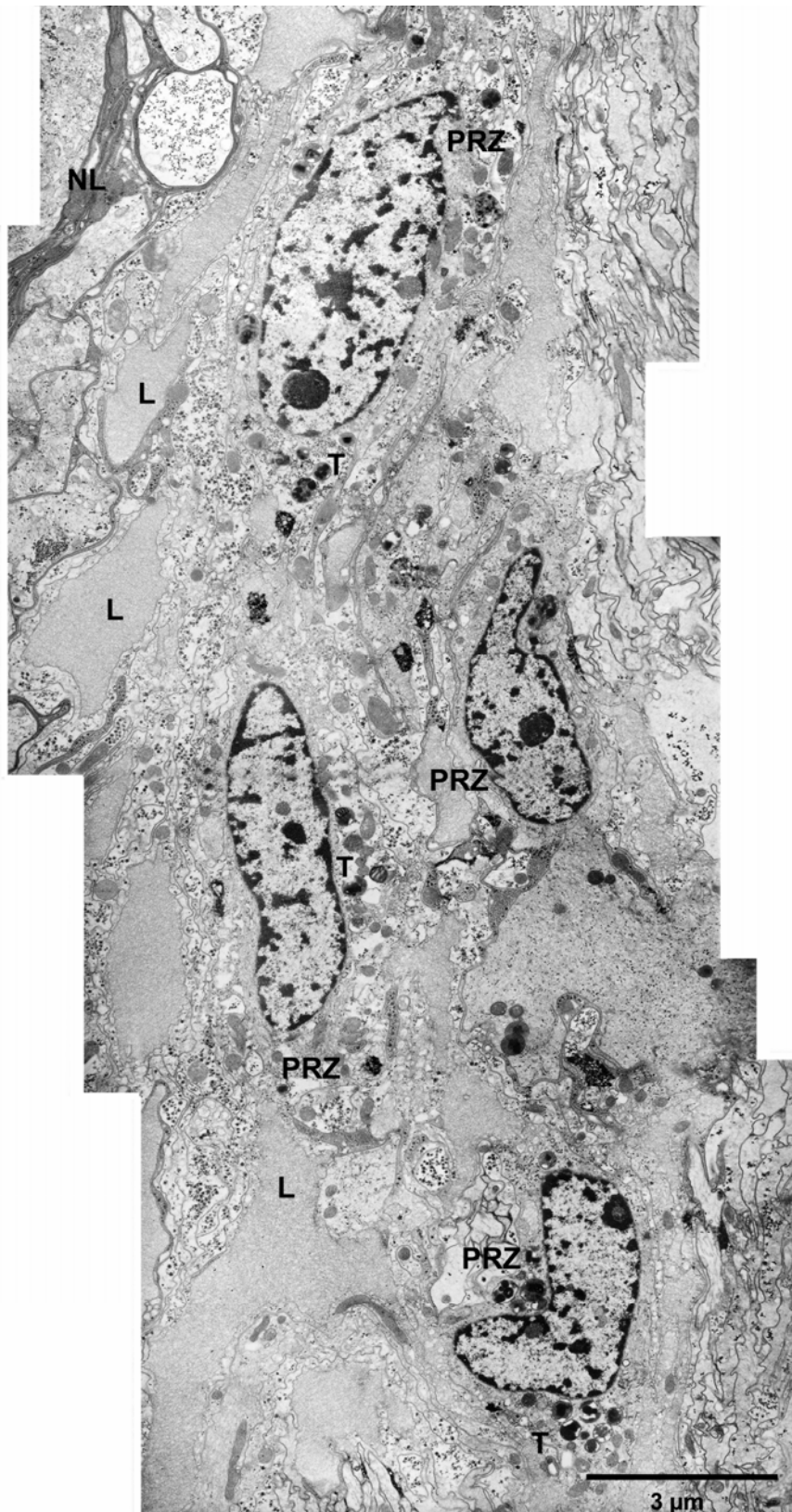


Abb. IV.2.6: Anschnitt von vier Photorezeptorzellen (Tagpräparat eines siebten Ganglions, zusammengesetztes Bild aus verschiedenen Aufnahmen des gleichen Ultradünnschnittes). Mehrere putative Photorezeptorzellen liegen mit ihren zugehörigen Lakunen und rhabdomeren Mikrovilli jeweils in dichten Clustern zusammen (vgl. z.B. **Abb. IV.1.4**).

L: Lakune, N: Zellkern, NL: Neurolemma, PRZ: Photorezeptorzelle, T: Membranumbauprodukte.



Abb. IV.2.7: Lage der Photorezeptorzellen zum Neurolemma (Schnitttrichtung etwa sagittal, Tagpräparat eines siebten Ganglions). Etwa 25 µm unterhalb des Neurolemmas liegen die Zellkörper der putativen Photorezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns. Die Gliazellen und peripheren Ganglienzellen unterscheiden sich klar von den Sinneszellen durch Größe und Form der Zellkerne und die hier fehlenden Membranabbauprodukte.

Ax: Axon, **Glia:** Somata bzw. Zellkerne von Gliazellen, **HL:** extracerebraler Hämolympfraum, **L:** Lakune, **N:** Zellkern, **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle.

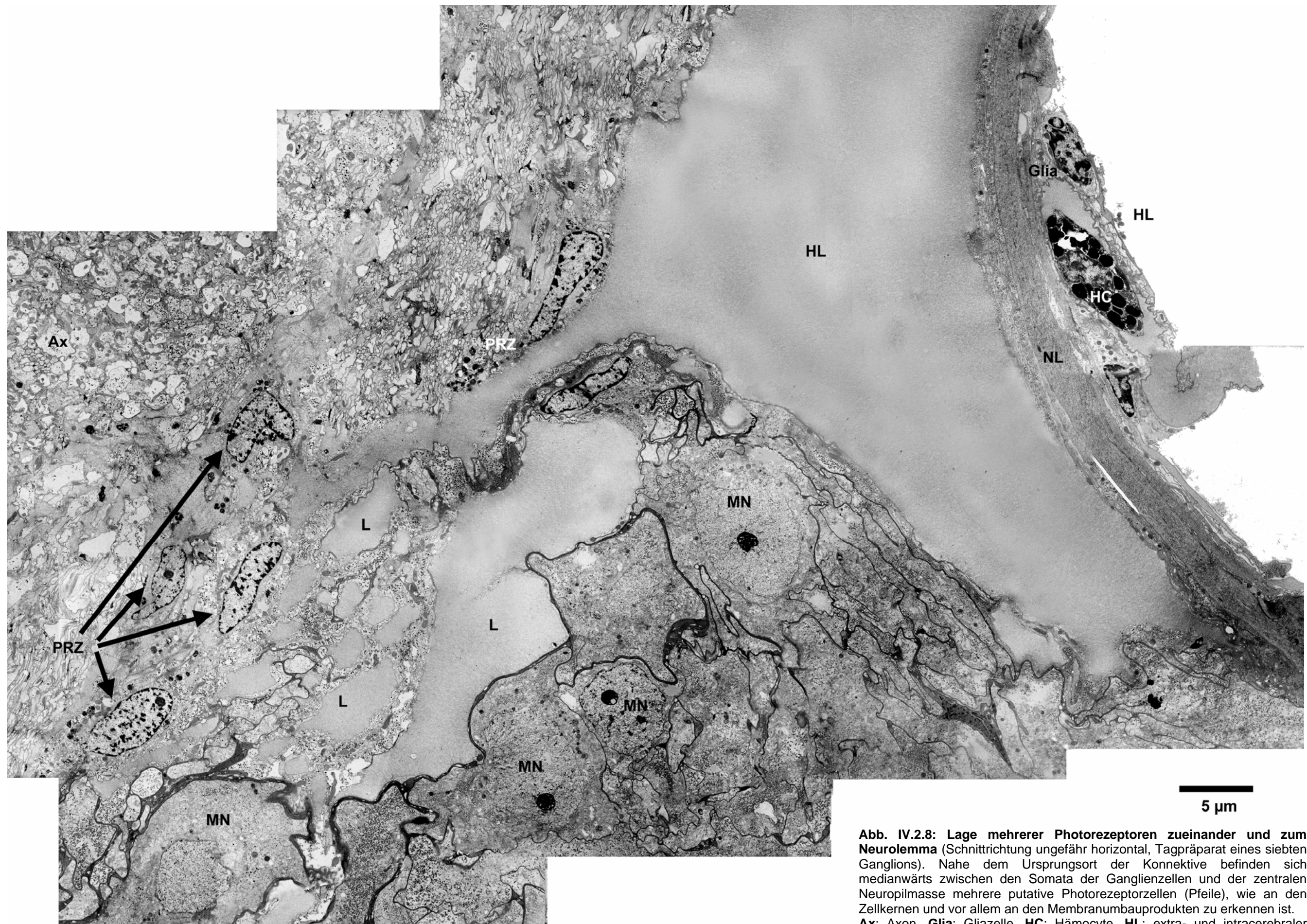


Abb. IV.2.8: Lage mehrerer Photorezeptoren zueinander und zum Neurolemma (Schnittrichtung ungefähr horizontal, Tagpräparat eines siebten Ganglions). Nahe dem Ursprungsort der Konnektive befinden sich medianwärts zwischen den Somata der Ganglienzellen und der zentralen Neuropilmasse mehrere putative Photorezeptorzellen (Pfeile), wie an den Zellkernen und vor allem an den Membranumbauprodukten zu erkennen ist.
Ax: Axon, **Glia:** Gliazelle, **HC:** Hämozyte, **HL:** extra- und intracerebraler Hämolympdraum, **L:** Lakune, **MN:** metasomales Neuron; **NL:** Neurolemma, **PRZ:** Photorezeptorzelle.

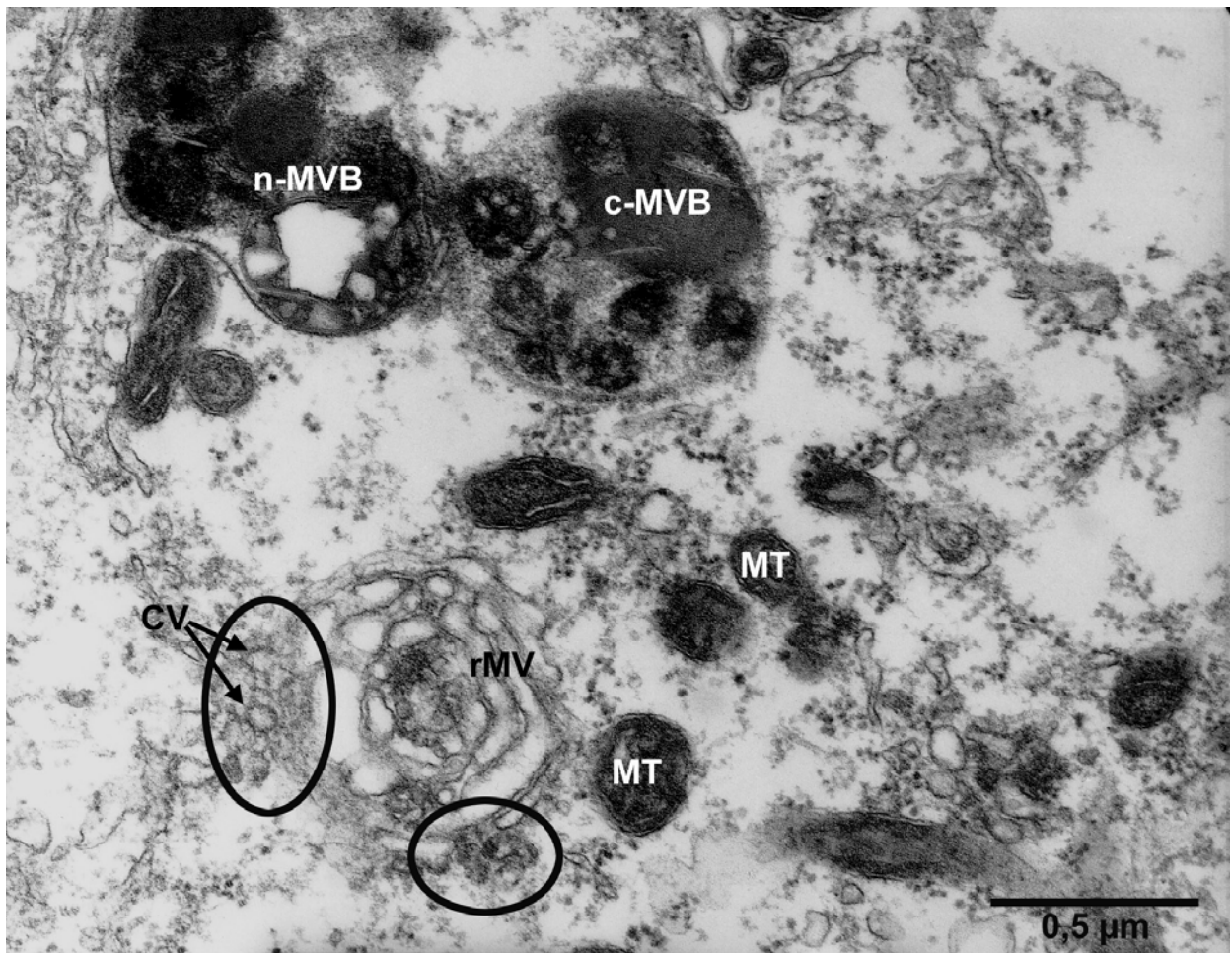


Abb. IV.2.9: Quer getroffene rhabdomere Mikrovilli und ihr nächtlicher Umbau (dunkeladaptiertes Nachtpräparat eines sechsten Ganglions). Diese quer getroffenen rhabdomeren Mikrovilli befinden sich in Kernnähe. Markierungen zeigen erste Membran-Abbaustadien nahe der Basis der rhabdomeren Mikrovilli (Nomenklatur nach Schwemer 1984, siehe Abb. IV.2.1 C).
c-MVB: *compact multivesicular body*, **CV:** *coated vesicles*, **n-MVB:** *nascent multivesicular body*, **MT:** Mitochondrien, **rMV:** rhabdomere Mikrovilli.

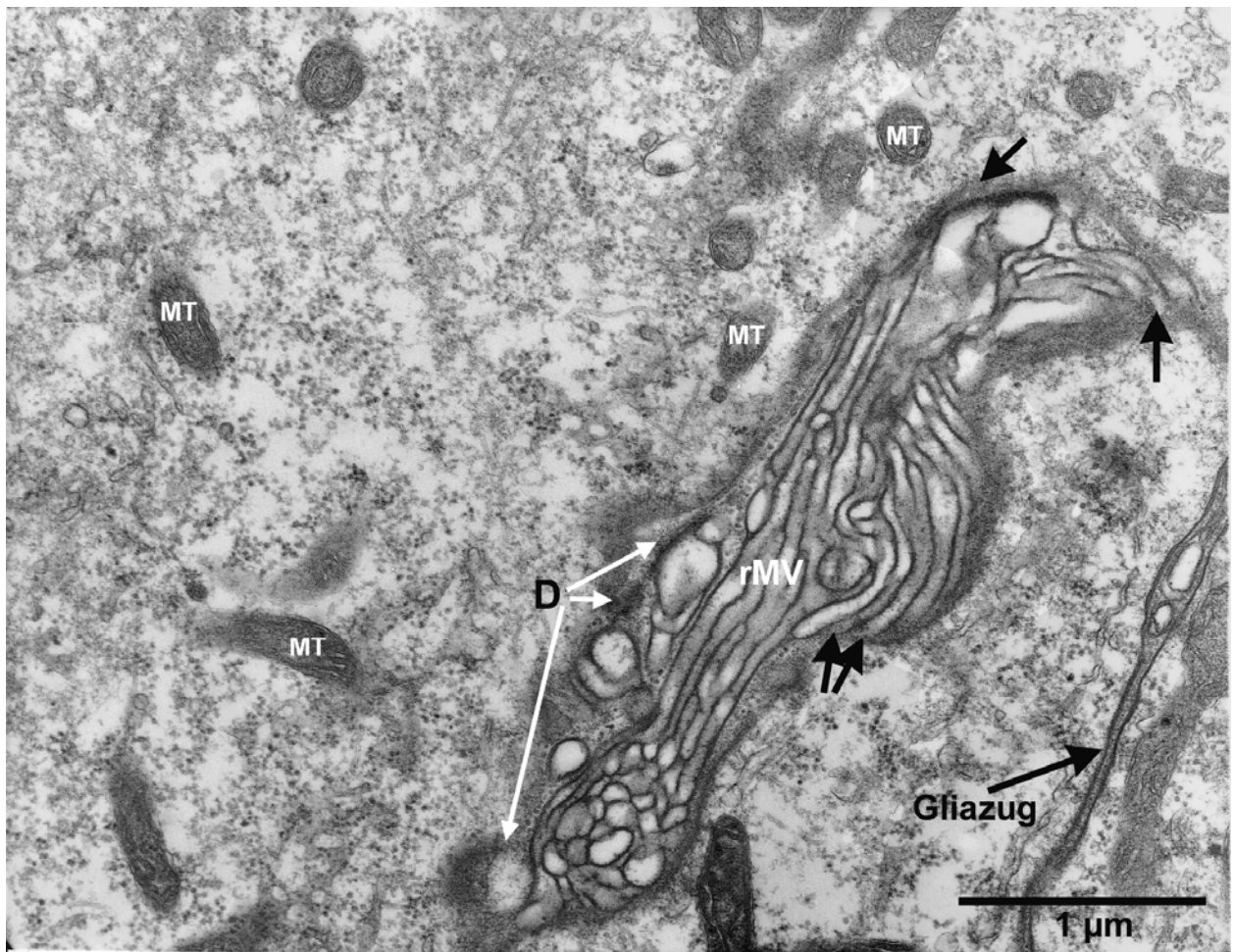


Abb. IV.2.10: Großflächiger Ansnchnitt von rhabdomeren Mikrovilli (dunkeladaptiertes Nachtpräparat eines sechsten Ganglions). Die räumliche Struktur der rhabdomeren Mikrovilli ist weniger „geordnet“ als bei retinalen Photorezeptoren, deshalb sind sie hier in der Regel in diversen Raumrichtungen angeschnitten.

Gliazug: Ansnchnitt einer Gliazelle, **D mit weißen Pfeilen:** Desmosomen, **MT:** Mitochondrien, **rMV:** rhabdomere Mikrovilli (quer- und längs getroffen), **schwarze Pfeile:** Mikrovilli-Somaübergänge.

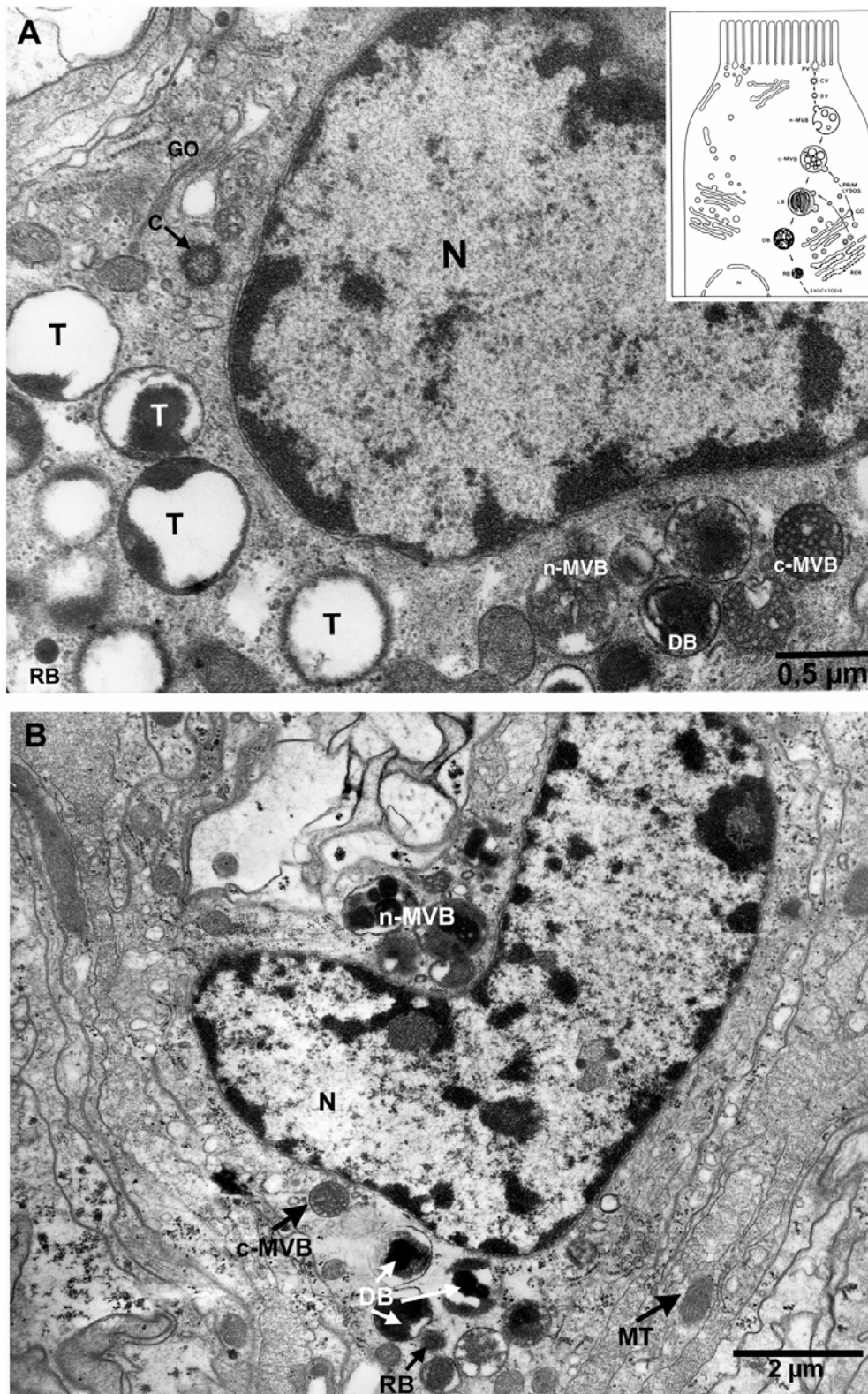


Abb. IV.2.11 A und B: Membranumbauprodukte bei Tag (helladaptiertes Ganglion) In Präparaten, die während des Tages fixiert wurden (**A**: aus einem sechsten und **B**: aus einem siebten Ganglion), unterscheiden sich die Lysosomen in ihrer Anzahl und Struktur von denen der Nachtpräparate. Das elektronendichte Material hat sich in diesen Organellen um mindestens die Hälfte verringert. Außerdem können in jeder Zelle viele multivesikuläre Körper gefunden werden, die in Nachtpräparaten selten sind. Verschiedene Stadien des Abbauprozesses von rhabdomeren Mikrovilli sind nach Schwemer (1984; siehe **Inset in A**) identifizierbar im frühen Entstehungsstadium (**n-MVB**), bereits voll gefüllt mit Vesikeln (**c-MVB**) oder als dicht gepackte Lysosomen (**DB**). Als Endstadium dieses Membranabbaus hat Schwemer sogenannte Restkörperchen (**RB residual body**) beschrieben.

C: Cilie, **c-MVB**: condensed multivesicular body, **CV**: coated vesicle, **DB**: dense body, **GO**: Golgi-Apparat, **LB**: lamellar body, **N**: Zellkern einer Photorezeptorzelle, **n-MVB**: nascent multivesicular body, **nt**: Neurotubuli, **RB**: residual body, **T**: sekundäre Lysosomen.

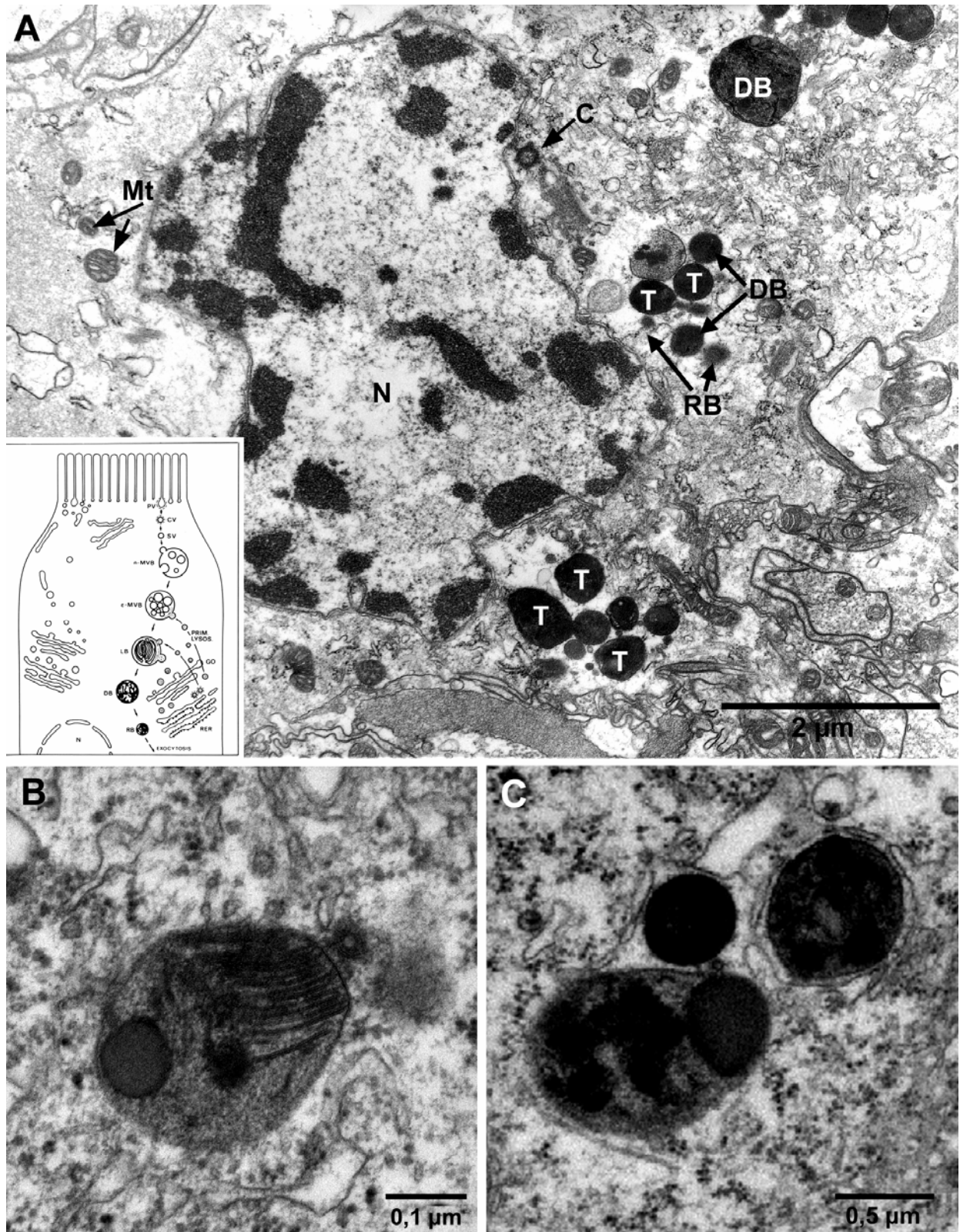


Abb. IV.2.12 A bis C: Membran-Turnoverprodukte bei Nacht (dunkeladaptiertes Ganglion) **A:** Die photosensitive Zelle zeigt bei Nacht nur einen Teil der bei Tag sichtbaren Membran-Umbaustadien: nur die späteren Stadien wie „dense bodies“ und „residual bodies“, sowie sekundäre Lysosomen sind sichtbar. Nach Schwemer (1984; **Inset**) unterscheiden sich die Abbauprodukte im Wesentlichen in ihrer Größe und Struktur. Wenn Präparate während der Nacht fixiert wurden, sind die sekundären Lysosomen komplett mit elektronendichtem Material gefüllt, am Tag sind sie hingegen nur etwa zur Hälfte gefüllt. Multivesikuläre Körper sind in diesem Nacht-Stadium sehr selten. **B** und **C:** Detailspekte mit identifizierten Abbaustadien. **B:** Übergangsstadium zwischen einem **LB** (*lamellar body*) zum **DB** (*dense body*). **C:** Übergangsstadium zwischen **DB** (*dense body*) und **RB** (*residual body*). **C:** Cilie, **DB:** *dense body*, **Mt:** Mikrotubuli, **N:** Zellkern einer Photorezeptorzelle, **RB:** residual body, **T:** sekundäre Lysosomen.

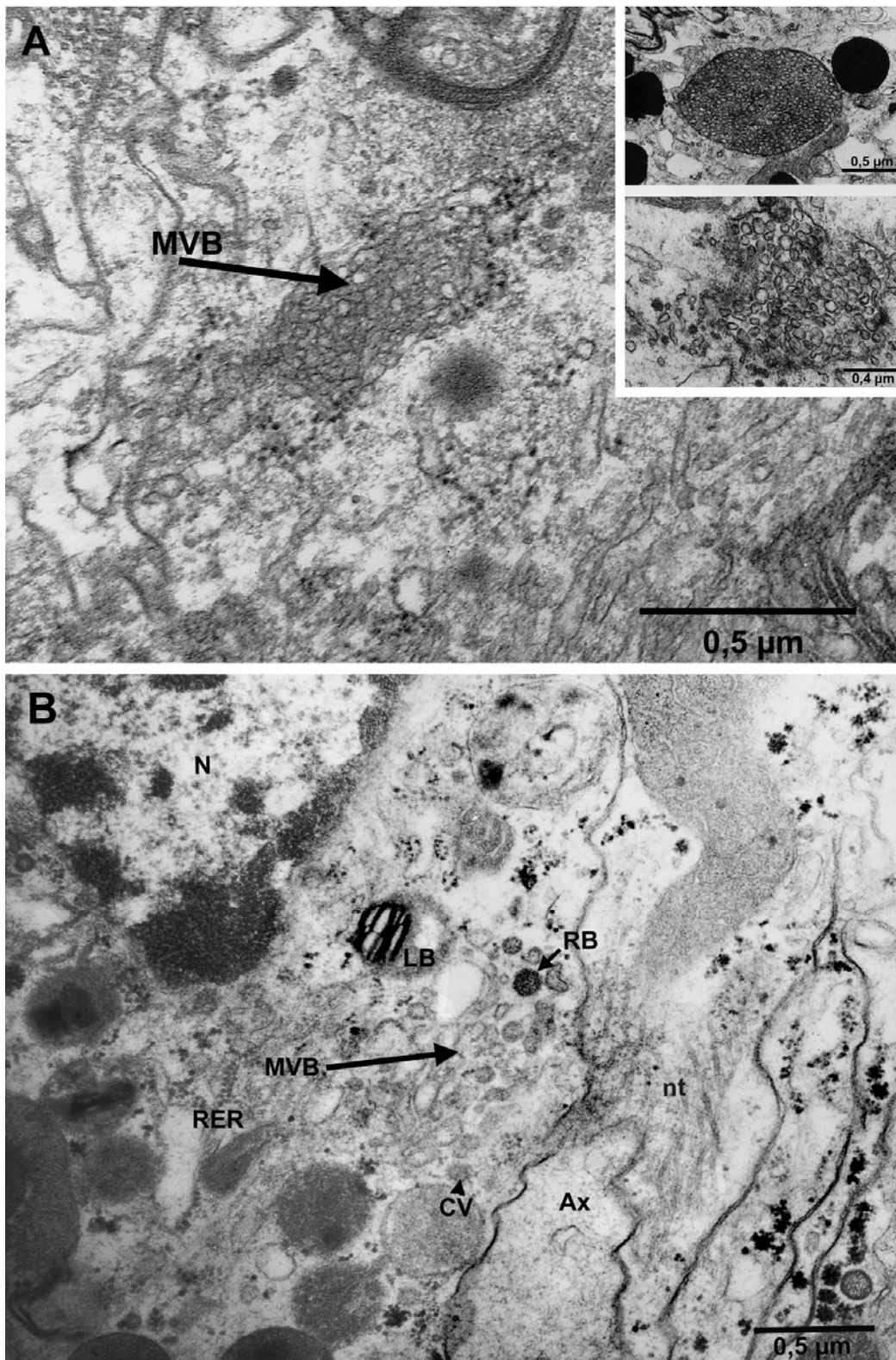


Abb. IV.2.13 A und B: Locker gepackte multivesikuläre Körper als Anzeichen für efferent kontrollierten Membranumbau Nach Untersuchungen von Sacunas et al. (2002, siehe **Inset**) unterscheiden sich in den Komplexaugen von *Limulus*, einem nahverwandten Arachniden, exo- und endogen induzierte Membranumbauprozesse der rhabdomeren Mikrovilli durch ihre frühen feinstrukturellen Erscheinungsbilder: die lichtinduzierten **MVB (Inset oben)** sind dicht gepackt, die durch efferente Kontrolle induzierten **MVB (Inset unten)** erscheinen deutlich lockerer. In Nachtpräparaten (**A**) und Tagpräparaten (**B**) der Rezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns vom Skorpion tauchen in ähnlicher Weise die lockeren **MVBs** auf (**Pfeil**).

(**A**: Dunkeladaptiertes Nachtpräparat eines sechsten Ganglions, **B**: helladaptiertes Tagpräparat eines siebten Ganglions).

MVB mit Pfeil: locker gepackte multivesikuläre Körper, **Ax**: Axon, **NT**: Neurotubuli; sonstige Abkürzungen siehe Schema Abb. IV.2.1c.

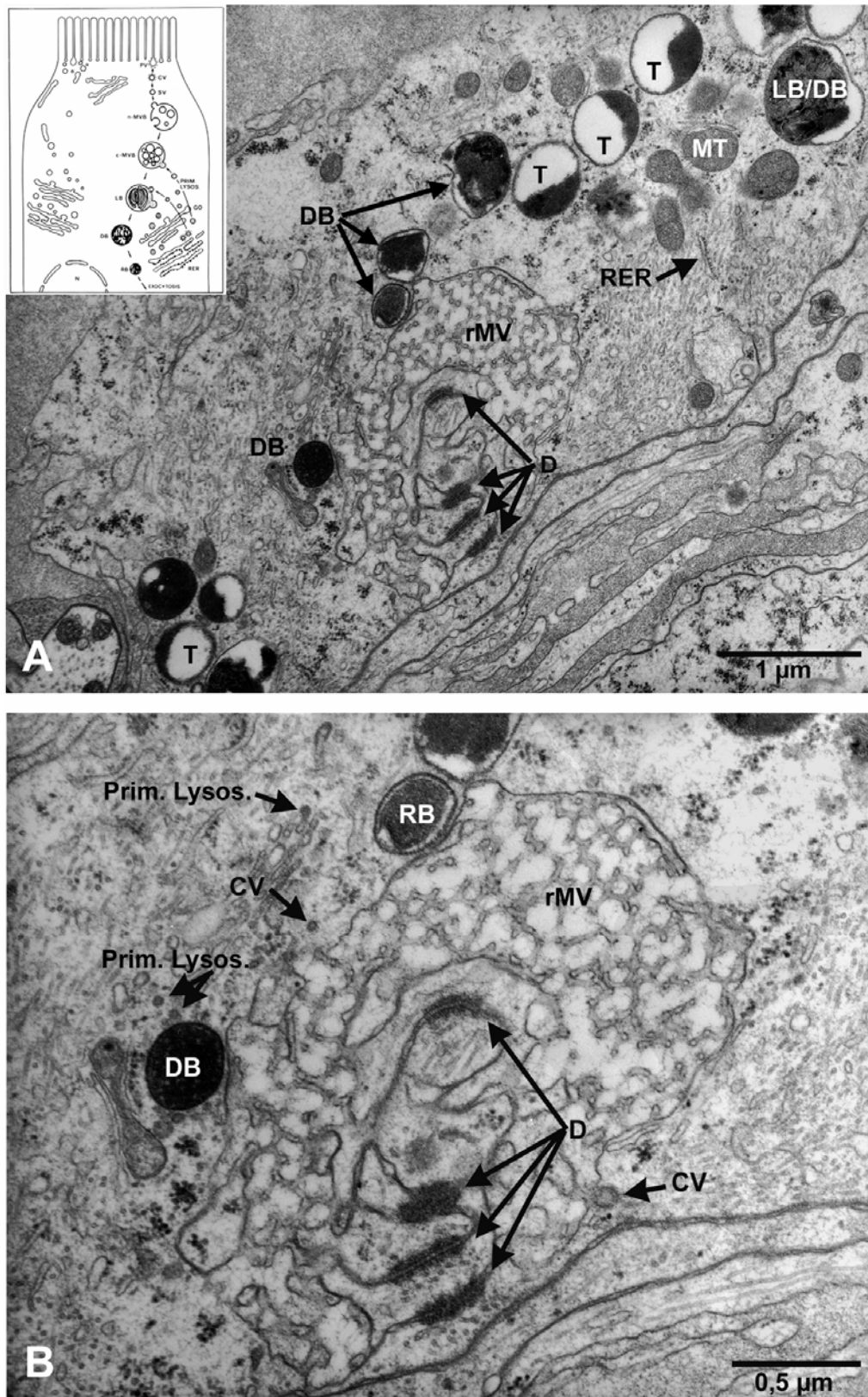


Abb. IV.2.14 A und B: Desmosomen an der Mikrovilli-Basis und lichtinduzierte Membranumbauprodukte in einer Tagzelle (sechstes Ganglion, **B**: vergrößerter Ausschnitt aus **A**). Durch die Vielzahl der lichtinduzierten Umbauprodukte (siehe **Inset in A**) wird die gezeigte Zelle als photorezeptiv gekennzeichnet. Dabei sind die vesikulären Stadien nur bei höherer Vergrößerung (**B**) erkennbar. Die unregelmäßigen Anschnitte der rhabdomeren Mikrovilli zeigen teilweise Membranverdichtungen, Desmosomen, wie sie auch als Abgrenzung zwischen den Reaktionsräumen um die Rhabdome der retinalen Photorezeptoren bekannt sind.
CV: coated vesicles, **D**: Desmosomen, **DB**: dense bodies, **LB/DB**: Übergangsstadium zwischen **LB** (lamellar body) und **DB** (dense body), **MT**: Mitochondrien, **PRIM. LYSOS.**: primäre Lysosomen, **RB**: residual bodies/Restkörperchen, **RER**: rauhes endoplasmatisches Reticulum, **rMV**: rhabdomere Mikrovilli.

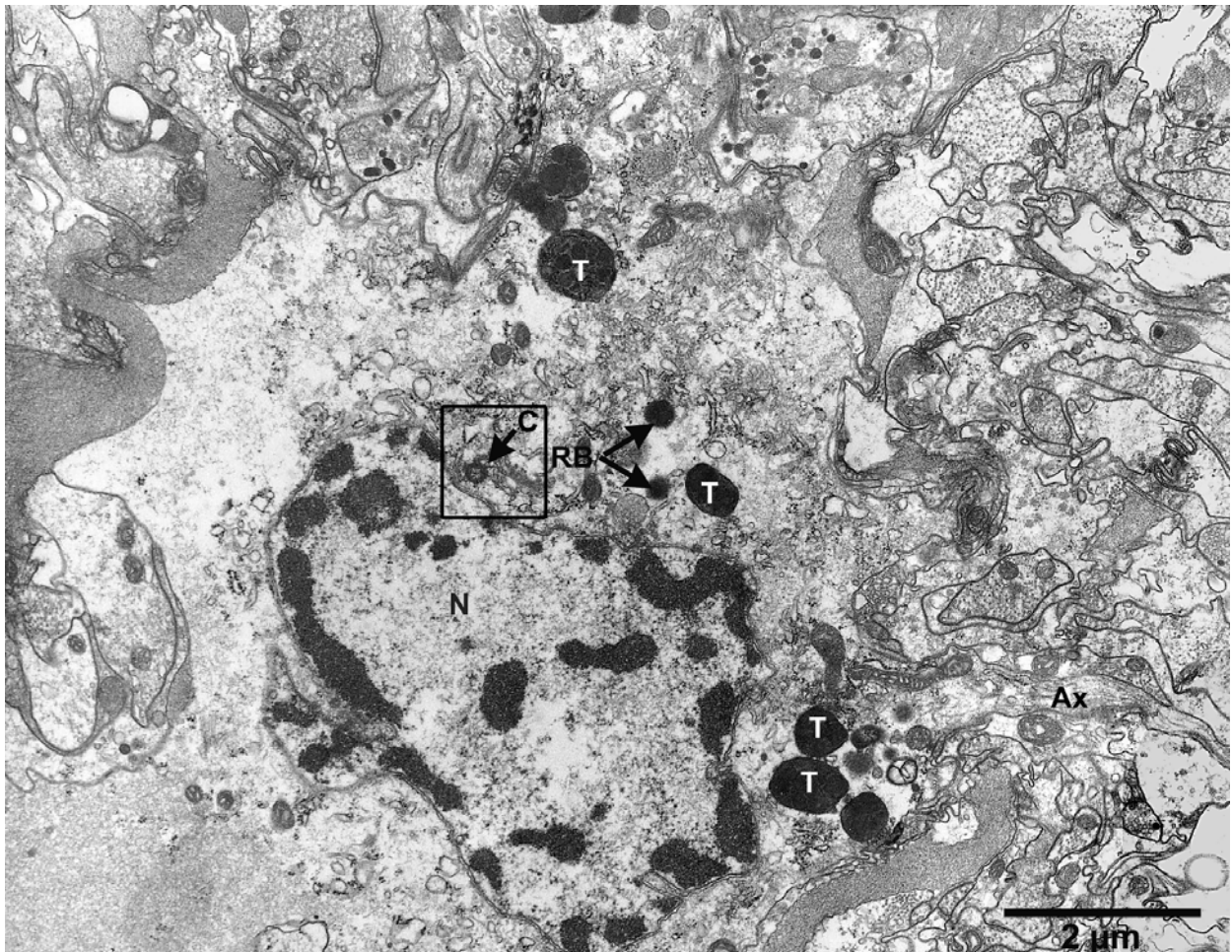


Abb.IV.2.15: Photorezeptorzelle mit Cilie. Querschnitt durch eine putative Photorezeptorzelle (dunkeladaptiertes Nachtpräparat) des metasomalen Lichtsinns. Als Besonderheit dieser Rezeptorzellen ist - neben den lichtinduzierten Umbauprodukten - eine Cilie (**C mit Pfeil**) zu sehen, s.a. Ausschnittsvergrößerung in der nächsten Abbildung (Abb.IV.2.16A). Rezeptorzellen der retinalen Photorezeptoren von Insekten und Arachniden sind nur mit rhabdomeren Mikrovilli ausgestattet, sie haben – anders als die Photorezeptoren der Säugetiere keine Ciliarstrukturen. Dagegen haben extraretinale Rezeptoren der niederen Invertebraten beides, Rhabdome und Cilien, möglicherweise als Hinweis auf ihre Herkunft von Haarsinneszellen.

Ax: Axonfortsatz der Rezeptorzelle, **C:** Cilie, **N:** Zellkern, **RB:** residual body, **T:** Lysosomen.

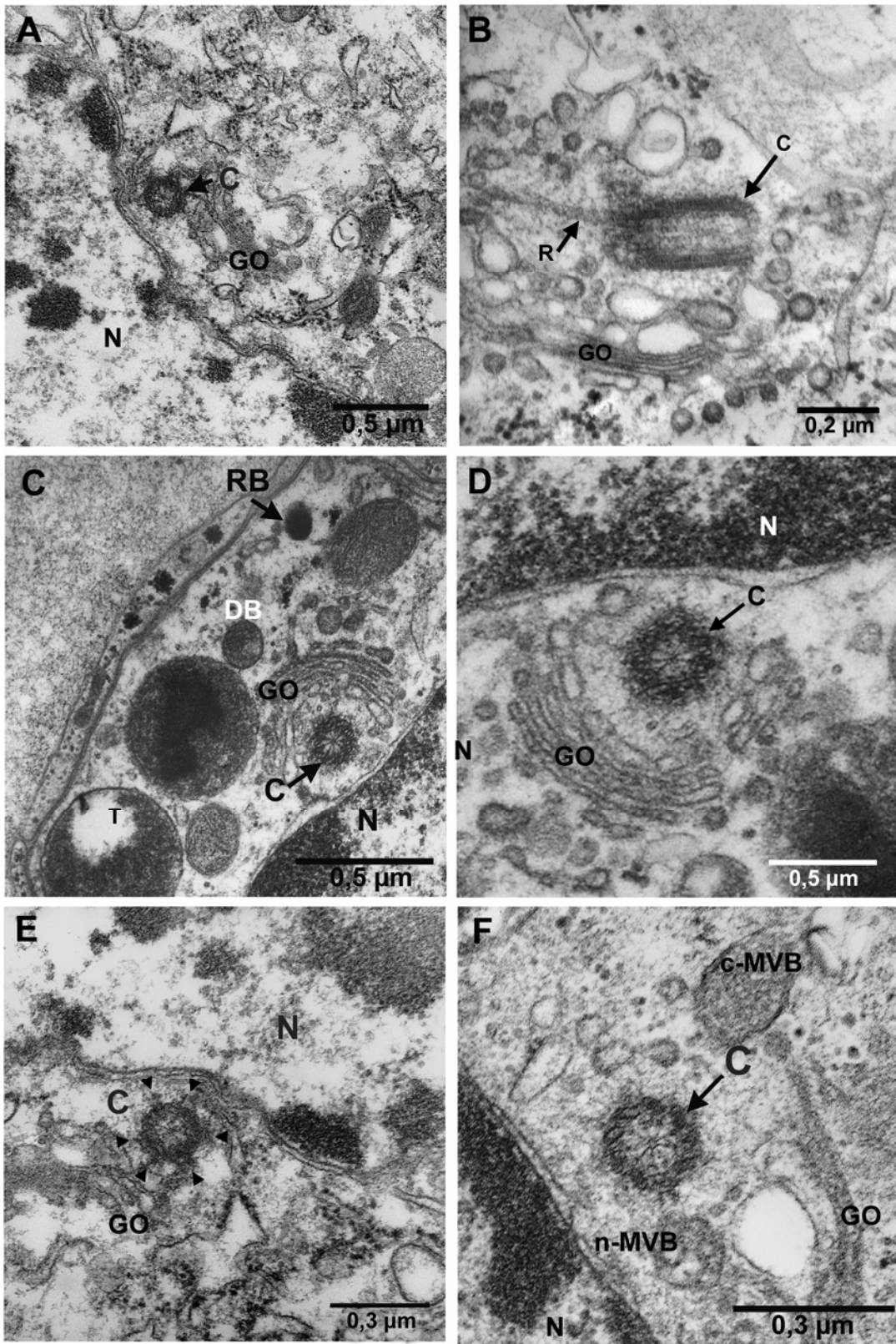


Abb. IV.2.16 A bis F: Unterschiedliche Aspekte von Cilien in Photorezeptorzellen Die Cilien liegen in der Regel zwischen Zellkern und einem Golgi-Apparat. **A:** Querschnitt durch eine Cilie im vergrößerten Ausschnitt aus **Abb. IV.2.15** (Nachtpräparat), **B:** Längsschnitt durch eine Cilie mit deutlich erkennbaren „Wurzelfäden“ (**R**). **C:** Querschnitt durch eine Cilie mit der typischen 9+2 Struktur (Tagpräparat), **D:** Basaler Teil einer Cilie mit „Wagenrad-Querschnitt“, **E:** Basaler Querschnitt einer Cilie mit Verankerungselementen (**Pfeilspitzen**), **F:** Querschnitt durch den apikalen Teil einer Cilie mit relativ dünner Wandung (Tagpräparat, erkennbar an den frühen Stadien des Membranumbaus **n-MVB** und **c-MVB**).

C: Cilie, **DB:** dense body, **GO:** Golgi-Apparat, **N:** Zellkern, **R:** ciliäre Wurzelfäden, **RB:** residual body, **T:** Lysosomen.

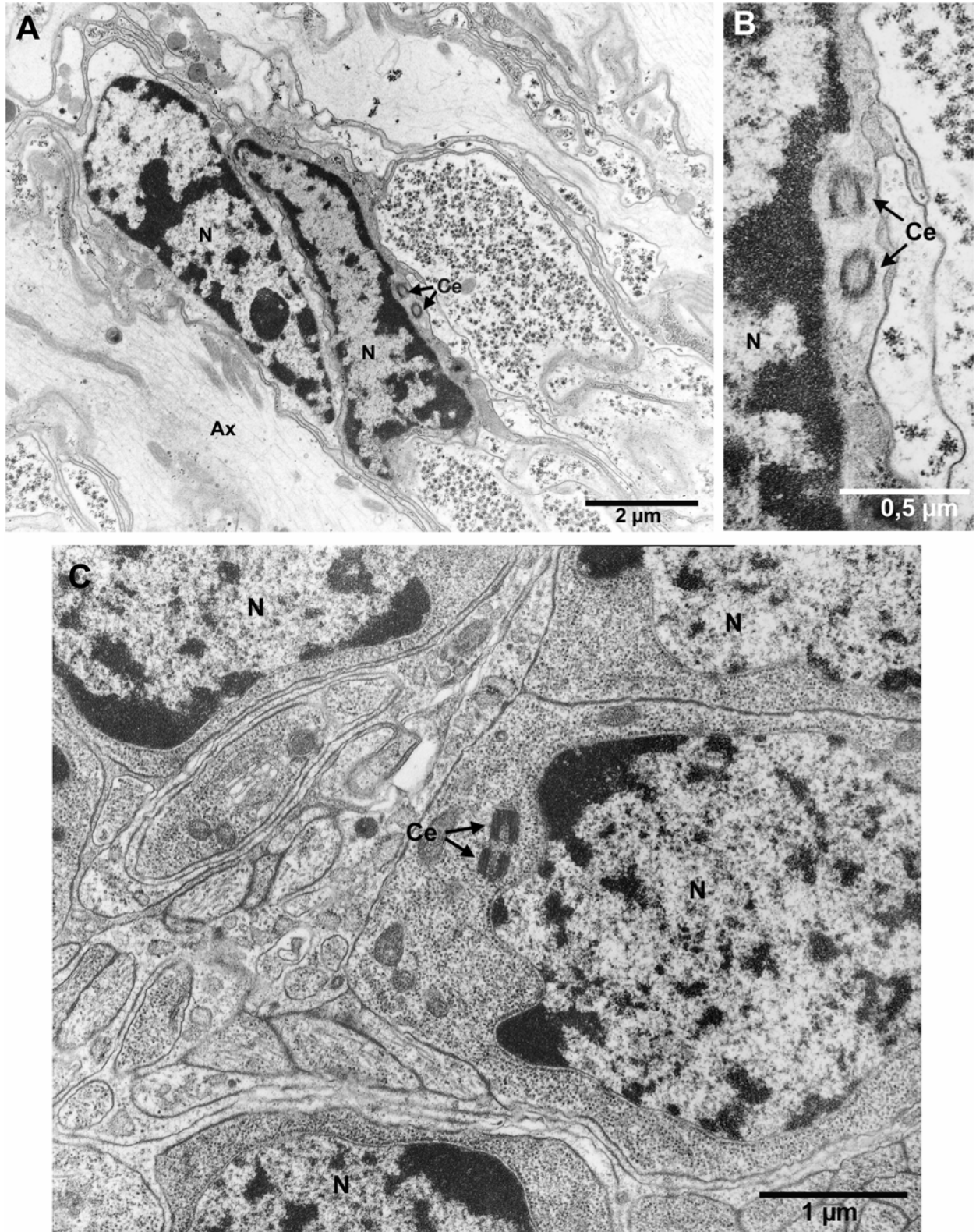


Abb. IV.2.17 A bis C: Centriolen als Kennzeichen für teilungsfähige Zellen Doppelte Cilien, die senkrecht aufeinander stehen, sind essentieller Bestandteil der Zellteilungsvorgänge. Anders als in den ausdifferenzierten putativen Photorezeptorzellen mit langen Zellausläufern und diversen Zellkompartimenten umgibt nur ein dünner und strukturarmer Cytoplasmasaum den Zellkern dieser teilungsfähigen Ganglien- oder Gliazellen. **A:** Übersicht und **B:** Vergrößerter Ausschnitt (aus **A**) aus einem Schnitt durch das sechste Ganglion des Skorpions. **C:** Zum Vergleich ähnliche Zellteilungsstadien mit Centriolen aus der Augenanlage eines Käfers (*Zophobas morio*).
Ax: Axon, **Ce:** Centriol, **N:** Zellkern.

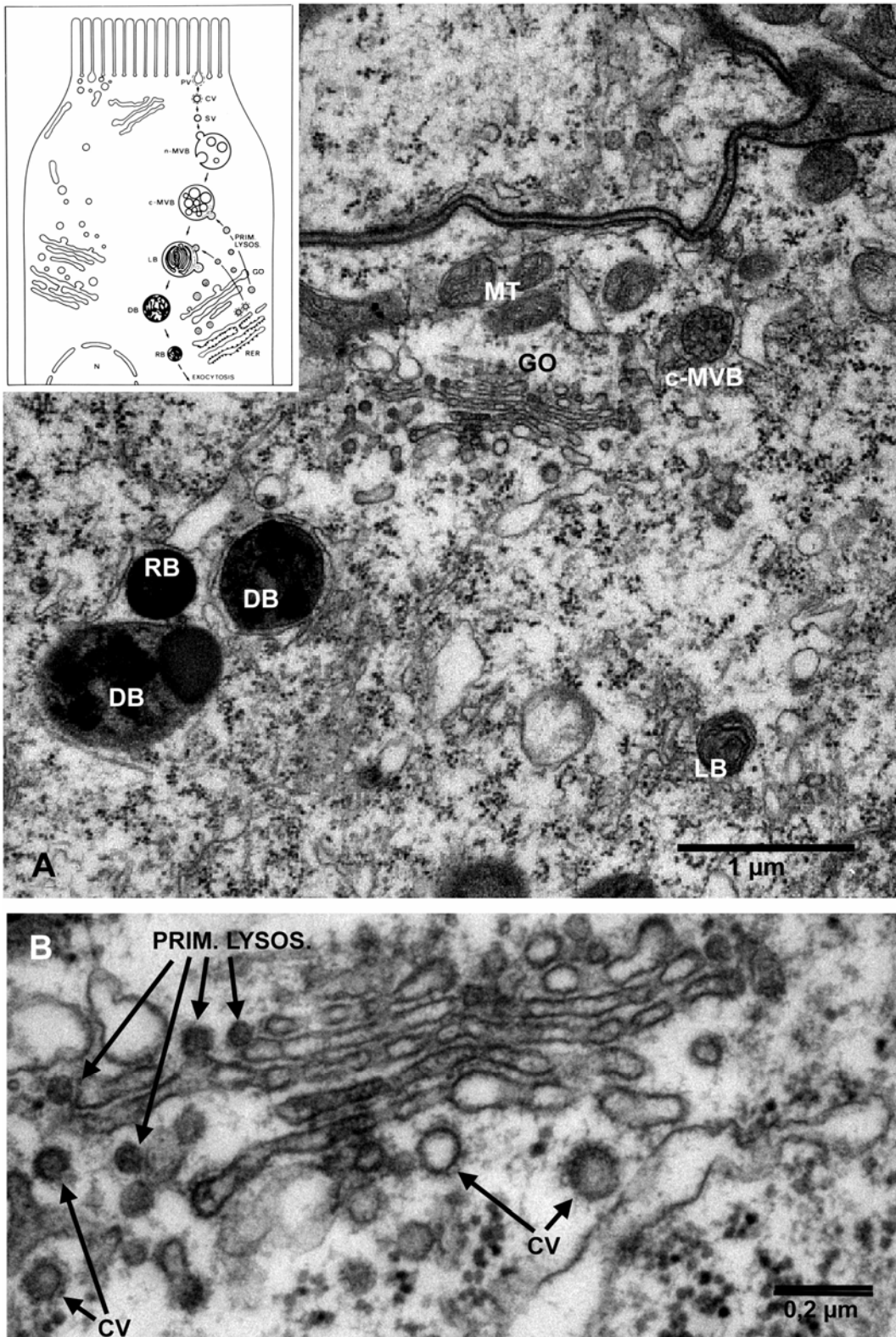


Abb. IV.2.18: Golgi-Apparat In den potentiellen Photorezeptorzellen ist stets ein hoch aktiver Golgi-Apparat als ein Bestandteil des Membranumbauprozesses zum Wiederaufbau der Photorezeptormembranen zu finden. In der direkten Umgebung dieses Golgi-Apparats liegen gehäuft kleine dunkle Vesikel, die nach Schwemer (1984, siehe **Inset**) den primären Lysosomen (**PRIM. LYSOS.**: glatte Wandung und elektronendichter Inhalt) oder den später auftretenden dunklen "coated vesicles" (**CV**: mit Clathrinen besetzte Wandung und ebenfalls meist dunkler Inhalt) zuzurechnen sind. Die mikrovillinahen kleinen Vesikel haben dagegen durchweg einen elektronenlichten Inhalt (vgl. z. B. **Abb. IV.2.8**). **A**: Übersicht über eine Rezeptorzelle aus einem dunkel adaptierten Nachtpräparat, bei dem alle späteren Abbaustadien in der Reihenfolge **c-MVB**, **LB**, **DB** und **RB** zu finden sind. Hingegen sind hier die typischen Umbaustadien der Tagpräparate wie z.B. **n-MVB** nicht zu sehen. **B**: Detailaufnahme aus **A**. **c-MVB**: compact multivesicular body, **CV**: coated vesicle, **DB**: dense body, **GO**: Golgi-Apparat, **LB**: lamellar body, **PRIM. LYSOS.**: primäre Lysosomen, **MT**: Mitochondrium, **RB**: residual body.

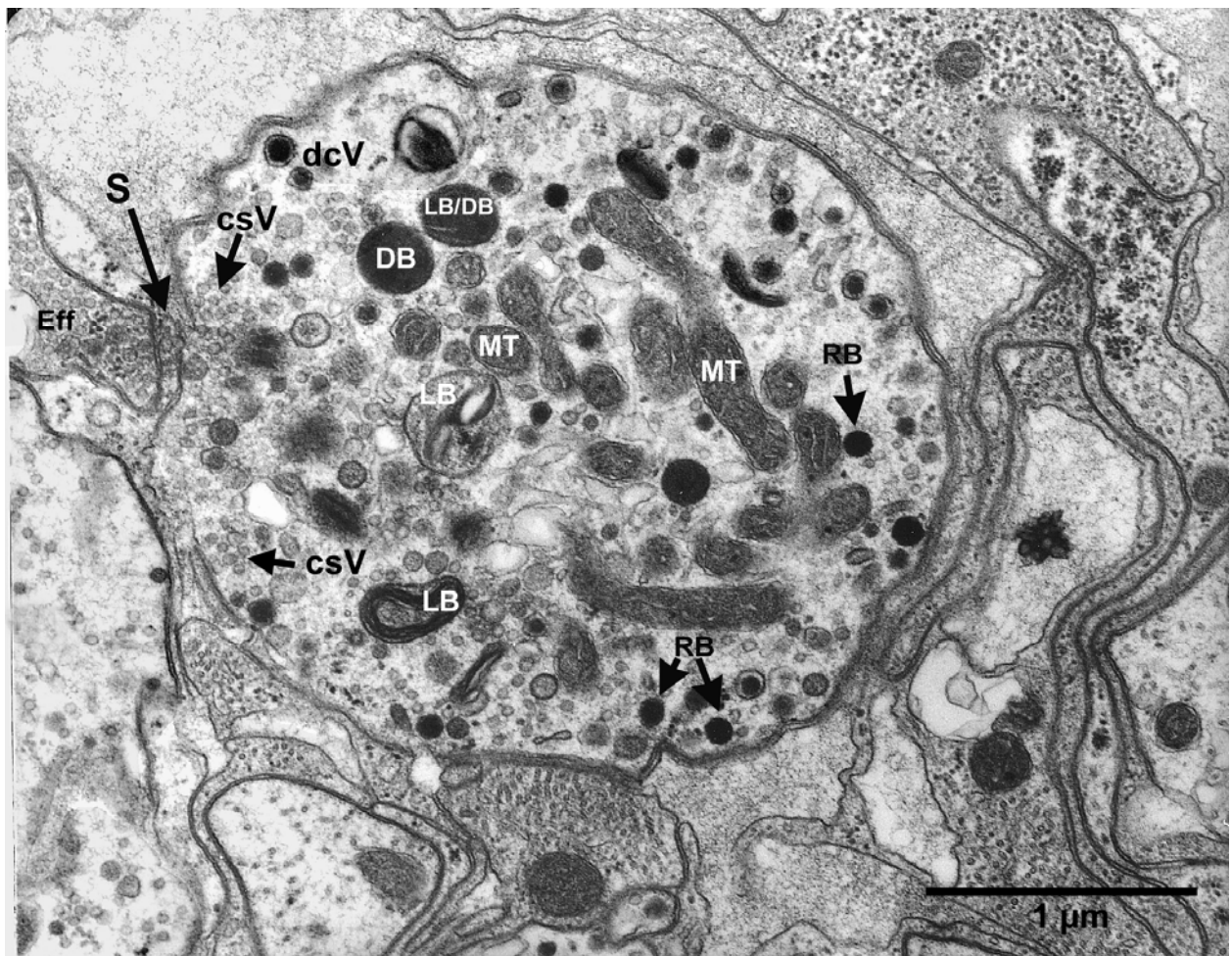


Abb. IV.2.19: Photorezeptorterminals mit efferenter Synapse. (Tagpräparat eines sechsten Ganglions). Vielfältige Umbauprodukte der rhabdomeren Mikrovilli (**DB**, **LB/DB** und **LB**, nur beispielhaft markiert) sind bis in die afferenten Terminalen der Photorezeptorzelle zu finden. Im gleichen Querschnittsprofil gibt es zusätzlich an mehreren Stellen typische Anhäufungen von klaren synaptischen Vesikeln (**csV**) und etliche „dense core“-Vesikel (**dcV**), die für chemische Synapsen typisch sind. An der mit „**S**“ gekennzeichneten Stelle des Schnittes findet offensichtlich ein mehrfacher Austausch von Information statt, wie an den synaptischen Vesikeln und Membranverdichtungen in mindestens drei Profilen zu erkennen ist. Die Membraneinbuchtungen der Photorezeptorafferenz verhindern eine klare Zuordnung der afferenten und efferenten Ziele.

DB: dense body, **dcV:** dense-core vesicle, **Eff:** efferentes Terminal, **LB:** multilaminated body, **MT:** Mitochondrium, **RB:** residual body, **csV:** helle synaptische Vesikel, **T:** Turnoverprodukte, **S mit Pfeil:** multiple Synapse.

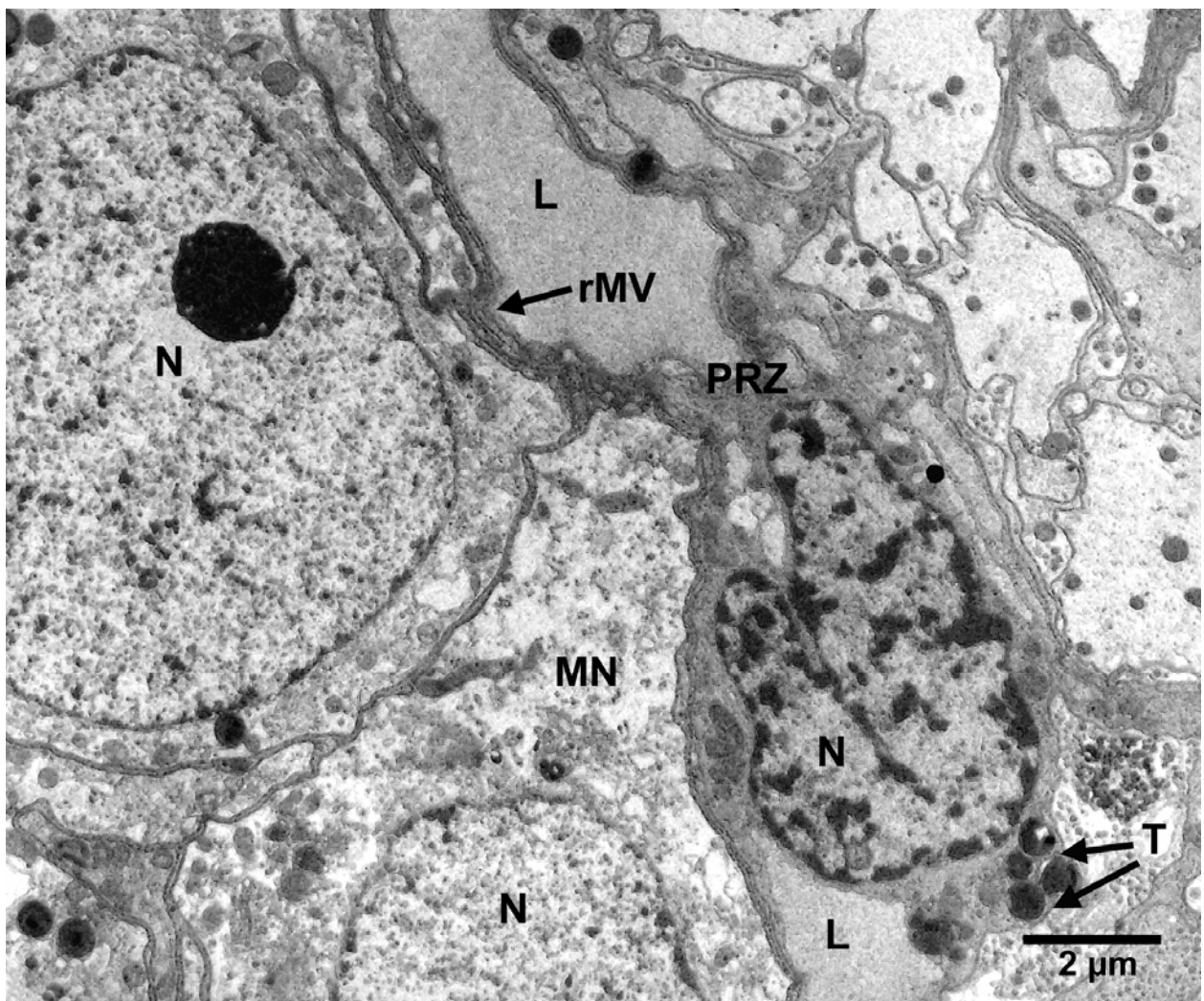


Abb. IV.2.20: Vergleich der Feinstruktur einer Photorezeptorzelle und den Somata der Neuronen in einem metasomalen Ganglion Der unregelmäßig gelappte Zellkern der Photorezeptorzelle enthält mehr Heterochromatin (dunkle Bereiche) als der glattrunde Neuronenzellkern. Das Cytoplasma der Photorezeptorzelle ist elektronenoptisch dichter als das des Neurons durch Anhäufungen von Ribosomen (vgl. z.B. **Abb. IV 2 11a**). Zwischen den rhabdomeren Mikrovilli ist eine Lakune zweimal angeschnitten. L: Lakune, MN: metasomales Neuron, N: Zellkern, PRZ: Photorezeptorzelle, rMV: rhabdomere Mikrovilli, T: Turnoverprodukte.

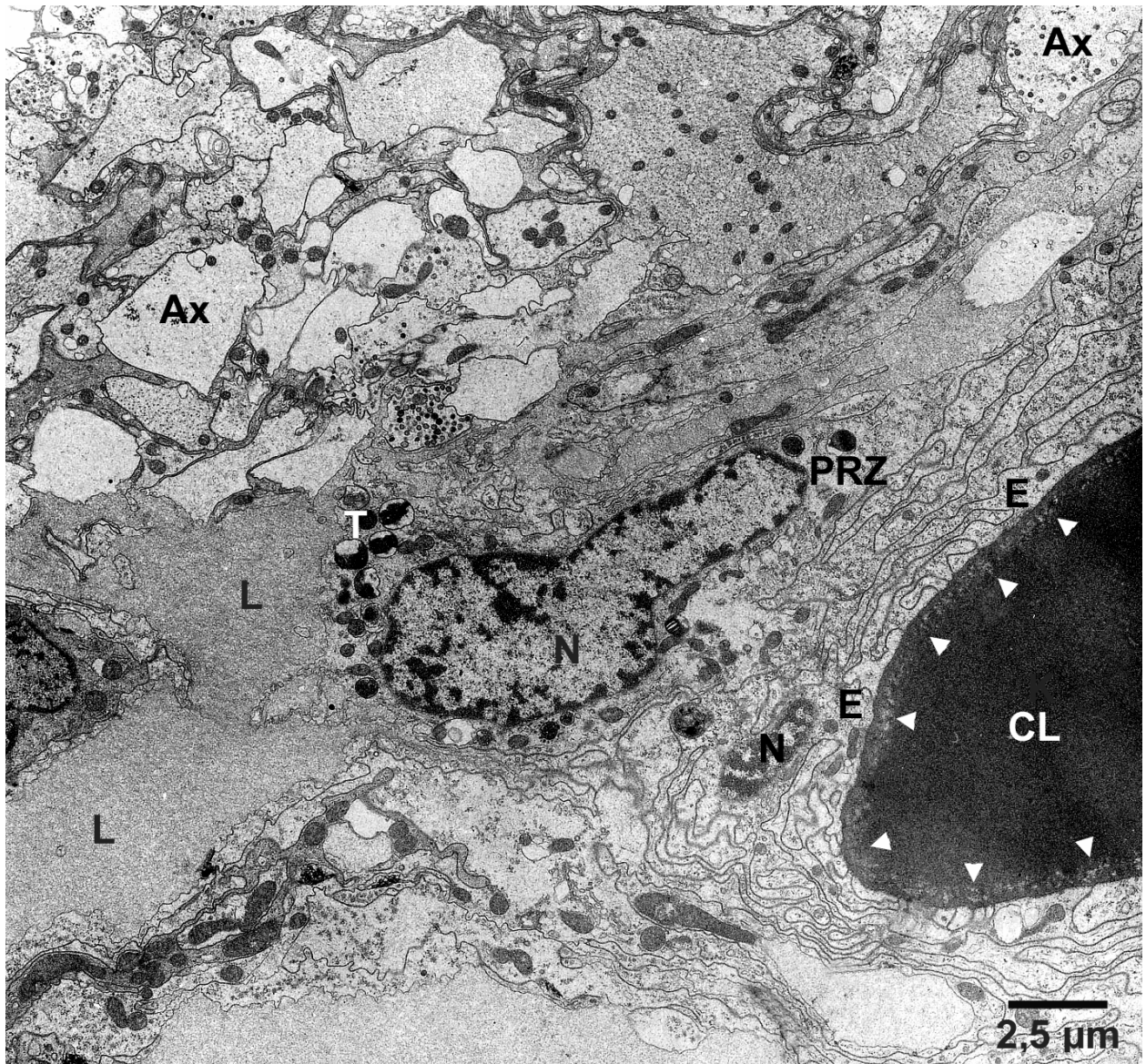


Abb. IV.2.21: Vergleich der Feinstruktur von Photorezeptorlakunen mit einer cerebralen Kapillare
 Am auffälligsten ist die unterschiedliche Elektronendichte der beiden Gefäße: Die Photorezeptorlakune ist deutlich heller als die Kapillare. Während die fast zufällig geformte Lakune als ein Zwischenraum inmitten der rhabdomeren Mikrovilli erscheint, hat die Kapillare eine Wandung aus Endothelzellen, die mit dicht gepackten Verzweigungen die „HämolympH-Hirn-Schranke“ bilden. Von der Innenseite liegt der Kapillarwandung ein dichter Filz aus feinsten Fasern auf (**Pfeilköpfe**).
Ax: Axon, **CL:** Kapillarlumen, **E:** Endothelzelle der Kapillarwand, **L:** Lakune, **N:** Zellkern, **PRZ:** Photorezeptorzelle, **T:** Turnoverprodukte.

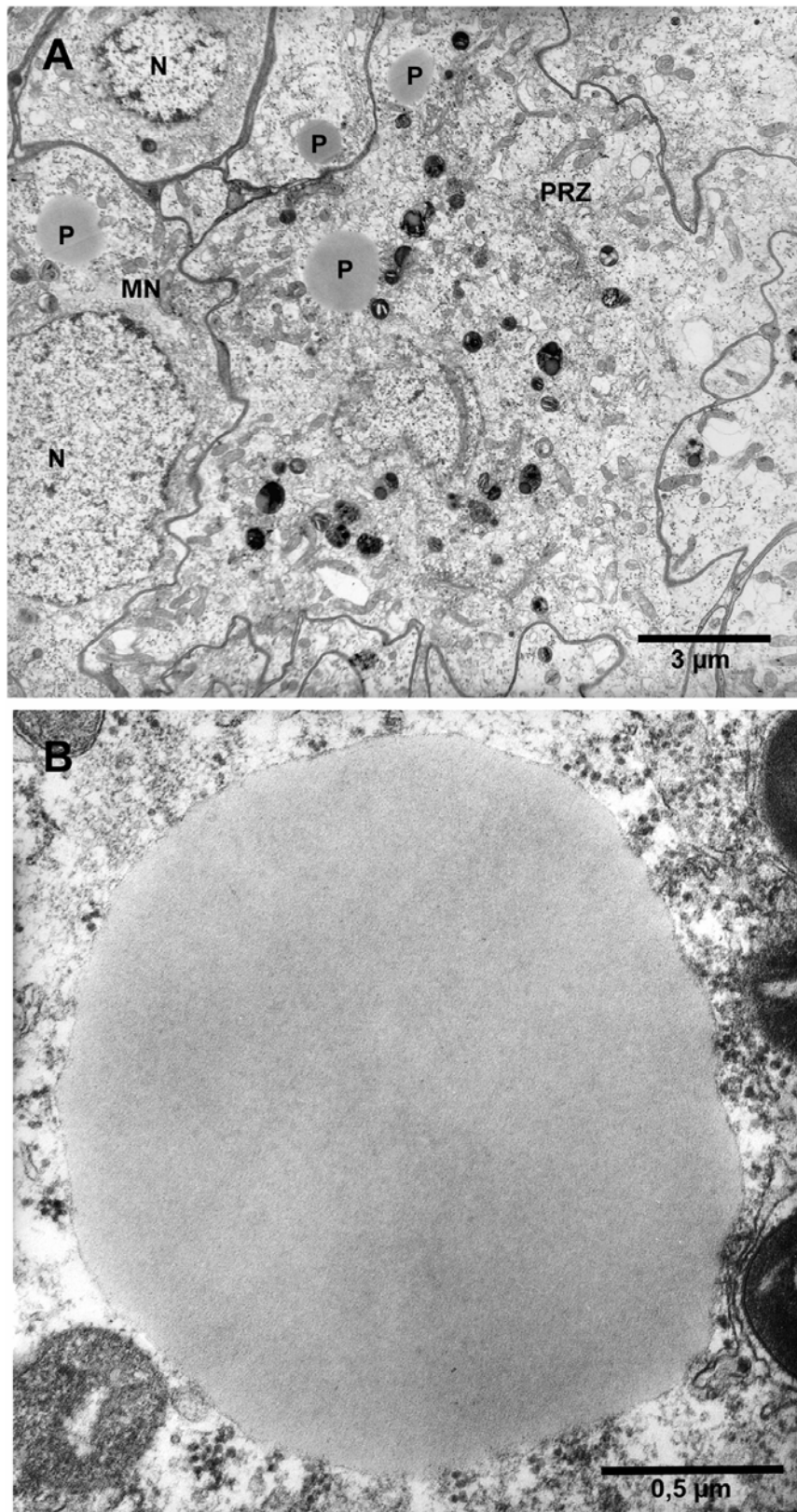


Abb. IV.2.22: Phasomen In Nervenzellen wie auch in Sinneszellen treten zuweilen feinkristalline Zellorganellen auf, die Phasomen oder Phacyten genannt werden. Sie erscheinen im elektronenmikroskopischen Schnitt weitgehend homogen hellgrau. Wegen ihres Vorkommens auch in photosynthetisierenden Pflanzenzellen werden sie als Beiprodukte heftiger oxidativer Stoffwechselaktivität gedeutet. Jedoch ist ihre Funktion immer noch rätselhaft. **A:** Schnitt durch ein helladaptiertes sechstes Ganglion. In der Mitte ist eine Photorezeptorzelle (**PRZ**) angeschnitten, in der Nachbarschaft mehrere Ganglienzellen (**MN**), die alle unterschiedlich große Phasomen enthalten. **B:** Vergrößerter Ausschnitt aus **A** mit Phasom aus der Photorezeptorzelle. **MN:** metosomale Ganglienzelle, **N:** Zellkern, **P:** Phasom, **PRZ:** Photorezeptorzelle.



V. DISKUSSION

Die immunhistologischen Untersuchungen mit photorezeptorspezifischen Antikörpern und Analysen der Feinstruktur haben in den letzten metasomalen Ganglien des Skorpions *Paruroctonus mesaensis* Zellgruppen aufgedeckt, die all den Kriterien entsprechen, die Photorezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns (ML) beim Skorpion erfüllen müssen. Diese Zellgruppen stellen deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit das strukturelle Substrat für den elektrophysiologisch und verhaltensbiologisch vor mehr als 30 Jahren beschriebenen extraretinalen Photorezeptor (Geethabali und Rao 1972) dar. Chronobiologische Studien am Skorpion von Zwicky (1968) hatten schon zuvor auf einen solchen extraretinalen Lichtsinn weit ab von den wohl bekannten "Augen" hingewiesen. Die Struktur dieses Photorezeptorsystems blieb aber bis heute unbekannt. Auch bei anderen Arthropoden haben bereits vor langer Zeit histologische, elektrophysiologische und chronobiologische Untersuchungen auf solche Photorezeptoren am caudalen Ende des Bauchmarks hingewiesen (Pfeilschwanzkrebs: Fahrenbach 1975, Hanna et al. 1985, 1988, Flusskrebs: Edwards 1984, Hama 1961, Kennedy 1958, Prosser 1934; Hornisse: Ishay und Kirshboim 2000, Kristianpoller et al. 1995; Schabe: Ball 1965, 1972). Durch die konsequente Anwendung neuerer Erkenntnisse über die Immunhistologie von Arthropodenaugen (z.B. Battelle et al. 2001, Briscoe et al. 2003) und licht- (Schwemer 1984, 1986) sowie elektronenmikroskopische Erscheinungsformen von Photorezeptorzellen (Sacunas et al. 2002) konnten in meiner Arbeit erstmals für den Skorpion typische Sinneszellen des ML beschrieben und erste Befunde zu der neuronalen Verschaltung erhoben werden. Die nun erfolgte genaue Lokalisierung des ML in den metasomalen Ganglien ermöglicht künftig weitergehende neurobiologische Analysen der Rezeptorphysiologie und der biologischen Bedeutung für den Skorpion. Nach diesem Modell können dann auch die bisherigen Befunde über die Photorezeptoren im Bauchmark anderer Arthropoden überprüft und erweitert werden.



V.1 Spezifität der verwendeten Nachweisverfahren

Um eine Struktur zu finden, die eine bestimmte physiologische Funktion erfüllen kann, sollten die prinzipiellen zugrunde liegenden Mechanismen bekannt sein sowie charakteristische histologische Details von vergleichbaren Systemen. Im Falle der bisher unbekanntem Rezeptorzellen des metasomalen Lichtsinns kann man davon ausgehen, dass in diesem Rezeptor wie in allen anderen retinalen und extraretinalen Photorezeptoren die Phototransduktionskaskade nach dem detailreich analysierten Grundschema abläuft und auch die Membranumbauprozesse der mit Photopigment beladenen Membran wie bei anderen Arthropoden ablaufen. Aber es gibt weder skorpionspezifische Antikörper gegen eins der photorezeptorspezifischen Enzyme oder Zellbausteine noch Modellvorstellungen aus histologischen Befunden bei anderen Arthropoden, wie ein solcher extraretinaler Photorezeptor aussehen könnte. Es ist auch nicht möglich, biochemisch - z.B. in Western Blots - die Spezifität der Antikörper zu testen, da einfach zu wenig spezifische Proteinmengen aus den Bauchganglien des Skorpions gewonnen werden können.

Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht,

- Antikörper einzusetzen, die aus verschiedenen Tieren stammen, aber bekanntermaßen wohl definierte Aspekte der Photorezeptormechanismen darstellen können,
- die Ergebnisse der Immunfärbungen des ML mit Färbeergebnissen an bekannten Photorezeptorsystemen zu vergleichen,
- lichtinduzierte Änderungen an Zellorganellen zu finden und diese mit Befunden über Turnover-Prozesse in Photorezeptoren zu vergleichen, und
- Zellbausteine zu finden, die die fraglichen Strukturen klar als Rezeptorzelle gegenüber z.B. Bindegewebs- oder Nervenzellen auszeichnen.

Zudem musste gezeigt werden, dass die Strukturkandidaten des ML zur Weitergabe von neuronalen Informationen in der Lage sind.



V.1.1 Antikörper

Die Spezifität der Immunreaktionen durch kommerziell erhältliche Antikörper ist in vielfachen Referenzen der Hersteller belegt (Quellen siehe Anhang). Auch bei Invertebraten haben diese für Wirbeltiere entwickelten Antikörper passende spezifische Markierungen ergeben: Calmodulin (Porter et al. 1993), Histamin (Stuart 1999), G-Protein (Jacquin-Joly et al. 2002), Serotonin (Rodriguez-Sosa et al. 1997 a oder b). Die Ergebnisse am Skorpion passen sehr gut zu diesen Befunden.

Zusätzlich wurden diverse nicht-kommerzielle photorezeptorspezifische Antikörper in Absprache mit den Herkunftslabors eingesetzt:

- Im Labor von B. Battelle (Whitney Marine Laboratory, St. Augustine, FL, USA) sind Antikörper gegen *Limulus*-Opsin, *Limulus*-Arrestin und *Limulus*-Myosin III für die Arbeiten über den photochemischen Zyklus in den Lateralaugen von *Limulus* hergestellt worden (Übersicht: Battelle et al. 2001). Sie konnten von mir während eines Aufenthaltes in diesem Labor auf ihre Reaktivität beim Skorpion hin positiv getestet werden. Da der Pfeilschwanzkrebs mit dem Skorpion sehr nah verwandt ist, sind diese Antikörper potentiell spezifischer als kommerziell erhältliche Antikörper oder solche, die z.B. gegen Vertebratenproteine gerichtet sind. Zu unterschiedlichen Sequenzen aus dem Rinderaugen-Arrestin sind von Donoso monoklonale Antikörper für immunhistologische Untersuchungen hergestellt und ausführlich charakterisiert worden (Donoso et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Antikörper (MAB C10C10) zurückgegriffen, der nach den Analysen von Battelle und Kollegen (Shmith et al. 1995) als invarianter Teil auch in Invertebratenaugen die lichtempfindlichen Strukturen sicher erkennt. Erfreulicherweise konnten beim Skorpion sowohl in den Medianaugen als auch in den Bauchmarkzellen des ML keine Unterschiede in den Färbeergebnissen mit dem anti-Rinderaugen-Arrestin und dem *Limulus*-Arrestin festgestellt werden, was dafür spricht, dass die erkannten Strukturen tatsächlich Teile einer Photorezeptorzelle sind.



- Mit dankenswerter Unterstützung durch L. Peichl (MPI Neuroanatomie, Frankfurt a. M.) konnte ich gut charakterisierte Antikörper gegen Opsine aus Rinderaugen austesten, die gegen verschiedene Sehzelltypen, Stäbchen und die unterschiedlichen Zapfen, hergestellt worden sind. Die so markierten Zellen stimmen in Lage, Zahl und Gestalt mit denen überein, die mit dem *Limulus*-Opsin markiert werden konnten. Dieser Befund kann derzeit noch nicht als Hinweis auf eine definierte spektrale Empfindlichkeit des ML im Blaubereich gewertet werden, da zunächst auch Immunmarkierungen gegen UV- Rot oder Gelbgrün empfindliche Photorezeptorzellen durchgeführt werden müssen. Aber immerhin dient die positive Immunreaktion auf Blauzapfen Opsin als deutlicher Hinweis darauf, dass Sehpigment in diesen bestimmten Bauchganglienzellen in „passenden“ Membranabschnitten und (als Turnoverprodukte) auch im Soma dieser Zellen vorhanden ist.
- Übereinstimmende Immunreaktionen mit den Arrestin-Antikörpern aus Rinder- und *Limulus*augen und den kommerziellen Antikörpern gegen das Gq-Protein aus Rinderaugen und *Limulus*-Gq bekräftigen in gleicher Weise die Annahme, dass es sich hier um photorezeptorspezifische Markierungen handelt.
- Eine zusätzliche Bestätigung hat diese Hypothese durch die Positivkontrollen erhalten, bei denen das Ursprungsgewebe (Wirbeltierretina, *Limulus*retina) parallel zu bekannten retinalen Photorezeptoren (den Medianaugen) des Skorpions behandelt wurde. Hierbei färbten sich erwartungsgemäß in allen Präparaten die rhabdom-ähnlichen Photorezeptormembrane und die zugehörigen Zellorganellen des Rhabdom-Turnover.

Alle Antikörper zeigten sehr spezifische Immunreaktivität in den Augen und in definierten Zellgruppen der letzten Bauchmarkganglien. Positive Immunreaktion in den fraglichen Zellen allein gegen nur einen der verwendeten Antikörper wären noch kein überzeugender Beleg für ihre Lichtempfindlichkeit. So hat z.B. ein polyklonaler Arrestin-Antikörper aus Rinderaugen in Fliegengehirnen eine große Anzahl von Zellen markiert, bei denen keine weiteren strukturellen oder immunhistologischen



Nachweise für Lichtsinnesorgane geführt werden konnten (Cymborowski und Korf 1994). Auch das Vorkommen von G-Proteinen in bestimmten Zellen ist für sich genommen noch kein Beweis, da G-Proteine auch Liganden der Rezeptormoleküle in Chemorezeptoren sind (Pophof und Van Naters 2002). Doch da in dieser Arbeit immunhistochemisch gezeigt werden konnte, dass diverse Enzyme der Phototransduktionskaskade und des Membranumbaus der Photopigment tragenden Membranen in den metasomalen Ganglien des Skorpions vorhanden sind, ist die Hypothese der Lichtempfindlichkeit der gefundenen Bauchmarkzellen beim Skorpion sehr wahrscheinlich.

V.1.2 Lichtabhängige Feinstrukturänderungen in Zellen der metasomalen Ganglien

Da es bisher keine Beschreibungen der Feinstruktur von Photorezeptoren im Bauchmark des Skorpions oder anderer Arthropoden gab, lagen erst recht keine Befunde zu deren lichtinduzierten Änderungen vor. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb in TEM-Untersuchungen die möglichen Extreme solcher Veränderungen analysiert, da hierdurch noch am ehesten mit Hinweisen auf sehphysiologisch relevante Strukturdetails zu rechnen war. Membranumbau findet natürlich auch in anderen Zellen statt. Drüsenzellen „recyceln“ ihre Membranen und sind elektronenmikroskopisch an ihrem Reichtum an Turnoverprodukten gut zu erkennen (Plattner und Hentschel 1997). Aber sie weisen stets zugleich große Stapel von RER und deutlich sichtbare Exocytoseformen auf. Beides wurde in den hier beschriebenen Bauchmarkzellen des Skorpions nicht gefunden.

Es muss als ein glücklicher Umstand gewertet werden, dass für die Auswertung dieser Skorpionpräparate zum einen der von Schwemer (1986) erstellte „schematische Verlauf“ des lichtabhängigen Umbaus der Photorezeptormembran in Arthropodenaugen zur Verfügung stand. Zum anderen lagen für die Lateralaugen von *Limulus* gut abgesicherte Befunde zum Vergleich von exogen (durch Licht) und endogen (durch die biologische Uhr) induzierten Änderungen der Feinstruktur vor (Sacunas et al. 2002). Als noch größerer Glücksfall ist zu werten, dass in den



potentiellen Rezeptorzellen des ML beim Skorpion geradezu beispielhaft all diese Umbauformen aufgefunden werden konnten – ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Zellen nicht nur die Ausstattung von Sehzellen haben, sondern sie auch zur Lichtwahrnehmung einzusetzen scheinen.

V.2 Zellgruppen in metasomalen Ganglien des Skorpions als Rezeptororgane des metasomalen Lichtsinns

V.2.1 Position und allgemeine Struktur der Lichtsinneszellen

Nach den jetzt vorliegenden Befunden handelt es sich bei dem ML des Skorpions nicht um geschlossene Sehorgane wie sie als „Augen“ oder auch z.B. bei Insekten als nicht-visuelle Photorezeptoren in den optischen Loben (Fleissner et al. 1993, 2001, Fleissner und Fleissner 2003) oder als umgewandelte ehemals retinale Rezeptoren der Larven vorkommen (Stemmata der Käfer: Hagberg 1986.; Äuglein von *Drosophila*: Hofbauer und Buchner 1989, Yasuyama und Meinerzhagen 1999; Übersicht: Fleissner und Fleissner 2003). Der ML scheint eher aus mehreren Zellgruppen mit ca. 5 bis 10 einzelnen Zellen zu bestehen, die in den letzten metasomalen Ganglien (5 bis 7) jeweils am rostralen und caudalen Rand bilateral symmetrisch nahe an den Ursprungsorten der Konnektive zu finden sind. Dieser Befund von multiplen Untereinheiten des ML beim Skorpion passt zu den elektrophysiologischen Befunden von Geethabali (1974, 1976 b, c): bei elektrophysiologischen Ableitungen im Metasoma reagieren offensichtlich viele Einheiten gemeinsam auf lokale Lichtreize.

Die extraretinalen Photorezeptoren des Schmetterlings *Papilio xuthus* (Miyako et al. 1993), die als genitale Photorezeptoren bekannt wurden, befinden sich in der Nähe des letzten Abdominalganglions und sind über einen Nerv mit diesem verbunden. Diese Schmetterlingsrezeptoren sind als einzige bezüglich ihrer Struktur näher beschrieben worden. Zur Lage der caudalen Photorezeptoren der Flusskrebse gibt es nur eine wenig aufschlussreiche Publikation (Wilkins und Larimer 1972). Sie dokumentiert im Wesentlichen zwei Zellen im Bauchmark, deren axonale



Verbindungen über Tracing mit Lucifer Yellow gezeigt werden konnten (s.u.). Die Rezeptorzellen der extraretinalen Rezeptoren im Bauchmark von Arthropoden werden aufgrund von elektrophysiologischen Ableitungen innerhalb der Bauchganglien vermutet (Skorpion: Geethabali 1976 a, 1979, Übersicht: Fleissner und Fleissner 2003). Belege für ihre tatsächliche Position gibt es keine.

Auch wenn Schirmpigmente als Landmarken für die neu gefundenen ML-Rezeptorzellen des Skorpions fehlen, könnten die älteren physiologischen Untersuchungen nun mit exakt platzierten Ableitelektroden wieder aufgenommen werden, um so - statt der bisherigen Summenableitungen an möglicherweise nachgeschalteten Interneuronen (s.u.) - detaillierte Rezeptoranalysen anhand von Einzelantworten der ML-Untereinheiten vorzunehmen. So könnten modellhaft Untersuchungsparadigmen für die unbekanntes caudalen Photorezeptorsysteme entwickelt werden.

V.2.2 Strukturelle und immunhistologische Evidenzen für Photorezeption von bestimmten metasomalen Zellen des Skorpions

In der Regel zeichnen sich Lichtsinneszellen gegenüber Nerven-, Bindegewebs- und Drüsenzellen durch auffällige Membranspezialisierungen aus, die insbesondere die Photopigment tragenden Membranen betreffen. Diese Membranabschnitte sind stark vergrößert und bilden bei den Arthropoden meist zahlreiche Mikrovilli, die dann zu mehr oder weniger regelmäßig geschichteten „Rhabdomen“ zusammengepackt werden. Auch die Umbauprodukte dieser Membranen treten gehäuft in solchen Zellen auf. Zudem sind die Sinneszellen durch afferente Axone mit dem Nervensystem verbunden, um ihre Informationen über wahrgenommenes Licht weiter zu geben.

Die putativen Rezeptorzellen des ML besitzen all diese Strukturmerkmale, auch wenn die rhabdomähnlichen Mikrovilli nicht so ordentlich geschichtet sind wie z.B. in den retinalen Photorezeptoren der meisten Arthropodenaugen.



Insbesondere zeigen die vergleichenden Immunreaktionen mit Antikörpern gegen Opsine als Photopigment und andere Enzyme des photochemischen Zyklus Transducin als Opsin-Ligand und Arrestin als letztes Protein dieser Reaktionskette, dass diese rhabdomeren Mikrovilli tatsächlich Photopigment enthalten und dessen Reaktion auf Licht auch die Vorgänge, die letztendlich zur Bildung von Rezeptorpotentialen führen, triggern können. Battelle et al. (1998, 2001) haben gezeigt, dass Opsin, visuelles Arrestin, Myosin III und Calmodulin konzentriert an den photosensitiven Membranen von *Limulus polyphemus* vorkommen, was mit ihrer Steuerung der Lichtempfindlichkeit übereinstimmt. Opsin und visuelles Arrestin sind auch in extra-rhabdomeren Vesikeln konzentriert vorhanden, da sie wahrscheinlich verinnerlichte rhabdomere Membranen beinhalten. Battelle und Koautoren fanden visuelles Arrestin und Myosin III weit verstreut im "Cytosol" der Photorezeptoren. Somit ist anzunehmen, dass sie noch zusätzliche Funktionen außer ihrer Rolle in der Phototransduktion haben.

- Die anti-Opsin, anti-Gq- und anti-Arrestin Immuncytologie zeigt unter anderem ML-Zellen des Skorpions, die eine markante Ähnlichkeit mit den Rekonstruktionen aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben. So kann auch hier ein schlankes Soma erkannt werden mit einem runden bzw. bohnenförmigen meist gelappten Zellkern und einer apikalen Kapsel, die mit flächig geknäultem Material dicht gefüllt ist. Diese Füllung stimmt mit den rhabdomeren Mikrovilli überein, die sich im TEM darstellen lassen. Eine Struktur, entsprechend der elektronmikroskopisch entdeckten Lakune, ist im Lichtmikroskop in der Mitte der rhabdomeren Mikrovilli als ein liches Gebiet zu sehen.

Vergleichende immunhistologische Studien an extraretinalen Photorezeptoren ganz unterschiedlicher Tiergruppen nutzten insbesondere Antikörper gegen Enzyme der Phototransduktionskaskade als universelle Marker für unbekannte photorezeptive Strukturkandidaten.



Opsin

- Bei der Mücke *Clunio Marinos* können ganz ähnliche Zellen im Bauchmark wie beim Skorpion erkannt werden. Dies ist ein Hinweis auf funktionale Lichtsensoren (Fleissner und Fleissner 2003).
- Yasuyama und Meinerzhagen (1999) stellen in ihren Studien an *Drosophila melanogaster* dar, dass Rhabdome Rh6 opsinartige Immunreaktivität aufweisen.
- Auch die Photorezeptoren für die photoperiodische Steuerung der Metamorphose von Blattläusen liegen vermutlich im Oberschlundganglion (Gao et al. 1999).
- Sandeman et al. (1990) fanden heraus, dass die pigmentierten Zellen des extraretinalen Photorezeptors an der Antennenbasis der Krebse insbesondere einen monoklonalen Antikörper gegen Opsine der meisten Arten binden.
- Geusz et al. (1997) beschreiben, dass bei der Meeresschnecke *Bulla gouldiana* ein polyclonaler Antikörper gegen Opsine eines Vertebratenphotorezeptors sowohl die Schrittmacherzellen als auch die großen distalen Photorezeptoren färbt, die die Linse umgeben.
- Auch Garcia-Fernandez et al. (1997) haben mit Antikörpern, die gegen Proteine aus retinalen Photorezeptoren (Rod und Cone Opsin, α Transducin und Arrestin) gerichtet waren, Zellen im Pinealorgan, Parapinealorgan und im Nucleus preopticus vom Neunauge markieren können. Menaker und Oksche (1974) beschreiben die gleiche Abstammung vom Pinealorgan und der Retina von Vögeln und zeigen dies unter anderem an positiven Opsin-ir Markierungen beider Organstrukturen.

Transducin

Es wird angenommen, dass die Translokation von Gq α als ein molekularer Mechanismus für die Kontrolle der Sensibilität der Photorezeptoren dient. Daher sind die positiven Gq α -Immunmarkierungen im ML von *Paruroctonus mesaensis* eine weitere Bestätigung für einen potentiellen Photorezeptor.

- Antikörper gegen Gq α und G α 11 markieren bei *Limulus polyphemus* Photorezeptorzellen und Retinulazellen (Munger et al. 1997).



- Der Gq-Typ der G-Proteine spielt eine zentrale Rolle in der Phototransduktionskaskade der Flusskrebse (Terakita et al. 1998). Die Autoren konnten zusätzlich zeigen, dass die Menge von Gq in den rhabdomeren Membranen unter Lichtbedingungen abnimmt und im Cytoplasma zunimmt. Dieser Effekt könnte eine Auswirkung auf die Immunfärbungen haben und sollte daher bei der Zeitwahl weiterer Präparationen berücksichtigt werden.

Histamin

Positive Immunreaktionen der ML-Zellen mit Histamin als Transmitter der Photorezeptoren aller Invertebraten (Stuart 1999, Limulus: Battelle et al. 1991) weisen daraufhin, dass die lichtinduzierten Rezeptorpotentiale auch im Falle der ML-Zellen in neuronale Informationen für das ZNS umgesetzt werden.

- So konnte ich auch in den visuellen Bahnen der Median- und Lateralaugen von *Paruroctonus mesaensis* Histamin nachweisen.
- Auch Yasuyama und Meinerzhagen (1999) zeigen für das Auge von *Drosophila* histaminerge Afferenzen.

Zusätzliche Strukturmerkmale bestätigen die Hypothese, dass die ML-Zellen photosensibel sind:

- Zwischen den rhabdomähnlichen Mikrovilli befindet sich - durch Desmosomen abgetrennt – eine Lakune als gesonderter Reaktionsraum, wie er bei den Rhabdomen der Invertebratenaugen zu finden ist (Shaw, 1978). Zentrale intrazelluläre Lakunen wurden von Röhlich et al. (1970) ebenfalls in extraretinalen Photorezeptorzellen des Regenwurms *Lumbricus terrestris* entdeckt.
- Im Cytoplasma der Zellen findet man alle Stadien des „Rhabdom-Turnover“-Prozesses, wie er bei Belichtung von Photorezeptorzellen zu erwarten ist (Schwemer 1986, Schwemer und Hennig 1984).
- Die Somata dieser Zellen enthalten nach meinen immunhistologischen Befunden auch Enzyme (z.B. Myosin III), die für diesen Membranumbau erforderlich sind und quasi als Motor dienen (Battelle et al. 2000).



Die Zellen des ML vom Skorpion haben allerdings keine Schirmpigmente oder sonstige Spezialisierungen, die als dioptrischer Apparat gedeutet werden können. Doch diese Struktureigenschaft spricht nicht gegen die Bauchganglienzellen als ML des Skorpions. Denn alle bisher bekannt gewordenen extraretinalen Photorezeptoren von Arthropoden „verzichten“ eher auf solche für bildverarbeitende Lichtsinnessysteme typischen Einrichtungen (Übersicht Fleissner und Fleissner 2003). Die ehemaligen „retinalen“ Rezeptoren, die das Bildsehen aufgegeben haben, bilden diese Reizleitungssysteme sogar deutlich zurück (Lateralaugen der Skorpione mit fehlendem Glaskörper und abgeplatteten oder fehlenden Linsen: Fleissner 1977 a, b, Schliwa 1980; Stemmata der Käfer nach der Metamorphose ohne Linsen und Auflösung oder Verlust des Schirmpigments: Waterkamp et al. 1998). Allerdings ist noch gänzlich unklar, ob eventuell die vielen Lakunen im Bereich der Mikrovillihaube des ML lichtleitende oder dispergierende Funktionen erfüllen, um eine möglichst hohe Ausbeute an dem wenigen Licht zu erreichen, dem der Skorpion natürlicherweise ausgesetzt ist (Fleissner und Fleissner 2001 c). Denn der Skorpion lebt tagsüber im Dunkeln seiner Höhle und kommt bei Nacht nur heraus, wenn kein Mond scheint (s.u.).

In der Literatur wird als ein weiteres Indiz für Photorezeptorzellen das Vorkommen von sogenannten Phaosomen (Yoshida 1979) benannt. Andere Autoren beschreiben Phaosomen als generelles ultrastrukturelles Merkmal von Zellen mit hoher Stoffwechselaktivität (Plattner und Hentschel 1997). Hier werden offensichtlich völlig unterschiedliche Organellen mit den gleichen oder ähnlichen Namen belegt: 1) Für Photorezeptoren gibt es in der älteren Literatur den Begriff „Phaosom“ oder „Phaocyte“ für die Gesamtheit der photopigmenthaltigen Mikrovilli, solange sie nicht als „Rhabdome“ erkennbar sind (Yoshida 1979). Arikawa und Aoki (1982) und Miyako et al. (1993, 1995) fanden Strukturen im extraretinalen Photorezeptor des Schmetterlings *Papilio xuthus*, die sie Phaosom nannten. Dies mag vom lichtmikroskopischen Erscheinungsbild dieser Strukturen herrühren, die dort als hellgraue Bereiche erscheinen. 2) Genauso homogen, allerdings nicht unregelmäßig geformt sondern eher kugelig rund, sehen im Elektronenmikroskop Stoffwechselbegleitprodukte aus, die sowohl in Pflanzen als auch in Tieren vorkommen können. Sie können zwischen 0,1 und 1 μm groß sein und sind von einer



Einfach-Membran umgeben. Sie werden als Phaosomen oder Peroxisomen bezeichnet, da sie reich an peroxidativ aktiven Enzymen sind. Aber im Grunde genommen weiss man nicht genau, welche Funktion diese Organellen haben (Plattner und Hentschel 1997). Es gibt die durch genetische Untersuchungen gut begründete Hypothese, dass diese Organellen „lebende Fossilien“ sind, die in der Eukaryontenzelle am oxidativen Stoffwechsel beteiligt waren, bevor die Mitochondrien zur Verfügung standen (Makita 1982). 3) In Pflanzen gibt es sogenannte Phaeosomen oder Phaeoplasten, die durch Fucoxanthin bräunlich gefärbte Chromatophoren sind (Nultsch und Grahl 1968) und charakteristischerweise in Braunalgen vorkommen.

Zusammenfassend kann man nur feststellen, dass Phaosomen (der 2.Kategorie), wie sie hier gezeigt werden konnten, wohl auch in Photorezeptorzellen (und Nervenzellen) vorkommen, aber nicht typisch für deren Funktionen sind.

V.2.3 Cilie versus rhabdomere Photorezeptoren - ein Ausschlusskriterium?

Am merkwürdigsten und ungewöhnlichsten für Photorezeptoren von Insekten und Arachniden ist die intrazelluläre Cilie, die hier in den Bauchmarkzellen des ML gefunden wurde, da die Arthropodenaugen im Gegensatz zu den Wirbeltieraugen vom "rhabdomeren Typ" sind.

Die Cilien in den potentiellen Photorezeptorzellen von *Paruroctonus mesaensis* zeigen im Querschnitt eine typische 9+2 Struktur. Je nach der Lage der Schnittebene ergeben sich unterschiedliche Abbilder ihrer inneren Struktur. Die Cilien sind mit „Wurzeln“ in der Zelle verankert und zeigen Triplets oder – zum apikalen Pol hin – Dupletts der äußeren Tubuli. Innerhalb der Rezeptorzellen konnte bisher keine Regel für die Ausrichtung der Cilie erkannt werden. Diese Cilie tritt in allen untersuchten Zellen des ML nur einzeln auf. Sie ist damit nicht Hälfte eines Centriols, wie es typischerweise bei der Zellteilung auftritt (Übersicht: Plattner und Hentschel 1997). Solche Zellen, die hier auch in den Bauchmarkganglien des Skorpions gefunden wurden, haben nur einen sehr schmalen Cytoplasmasaum und auch nicht die Fülle



an Turnoverprodukten wie die potentiellen Rezeptorzellen des ML. Doch selbst wenn es in einigen Fällen ein Centriol sein sollte, dessen andere Hälfte übersehen worden ist, würde sich die Einordnung dieses Organells für die Rezeptorfunktion der ML-Zellen nicht ändern, da in einer Reihe wichtiger morphogenetischer Prozesse das Basalkörperchen der Centriole unter anderem in die Bildung von Cilien integriert ist (Ude und Koch 1982).

Das Vorkommen von Cilien in den Zellen des ML kann als zusätzliches Indiz dafür gewertet werden, dass es sich hier nicht um Nerven- oder Gliazellen handelt, sondern eher um ehemals epitheliale Zellen, z.B. Haarsinneszellen, wie sie bei fast allen Tieren auftreten. Diese ursprüngliche Struktur aus einem Soma, das über eine Ciliarstruktur mit einem sensorischen Fortsatz verbunden ist, kann auch noch in vielen Rezeptorzellen gefunden werden, die dann im Laufe der Evolution zusätzliche Membrandifferenzierungen zur Optimierung der sensorischen Funktion erworben haben. Bekannte Beispiele sind z.B. die Mechano- (Iwasaki et al. 1999) und Chemorezeptoren (Ozaki und Tominaga 1999, Steinbrecht 1999) von Arthropoden und die Photorezeptoren der Vertebraten (Übersicht: Eakin 1973). Auch wenn sekundär die Rezeptorfunktion dieser Zellen verloren geht, bleibt die Herkunft der Zellen erkennbar. Ein Beispiel hierfür sind die Pinealocyten der Wirbeltiere, die unabhängig von der Möglichkeit noch selbst photorezeptiv zu sein, immer einen Ciliarkörper besitzen (Übersicht: Korf 1994, Meissl und Dodt 1981). Auch in vielen Photorezeptororganen von niederen Invertebraten kommen Cilien-Strukturen zusammen mit rhabdomeren Mikrovilli vor. In Anneliden (Regenwurm *Lumbricus terrestris*: Röhlich et al. 1970) haben die dermalen Photorezeptoren beides, rhabdomere Mikrovilli und eine oder mehrere intrazelluläre Cilien, die nach Dunkeladaptation in den extrazellulären Spalt übertreten können (Yoshida, 1979). Das teilweise in seiner Funktion noch mysteriöse "Bellonciorgan" von Crustaceen (Bellonci 1881), das auch X-Organ genannt wird (Übersicht: Taketomi et al. 1992) besteht unter anderem aus vermutlich photosensorischen Zellen, die zum einen Zellkörper zeigen, die sich durch sekretorische Granula und eine große Anzahl von „onion-shaped bodies“ auszeichnen und zum anderen ein "outer ciliary segment" haben, zwei Cilien, aus denen lange verzweigte Mikrovilli mit einem zentralen Lumen



entspringen. Bei Mollusken kommen Photorezeptoren mit Cilien und rhabdomere Photorezeptoren in der gleichen Retina vor (Übersicht: Messenger 1981).

In älterer Literatur über Arthropodenaugen gibt es weitere Hinweise darauf, dass sich die fast schon dogmatisch vertretene Abgrenzung: „Arthropoden haben rhabdomere Photorezeptoren und Wirbeltiere haben ciliäre Photorezeptoren“ keinesfalls halten lässt. Bei manchen Autoren, wie z.B. in den Arbeiten von Home (1972, 1976), der Cilien in retinalen Photorezeptoren von Käfern beschreibt, werden die beiden Begriffe Cilie und Centriole miteinander vermischt oder nicht klar voneinander getrennt. So wurden z.B. in den Komplexaugen von vier Marienkäferarten (Home 1975) und der Wanze *Rhodnius* (Müller 1970) jeweils am distalen Ende der Retinulazellen Cilien/Centriolen beschrieben, die nicht mit Zellteilungsvorgängen in Zusammenhang stehen. Diese „Centriolen“ (oder auch Tandem-Cilien) mit langen filamentartigen Strukturen (Cilienwurzeln) werden inzwischen generell als Organisationszentrum für die Mikrotubuli gedeutet. Sie übernehmen den Transport der Zellorganellen. In den Photorezeptoren sind sie z.B. insbesondere für den Transport der Rhabdom-Turnoverprodukte oder der Schirmpigmentgranulen verantwortlich (Übersicht: Autrum 1981).

Zusammenfassend können die derzeitigen Befunde zur Cilie in den ML-Zellen zwar noch nichts über deren Funktion aussagen, sie müssen aber als ein weiterer Hinweis auf die Rezeptorfunktion dieser Zellen im Bauchmark bewertet werden - vielleicht sogar als phylogenetische Erinnerung an die „primitiven“ Lichtsinnesorgane der niederen Invertebraten.

V.3 Afferente und efferente Verschaltungsmuster des metasomalen Lichtsinns und Hinweise auf seine mögliche Funktion

V.3.1 Axonverbindungen der ML-Zellen

Immunhistologische Markierungen der ML-Zellen mit photorezeptorspezifischen Antikörpern (Opsin, Arrestin und Gq) haben übereinstimmend gezeigt, dass die



afferenten Axone dieser Zellen nur kurz sind, und bereits im gleichen Ganglion, in dem auch die Zellen liegen, enden. Färbungen mit anti-Histamin-Antikörpern zeigten hingegen über diese ersten Terminalgebiete hinausgehende Nervenbahnen, die bis in die Unterschlundganglienmasse hineinreichen. Nach dem ersten Terminalgebiet sehen diese Fasern allerdings deutlich dicker aus, als die zarten ML-Zellaxone. Zusammengenommen sprechen diese Befunde dafür, dass histaminerge afferente Photorezeptoraxone der ML-Zellen direkt auf ebenfalls histaminerge Interneurone aufgeschaltet werden.

Diese Deutung steht im Gegensatz zu Berichten über die caudalen Photorezeptoren von Krebsen (Wilkins und Larimer 1972), in denen Bilder gezeigt werden von Lucifer Yellow gefüllten Afferenzen, die die photoreaktiven Ganglienzellen direkt mit dem Unterschlundganglion verbinden. Es mag sein, dass die Rezeptoren der Krebse anders verschaltet sind, es kann aber auch sein, dass hier eine Fehlinterpretation vorliegt, zumal keinerlei andere Immunfärbungen mit Antikörpern durchgeführt wurden, die nur in Rezeptorzellen vorkommen können. In Invertebratenneuronen tritt der Tracer Lucifer Yellow durch elektrische Synapsen ("gapjunctions") hindurch und kann so auch noch nachgeschaltete Neurone sehr deutlich markieren (Buhl 1993). Dies ist in den Arbeiten von Wilkins und Larimer (1972) nicht ausgeschlossen worden. Bei genauerem Studium der veröffentlichten Bilder fällt zudem auf, dass sich, wie beim ML des Skorpions, ein kurzes dünnes Axon in einem großkalibrigen langen Axon fortsetzt. Leider liegen keine anderen histologischen Befunde zur neuronalen Verschaltung von caudalen Photorezeptoren vor.

In den TEM-Untersuchungen am ML des Skorpions konnten eindeutige Hinweise auf eine präsynaptische efferente Innervation der Rezeptorzellaxone gezeigt werden. Solche präsynaptischen Efferenzen sind auch aus den retinalen Photorezeptoren des Skorpions bekannt (Fleissner und Heinrichs, 1982, Übersicht: Fleissner und Fleissner 2001 a, b, c). Die efferenten Terminale stammen von den efferenten neurosekretorischen Zellen (ENSF), die mit vielfachen Synapsen in der Retina das circadiane Signal der Uhr an die Rezeptorzellen liefern (Fleissner und Fleissner 1978, Übersicht Fleissner und Fleissner 1988) und hier eine endogene Hell/Dunkeladaptation durch massive Verschiebungen von Schirmpigmenten



bewirken (Fleissner 1974). Die Terminalen der ENSF im ersten optischen Ganglion auf den Sehzellafferenzen werden als Teil eines neuronalen Netzwerks gedeutet, das die Wahrnehmung von natürlichen Zeitgebern ermöglicht (Fleissner und Fleissner 2002).

Kandidaten für die efferenten ML-Bahnen wären z.B. serotonerge oder glutaminerge Neuronen, die mit positiven Immunmarkierungen gegen diese beiden Amine nahe bei den ML-Zellen gezeigt werden konnten. Aber die mögliche Funktion der efferenten Innervierung am ML kann erst diskutiert werden, wenn z.B. in Doppelfärbungen im TEM die ML-Zellen sowie die Signale und Signalwege dieser Efferenzen gezeigt worden sind. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

V.3.2 Vergleich der Struktur und neuronalen Vernetzung der gefundenen Bauchmarkzellen mit den bisher bekannten rezeptorphysiologischen Eigenschaften des ML

Wenn die in dieser Arbeit mit immunhistologischen und feinstrukturellen Untersuchungen gefundenen Zellen in den metasomalen Ganglien des Skorpions die Rezeptorzellen des ML sind, müssen sie zu den bekannten elektrophysiologischen Befunden von Zwicky (1968, 70 a) und Geethabali (1974, Geethabali und Rao 1973) passen:

- Die ML-Zellen haben kein Schirmpigment und sind jedweder Beleuchtung quasi schutzlos ausgesetzt. Dieser Befund passt zur Beobachtung von Geethabali (1974), dass schon nach wenigen Minuten Beleuchtung, z.B. mit einer Präparationsleuchte, keine lichtinduzierten Potentiale mehr ableitbar sind. Erst nach einer Dunkeladaptation von einer halben Stunde oder länger reagiert der ML wieder auf Lichtreize. Aus dem gleichen Grund ist die Schwelle niedrig und die Kennlinie steil.
- Mehrere Zellgruppen mit jeweils mehreren Rezeptorzellen bilden die vermutliche zelluläre Grundlage des ML. Dies kann der Grund für die multiplen Aktionspotentiale (Geethabali 1976 a) in den abgeleiteten spontanen und induzierten Reaktionen der Bauchganglien sein.



- Die afferenten Nerven der Rezeptorzellen sind nur kurz und werden sogleich auf erste Interneurone aufgeschaltet. Damit wird erklärbar, weshalb in den bisherigen Untersuchungen kaum graduierte Rezeptorpotentiale sondern eher Alles-oder-Nichts-Antworten abgeleitet werden konnten (Geethabali 1974, Geethabali und Rao 1972, Zwicky 1968). Diese müssen als Antworten der Interneurone gedeutet werden.
- Zugleich könnten diese Interneurone auch die kontralaterale Verknüpfung (Geethabali 1976 a) bewirken, die in den vorliegenden Untersuchungen bei den afferenten Axonen der ML-Zellen nicht gefunden werden konnte.
- Erste Filterprozesse könnten auch die unterschiedlichen Adaptationszeiten von lichtinduzierten Antwortmustern erklären (Geethabali und Rao 1973), obwohl die Rezeptorzellen bisher alle gleich aussehen, auch bezüglich der Menge und Struktur der Turnoverprodukte.

Die immunhistologischen Befunde zur möglichen neuronalen Verschaltung der ML-Zellen haben erste Hinweise dafür geliefert, dass diese Zellen in engem Kontakt zu serotonergen Nervenbahnen stehen und zu langen histaminergen Verbindungen, die bis in das Unterschlundganglion hineinreichen. Diese Verbindungen wären eine Basis für die beobachteten „Alarm“- und Verteidigungsreaktionen des Skorpions, wie Schwanzschlag und Stachelflip (Geethabali 1976 b, c, Zwicky 1970 a), die bei isolierter Belichtung des Metasomas auftreten.

V.4 Ein Ausblick: Mögliche Bedeutung des metasomalen Lichtsinns, insbesondere bei der Zeitgeberperzeption im circadianen Uhrensistem des Skorpions

Der ML des Skorpions dient wahrscheinlich nicht der räumlichen Orientierung. Mit vermutlich nur einem Photopigment ist er zudem farbenblind. Dies wurde für den ML anderer Skorpionarten aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen vermutet (Geethabali und Rao 1973, Zwicky 1970 b) und stimmt mit meinen immunhistologischen Untersuchungen überein, bei denen auch nur das Blauzapfen-



Opsin die Rezeptorzellen markiert hat. Auch die retinalen Photorezeptorsysteme des Skorpions sind farbenblind (Fleissner 1968), genauso wie der nah verwandte *Limulus* (Herzog et al. 1996). Allerdings stammen die beschriebenen spektralen Reaktionen des ML von verschiedenen Skorpionarten extrazellulären Summenableitungen und stimmen nicht überein (Geethabali und Rao 1973; Zwicky 1970 b). Eine Beschreibung der spektralen Empfindlichkeit einzelner Rezeptorzellen, die diesen Unterschied bei den bisherigen Summenableitungen aufklären könnte, steht damit noch aus.

Das gleiche gilt für die Dynamik der Hell/Dunkel-Adaptation, die ebenfalls nur aufgrund von lichtinduzierten Potentialen der Konnektive beschrieben wurden und damit ein Ergebnis von ersten peripheren Filterprozessen sein können (Geethabali 1974, Geethabali und Rao 1973). Da aber diese Rezeptorzellen bisher unbekannt waren, war es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, von diesen Zellen einzeln intrazellulär abzuleiten. Durch meine Arbeit konnte nun die Lage des metasomalen Lichtsinns ziemlich genau umrissen werden, so dass es auch ohne spezifische Färbung möglich sein wird, diese noch ausstehenden Analysen vorzunehmen.

Bisher fehlen für den ML des Skorpions noch im TEM überprüfte Doppelfärbungen, die es ermöglichen die direkten Partner beim synaptischen Informationsaustausch zu kennzeichnen. Meine Untersuchungen haben allerdings gut fundierte Daten zur „Nähe“ von neuronalen Elementen gebracht.

Außerdem müssten weitere Serienschritte mit Immundoppelfärbungen gegen Enzyme der Phototransduktionskaskade untersucht werden, wie ich sie in dieser Arbeit angefertigt habe, um diese Präparate dann mit Doppelbelichtungen auf Kollokalisierungen der verschiedenen Enzyme zu überprüfen. In meinen Untersuchungen konnte ich nur Einfachbelichtungen zeigen, da in den angefertigten Präparaten mit den Doppelmarkierungen nur die eine oder andere Immunmarkierung gut gelungen ist. Von besonderem Interesse wäre hierbei eine Doppelmarkierung von Opsin und Gq, da dieses Photopigment und Enzym in den identischen Zellorganellen vorkommen. Aber gerade eine Doppelmarkierung dieser beiden Substanzen wird dadurch erschwert, dass die Antikörper in der gleichen Tierart



hergestellt wurden, also eine unterschiedliche Kennung über die Zweitantikörper erschwert.

Meine Spekulationen über die Rolle des metasomalen Lichtsinns beruhen derzeit auf Parallelbefunden an anderen Tieren und natürlich den anderen Photorezeptorsystemen des Skorpions sowie den gut analysierten Eigenschaften seines circadianen Uhrensystems. In Kombination mit den retinalen Photorezeptoren, den Median- und Lateraläugen dient dieser metasomale Photorezeptor wahrscheinlich dazu, in der natürlichen Umgebung sicher Lichtprogramme als Zeitgeber für das biologische Uhrensysteem zu identifizieren, und die phasenrichtige Positionierung von Verhaltensprogrammen zu überprüfen. Dies kann auf unterschiedlichen Eigenschaften beruhen:

Der metasomale Lichtsinn als photischer Zeitgeberrezeptor:

Dass ein Zusammenhang zwischen dem metasomalen Lichtsinn und dem photischen Zeitgeberrezeptorsystem besteht, lassen die Studien von Hanna et al. (1985) und von Renninger et al. (1997) vermuten. Sie fanden heraus, dass eine ausschließliche Beleuchtung des Schwanzes des Pfeilschwanzkrebsses *Limulus polyphemus* Phasenverschiebung im circadianen Rhythmus der ERG-Amplitude der lateralen Komplexäugen (Barlow et al. 1989) verursachen kann, unabhängig von den Phasenverschiebungen, die durch Belichtung des gesamten Tieres oder jeweils einzelner vorhandener Photorezeptoren hervorgerufen wurden. Beim Skorpion wirkt alleinige Belichtung des Metasomas nicht phasenverschiebend (Lüttgen 1993). Es wurden aber bisher keine Simulationen natürlicher Hell/Dunkel-Wechsel getestet.

Der metasomale Photorezeptor als Detektor von Zeitsignalen in der Dämmerung:

Ableitungen von dunkeladaptierten Skorpionen ließen nach adäquaten Lichtreizen auf den Schwanz "normale" und verzögerte Reaktionen erkennen (Geethabali 1974, Geethabali und Rao 1973), was zeigt, dass sie langsame und geringe Veränderungen des sie umgebenden Lichtes verarbeiten könnten. Geethabali hat auch berichtet, dass der ML schon nach wenigen Minuten bei Tageslicht nicht mehr auf Lichtpulse reagiert, sondern nur im unteren Helligkeitsbereich, wie er in der späten Abenddämmerung zur Verfügung steht. Diese Eigenschaft könnte den ML befähigen,



quasi ein Intensitätsfenster bereitzustellen, in dem Lichtreize als relevant für die Zeitgeberfunktion erkannt werden. Warum sollte sonst der Skorpion seine circadiane Uhr mit diesen schwachen Lichtern synchronisieren. Ein solches "Intensitätsfenster" könnte eine wichtige Ergänzung zu dem vermuteten Zeitfenster sein, das durch das reafferente Schaltmuster der circadianen Signalwege in den ersten optischen Ganglien der Medianaugen gebildet wird (Fleissner und Fleissner 1998, 2002; Friesen et al. 2001).

Auch bei manchen Spinnen sind z.T. zwei Typen von Photorezeptorzellen mit unterschiedlicher Sensitivität bekannt (Yamashita 2002). Unterschiedliche Augen einiger Spinnenarten reagieren verschieden auf die Steigerung oder den Abfall von efferenten Impulsfrequenzen (Yamashita 1990).

Der metasomale Lichtsinn als Modulator der retinalen Empfindlichkeit:

Bei Insekten wurde gezeigt, dass Licht auf Ocellen wahrscheinlich den sensorischen Schwellenwert der Komplexaugen moduliert (Goodman 1981). Beim *Limulus* verstärkt zusätzliches Licht auf das Metasoma die Sensitivität des circadianen Systems für photische Zeitgeberreize auf die Lateral - oder Medianaugen (Hanna et al. 1985). Ein ähnlicher Effekt mag für den ML des Skorpions gelten.

Der metasomale Lichtsinn als Filter für non-photische Zeitgeberreize:

Beim Skorpion konnte gezeigt werden, dass Lichtreize auf die Medianaugen Hyperaktivität auslösen können, die über einen nicht visuellen Weg den circadianen Rhythmus (serotonerge Bahnen ?) phasenverschieben können (Hohmann et al. 1990, Fleissner und Fleissner 1992). Die so abgeleitete "paradoxe Photo-PRC" (Phasenantwortkurve) unterscheidet sich von der normalen "Photo-PRCs" durch die Lage auf deren Zeitskala (Fleissner und Fleissner 1992, 2001 b). Ähnliche "Non-photoc"-PRCs wurden auch bei Hamstern (Mrosovsky 1995, Mrosovsky et al. 1992), Eichhörnchen (Hut et al. 1999) und Mäusen (Edgar 1993) gefunden und werden allgemein als Komponente zur Stabilisierung (Homöostase) der circadianen Phasenlage gedeutet. Lichtreize lösen beim Skorpion nur dann eine solche Arousalreaktion aus, wenn sie die Medianaugen treffen, nicht jedoch bei einer Licht-Stimulierung der Lateralaugen (Fleissner und Fleissner 2001 b). Es ist allerdings nicht berücksichtigt worden, ob dabei Belichtung des metasomalen Photorezeptors



eine Rolle spielt. Die caudalen Photorezeptoren der Krebse sind interessanterweise multimodal mit Mechanorezeptoren verschaltet (Bahar und Moss 2003). Allerdings sind diese Studien eher neurobiologisch auf Lernprozesse ausgerichtet, es fehlen hier adäquate Zeitgeberuntersuchungen.

Der metasomale Lichtsinn als möglicher lichtabhängiger "Slave-Oszillator":

Der extraretinale Photorezeptor im ML von *Paruroctonus mesaensis* scheint kein Unteroszillator für langfristige Entwicklungsprozesse zu sein, wie der cerebrale (in seiner Struktur unbekannt) Photorezeptor der Larven und Puppen von Nachtschmetterlingen (Truman 1972). Es gibt keine Hinweise darauf, dass der ML von *Paruroctonus mesaensis* ein eigenes Schrittmachersystem mit gesonderten Zeitgeberrezeptoren darstellt, wie verschiedene periphere Organsysteme der Insekten (z.B. Malpighigefäße: Hege et al. 1997, Testis: Gielbultowicz et al. 1989) oder die Prothorakaldrüse (Vafopoulou und Steel 1991, 1996). Auch der isolierte Schwanz der Crustaceen scheint zu eigenen circadianen Modulationen der Lichtempfindlichkeit der caudalen Photorezeptoren in der Lage zu sein (Prieto-Sagredo und Fanjul-Moles 2001).

Vergleichbare Versuche stehen beim Skorpion und auch den anderen Arachniden noch aus. Wenn der ML eigene Schrittmacherzellen enthielte, müsste weiter untersucht werden, ob die Schrittmacherzellen wie die BRNs (Basalretinal Neurons) der Mollusken (Block et al. 1982) selbst lichtempfindlich sind (Geusz und Page 1991, Geusz et al. 1997). Die feinstrukturellen Untersuchungen geben bisher keinerlei Hinweise darauf, dass der ML, wie Pinealocyten der Wirbeltiere (Korf 1994) oder die extraretinalen Photorezeptoren im optischen Lobus der Käfer (Fleissner et al. 1993), zusätzlich zu den axon gebundenen Signalen auch über neurosekretorische Signale (Fleissner et al. 1995) die Lichtinformation an den übrigen Organismus vermittelt.

Durch meine Befunde zu den strukturellen Korrelaten des metasomalen Lichtsinns des Skorpions haben sich neue Möglichkeiten für physiologische Untersuchungen zu den photischen und nicht-photischen Zeitgeberwirkungen auf den circadianen Schrittmacher und die neuronalen Bahnen der circadianen Kontrolle ergeben, die modellhaft auch auf die anderen bisher nicht bekannten oder wenig untersuchten extraretinalen Photorezeptorsysteme übertragen werden könnten.



VI. ZUSAMMENFASSUNG

Extraretinale Photorezeption im Bauchmark des Skorpions war seit mehr als 30 Jahren aus elektrophysiologischen und verhaltensbiologischen Untersuchungen bekannt. Von den zugehörigen Sinneszellen waren aber weder ihre Struktur und Lage noch ihre neuronale Verschaltung bekannt. Mit immunhistologischen und feinstrukturellen Untersuchungen konnten in dieser Arbeit in den letzten Abdominalganglien des Skorpions *Paruroctonus mesaensis* Zellgruppen identifiziert werden, die vermutlich das strukturelle Korrelat dieser extraretinalen Photorezeption, des metasomalen Lichtsinns (ML), sind. In meiner Arbeit konnten folgende Befunde erhoben werden:

Immunhistologische Erkenntnisse:

- In den metasomalen Ganglien des Skorpions gibt es wenige Zellen, die immunhistologisch mit Antikörpern gegen Proteine der Phototransduktionskaskade (Opsin, Transducin und Arrestin) reagieren.
- Der metasomale Lichtsinn ist kein geschlossenes Sinnesorgan sondern ist aus mehreren Zellclustern mit jeweils etwa 5-7 spindelförmigen kleinen Zellen zusammengesetzt.
- Diese ML-Zellgruppen sind bilateralsymmetrisch auf der Ventralseite der Ganglien jeweils an den Übergängen in die Konnektive angeordnet.
- Die Zellen sind - wie alle Invertebraten-Photorezeptoren - histaminerg. Ihre kurzen afferenten Axone enden ipsilateral im gleichen Ganglion auf ebenfalls histaminergen Intoneuronen, die bis in das Unterschlundganglion reichen.

Feinstrukturelle Erkenntnisse:

- Nach den bisherigen Untersuchungen haben alle ML-Zellen die gleiche Feinstruktur. Das Cytoplasma ist sehr reichhaltig mit Mitochondrien und rauhem endoplasmatischem Retikulum gefüllt, was erkennen lässt, dass diese Zellen hochaktiv sind. Sie haben kein Schirmpigment.
- Sie besitzen einen länglichen, häufig gelappten Zellkern mit viel Heterochromatin.
- Besonders charakteristisch für die ML-Zellen sind Lysosomen, die rhabdomere Abbauprodukte beinhalten. Diese Abbauprodukte verändern sich in Abhängigkeit vom Licht und unter der Kontrolle der inneren Uhr. Es lassen



sich die für Arthropodenaugen charakteristischen Abbaustufen für diese exogenen und endogenen Abbauvorgänge feststellen.

- An der apikalen Seite der potentiellen Photorezeptorzellen befinden sich lange rhabdomere Mikrovilli, die sich unregelmäßig um eine Lakune winden. Gemeinsam mit Nachbarzellen bilden diese Mikrovilli eine Haube, die von einer Kapsel umschlossen wird.
- Das andere Zellende setzt sich in ein kurzes Axon fort.
- Efferente Fasern innervieren die afferenten Endigungen der Rezeptorzellen nahe an ihren Terminalen.
- Als Besonderheit ist in den ML-Zellen eine einzelne intrazelluläre Cilie zu finden. Sie ist meist zwischen dem Zellkern und einem Golgi-Apparat lokalisiert.

Eine potentielle Funktion des Metasomalen Lichtsinns im Skorpion wird insbesondere im Zusammenhang mit der Perzeption natürlicher Zeitgeberreize durch den retinalen und extraretinalen Photorezeptorkomplex.



VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Arikawa, K. 1993. Valva-opening response induced by the light stimulation of the genital photoreceptors of male butterflies. *Naturwissenschaften* 80: 326-328.
- , und K. Aoki. 1982. Response characteristics and occurrence of extraocular photoreceptors on Lepidopteran genitalia. *J Comp Physiol A*. 148: 483-489.
- Autrum, H. J., M. F. Bennett, B. Diehn, K. Hamdorf, M. Heisenberg, M. Järvilehte, P. Kunze, R. Menzel, W. H. Miller, A. W. Snyder, D. G. Stavenga, M. Yoshida (eds) 1979. *Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates*, VII/6A: Invertebrate Photoreceptors. Springer, Berlin, Heidelberg New York.
- Autrum, H. J. 1981. Light and dark adaptation in invertebrates. In: H. J. Autrum, L. J. Goodman, J. B. Messenger, R. Wehner (eds.) *Comparative Physiology and evolution of vision in invertebrates. C: Invertebrate visual centers and behavior II*. Springer, Berlin. pp 1-91.
- Bahar, S., und F. Moss. 2003. Stochastic phase synchronization in the crayfish mechanoreceptor/photoreceptor system. *Chaos* 13: 138-144.
- Ball, H. J. 1965. Photosensitivity in the terminal abdominal ganglion of *Periplaneta americana* (L.). *J Insect Physiol* 11: 1311-5.
- . 1972. Photic entrainment of circadian activity rhythms by direct brain illumination in the cockroach *Blaberus craniifer*. *J Insect Physiol* 18: 2449-55.
- Barlow, R. B. Jr., S. C. Chamberlain, H. K. Lehman. 1989. Circadian rhythms in the invertebrate retina. In: D. G. Stavenga and R. C. Hardie (eds.) *Facets of vision*. Springer, Berlin, New York. pp 257-280.
- Battelle, B. A. 1991. Regulations and retinal functions by octopaminergic efferent neurons in *Limulus*. *Prog Retinal Res*. 10: 333-355.
- . 2002. Circadian efferent input to *Limulus* eyes: Anatomy, circuitry, and impact. *Micros Res Tech* 58: 345-55.
- , A. W. Andrews, B. G. Calman, J. R. Sellers, R. M. Greenberg, W. C. Smith. 1998. A myosin III from *Limulus* eyes is a clock-regulated phosphoprotein. *J Neurosci*. 18: 4548-59.
- , B. G. Calman, A. W. Andrews, F. D. Grieco, M. B. Mileziva, J. C. Callaway, A. E. Stuart. 1991. Histamine: a putative afferent neurotransmitter in *Limulus* eyes. *J Comp Neurol* 305: 327-342.



- , B. G. Calman und M. K. Hart. 1999. Cellular distributions and functions of histamine, octopamine and serotonin in the peripheral visual system, brain and circumesophageal ring of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Microscopy Res Tech* 44: 70-80.
- , A. Dabdoub, M. A. Malone, A. W. Andrews, C. Cacciatore, B. G. Calman, W. C. Smith, R. Payne. 2001. Immunocytochemical localization of opsin, visual arrestin, myosin III and calmodulin in *Limulus* lateral eye reticular cells and ventral photoreceptors. *J Comp Neurol* 435: 211-25.
- , C. D. Williams, J. L. Schremser-Berlin, C. Cacciatore. 2000. Regulations of arrestin mRNA levels: Seperate and combined of circadian efferent input and light. *Visual Neurosci* 17: 217-227.
- Bellonci, G. 1881. Sistema nervoso e organi dei sensi della Sphaeromaserratum. *Mem Accad Lincei* (3). 10: 91-104.
- Bernal-Moreno, J. A., M. Miranda-Anaya, M. L. Fanjul-Moles. 1996. Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination. *Res.* 27: 299-301.
- Block, G. D. und S. Wallace. 1982. Localization of a circadian pacemaker in the eye of a mollusc, *Bulla*. *Science* 217: 155-157.
- Borst, A. und M. Egelhaaf. 1994. Dendritic processing of synaptic information by sensory interneurons. *Trends Neurosci.* 17: 257-63.
- Bowerman, R. F. 1976. Ion concentrations and pH of the hemolymph of the scorpions *Hadrurus arizonensis* and *Paruroctonus mesaensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54 A: 331-333.
- Briscoe, A. D., G. D. Bernard, A. S. Szeto, L. M. Nagy, R. H. White. 2003. Not all butterfly eyes are created equal: rhodopsin absorption spectra, molecular identification, and localization of ultraviolet-, blue-, and green-sensitive rhodopsin-encoding mRNAs in the retina of *Vanessa cardui*. *J Comp Neurol.* 458: 334-49.
- Buhl, E. H. 1993. Intracellular injection in fixed slices in combination with neuroanatomical tracing techniques and electron microscopy to determine multisynaptic pathways in the brain. *Microsc Res Tech* 24: 15-30.
- Burkhardt, D. 1989. Die Welt mit anderen Augen. Wie Insekten und Vögel die Welt und ihre Farben sehen. *Biol. in unserer Zeit* 19: 37-46.
- Callaway, J. C. und A. E. Stuart. 1989. Biochemical and physiological evidendce that histamine is the transmitter of barnacle photoreceptors. *Visual Neurosci* 3: 311-325.



- Calman B. G., A. W. Andrews, H. M. Rissler, S. C. Edwards, B. A. Battelle. 1996. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and arrestin phosphorylation in *Limulus* eyes. *J Photochem Photobiol B*. 35: 33-44.
- Claridge-Chang, A. H. Wijnen, F Naef, C. Boothroyd, N. Rajewsky, M. W. Young. 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32: 657-71.
- Cooper, H. M., O. Dkhissi, B. Sicard, H. Groscarret. 1998. Light evoked C-Fos expression in the SCN is different under on/off and twilight conditions. In: Y. Touitou (ed.) *Biological clocks. Mechanisms and Applications*. Elsevier Science B.V., Paris - Amsterdam. pp 181-188.
- Cymborowski, B. und H. W. Korf. 1995. Immunocytochemical demonstration of S-antigen (arrestin) in the brain of the blowfly *Calliphora vicina*. *Cell Tissue Res*. 279: 109-114.
- Donoso, L. A., D. S. Gregerson, L. Smith, S. Robertson, V. Knospe, T. Vrabec, C. M. Kalsow. 1990. S-Antigen: preparation and characterization of site-specific monoclonal antibodies. *Current Eye Res*. 9: 343-355.
- Eakin, R. M. 1973. *The Third Eye*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Edgar, D. M., J. D. Miller, R. A. Prosser, R. R. Dean, W. C. Dement. 1993. Serotonin and the mammalian circadian system II. Phase-shifting rat behavioral Rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms*. 8: 17-31.
- Edwards, D. H. Jr. 1984. Crayfish extraretinal photoreception. I. Behavioural and motoneuronal responses to abdominal illumination. *J Exp Biol*. 109: 291-306.
- Eguchi, E. 1999. Membrane turnover of rhabdom. In: E. Eguchi and Y Tominaga (eds) *Atlas of arthropod sensory receptors*. Springer, Tokyo. pp 87-96.
- Elias, M. S. und P. D. Evans. 1983. Histamine in the insect nervous system: Distribution synthesis and metabolism. *J Neurochemistry*. 41: 562-568.
- . 1984. Autoradiographic localization of 3H-Histamine accumulation in the visual system of the locust. *Cell Tissue Res*. 238: 105-112.
- Elste, A., J. Koester, E. Shapiro, P. Panula, J. H. Schwartz. 1990. Identification of histaminergic neurons in *Aplysia*. *J Neurophysiol*. 64: 736-744.
- Fahrenbach, W. H. 1975. The Visual System of the Horseshoe Crab. *Intl Rev Cytol*. 41: 285-349.
- Farley, R. 2001. Structure, reproduction, and development. In: P. Brownell und G. Polis (eds.) *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, New York. pp 13-78.



- Fleissner, G. 1968. Untersuchungen zur Sehphysiologie der Skorpione. *Verh. DZG* 61: 375-380.
- . 1971. Über die Sehphysiologie von Skorpionen. PhD-Thesis. *Fachbereich Biologie*. Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- . 1974. Circadiane Adaptation und Schirmpigmentverlagerung in den Sehzellen der Medianaugen von *Androctonus australis* L. (Buthidae, Scorpiones). *J Comp Physiol*. 91: 399-416.
- . 1977 a. Differences in the physiological properties of the median and the lateral eyes and their possible meaning for the entrainment of the scorpion's circadian rhythm. *J Interdiscip Cycle Res*. 8: 15-26.
- . 1977 b. Scorpion lateral eyes: Extremely sensitive receptors of zeitgeber stimuli. *J Comp Physiol A*. 118: 101-108.
- Fleissner, G. und G. Fleissner. 1978. The optic nerve mediates the circadian pigment migration in the median eyes of the scorpion. *Comp Biochem Physiol*. 61 A: 69-71.
- . 1988. Efferent Control of Visual Sensitivity in Arthropod Eyes: With Emphasis on Circadian Rhythms. *Information Processing in Animals. Akademie der Wissenschaften und der Literatur*. 5: 1-67.
- . 1992. Feedback loops in the circadian system. In: M. Zatz (ed.) *FESN: Circadian Rhythms*. Elsevier, Amsterdam. pp 79-84.
- . 1998. Natural Zeitgeber stimuli. In: Y. Touitou (ed.) *Biological clocks - Mechanisms and Applications*. Elsevier Science, Amsterdam. pp 171-180.
- . 2001 a. Neuronal Organization of Circadian Systems. in G. Polis und . P. Brownell (ed.) *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, New York. pp 107-137.
- . 2001 b. The Scorpion's clock: Feedback mechanisms in circadian systems. In: P. Brownell und G. Polis (eds.) *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, New York. pp 138-158.
- . 2001 c. Night vision in desert scorpions. In: V. Fet und P. A. Selden (eds.) *Scorpions 2001*. Burnham Beeches, Bucks. pp 317-324.
- . 2002. Perception of natural Zeitgeber signals. In: V. Kumar (ed.) *Biological Rhythms*. Narosa Publishing House, New Delhi. pp 85-95.
- . 2003. Nonvisual photoreceptors in arthropods with emphasis on their putative role as receptors of natural Zeitgeber stimuli. *Chronobiol Int*. 20: 593-616.



- , und B. Frisch. 1993. A new type of putative non-visual photoreceptors in the optic lobe of beetles. *Cell Tissue Res.* 273: 435-45.
- , und S. Heinrichs. 1982. Neurosecretory cells in the circadian clock system of the scorpion, *Androctonus australis*. *Cell Tissue Res.* 224: 233-238.
- , und W. Hohmann. 1989. Locomotor activity inverses the phase shifting effect of light on the circadian system of scorpions. In: R. Elsner, J. Erber (eds.) *Neuronal mechanisms of behavior*. Thieme, Göttingen. pp 256.
- , R. Loesel, M. Waterkamp, O. Kleiner, A. Batschauer, U. Homberg. 2001. Candidates for extraocular photoreceptors in the cockroach suggest homology to the lamina and lobula organs in beetles. *J Com Neurol.* 433: 401-14.
- , und M. Schliwa. 1977. Neurosecretory fibres in the median eyes of the scorpion, *Androctonus australis* L. *Cell & Tissue Research.* 178: 189-198.
- , H. Vollhardt, A. Volz, V. Nink. 1995. Photoreceptive and endocrine compartments in the extraretinal photoreceptive organs in the beetle's optic lobe. In: R. Elsner, R. Menzel (eds.) *Learning and memory*. Thieme, Göttingen. pp 379.
- Foelix R. F. 1992. *Biologie der Spinnen*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Friesen, W. O., G. Fleissner, G. Fleissner. 2001. Role of feedback loops in the scorpion circadian system. *Neurocomputing.* 38-40: 607-614.
- Gao, N., M. v. Schantz, R. G. Foster, J. Hardie. 1999. The putative brain photoperiodic photoreceptors in the vetch aphid, *Megoura viciae*. *J Insect Physiol.* 45: 1011-1019.
- Garcia-Fernández, J. M., A. J. Jiménez, B. González, M. A. Pombal, R. G. Foster. 1997. An immunocytochemical study of encephalic photoreceptors in three species of lamprey. *Cell & Tissue Res.* 288: 267-278.
- Geethabali. 1974. Neurophysiological studies on the central nervous system of scorpion. PhD-Thesis, *Zoology*. Bangalore University, Bangalore, India.
- . 1976 a. Central course of photic input in the ventral nerve cord of scorpion (*Heterometrus fulvipes*). *Separatum Experienta* 32: 445-347.
- . 1976 b. Multimodal neurons in the central nervous system of scorpion. *Vignana Bharathi* 2: 93-96.
- . 1976 c. Motor Excitation with Reference to Neuronal Photoreception in Scorpion. *Life Science* 18: 1009-1012.
- . 1979. Distribution of photic units in the ventral nerve cord of scorpion. *Vignana Bharathi.* 5:36-38.



- . 1983. Neurophysiological studies on the central nervous system of scorpion with special reference to extraocular photoreception. *Continuing Medical Education Programme*; Neurological Society of India. pp 23-26.
- , und K. P. Rao. 1973. A metasomatic neural photoreceptor in the scorpion. *J Exp Biol.* 58: 189-96.
- Gehring, W. J. 2001. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Zoology.* 104: 171-183.
- Geusz, M. E. und T. L. Page. 1991. An opsin-based photopigment mediates phase shifts of the *Bulla* circadian pacemaker. *J Comp Physiol A.* 168: 565-70.
- Geusz, M. E., Foster, R. G., DeGrip, W. J., Block, G. D. 1997. Opsin-like immunoreactivity in the circadian pacemaker neurons and photoreceptors of the eye of the opisthobranch mollusc *Bulla gouldiana*. *Cell Tiss Res.* 287: 203-210.
- Gielbultowicz, J. M., J. G. Riemann, A. K. Raina, R. L. Ridgeway. 1989. Circadian system controlling release of sperm in the insect testes. *Science* 245: 1098-1100.
- Goodman, L. J. 1981. Organization and physiology of the insect dorsal ocellar system. In: H. J. Autrum, L. J. Goodman, J. B. Messenger, R. Wehner (eds.) *Comparative Physiology and evolution of vision in invertebrates. C: Invertebrate visual centers and behavior II.* Springer, Berlin. pp 201-286.
- Hagberg, M. 1986. Ultrastructure and central projections of extraocular photoreceptors in caddiesflies (Insecta, Trichoptera). *Cell Tissue Res.* 245: 634-648.
- Hama, K. 1961. A photoreceptor-like structure in the ventral cord of crayfish, *Cambarus virilis*. *Anat Rec.* 140: 329-336.
- Hanna, B. W. J., J. A. Horne, G. H. Renninger. 1988. Circadian photoreceptor organs in *Limulus* II. The telson. *J Comp Physiol A.* 162: 133-140.
- , E. Pinkhasov, G. H. Renninger, E. Kaplan, R. B. J. Barlow. 1985. The tail of *Limulus* contains photoreceptors that modulate a circadian clock. *Bio. Bull.* 169: 552.
- Hardie, R. C. 1987. Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? *J Comp Physiol A.* 161: 201-213.
- Hardie, R. C. 1989. A histamine-activated chlorid channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Natur.e* 339: 704-706.



- Hege, D. M., R. Stanewsky, J. C. Hall, J. M. Giebultowicz. 1997. Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: evidence for a brain-independent circadian clock. *J Biol Rhythms*. 12: 300-308.
- Herzog, E. D., M. K. Powers, R. B. J. Barlow. 1996. *Limulus* vision in the ocean day and night - effects of image size and contrast. *Neurosci* 13: 31-41.
- Hjelle, J. T. 1990. Anatomy and morphology. In: G. A. Polis (ed.) *The biology of scorpions*. Stanford University Press, Stanford. pp 9-63.
- Hofbauer, A., und E. Buchner. 1989. Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften*. 76: 335-336.
- Hohmann, W., S. Michel, G. Fleissner. 1990. The scorpion as a model for feedback mechanisms in a circadian system. *Verh Deutsche Zool Ges*. 1990: 647-648.
- Home, E. M. 1972. Centrioles and associated structures in the retinula cells of insect eyes. *Tiss Cell*. 4: 227-234.
- . 1975. The ultrastructural studies of development and light-dark adaptation of the eye of *Coccinella septempunctata* L., with particular reference to ciliary structures. *Tiss. & Cell*. 7: 703-722.
- . 1976. The fine structure of some carabid beetle eyes, with particular reference to ciliary structures in the retinula cells. *Tissue & Cell* 8: 311-33.
- Hut, R. A., N. Mrosovsky, S. Daan. 1999. Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms*. 14: 409-19.
- Ishay, J. S. und S. Kirshboim. 2000. Ultraviolet B light stimulates hornet activities - a review. *Semicond Sci Technol*. 15: 704-723.
- Iwasaki, M., T. Itoh, Y. Tominaga. 1999. Mechano- and phonoreceptors. In: E. Eguchi und Y. Tominaga (eds.) *Atlas of arthropod sensory receptors*. Springer, Tokyo. pp 177-190.
- Jacquín-Joly, E., M. C. François, M. Burnet, P. Lucas, F. Bourrat, R. Maida. 2002. Expression pattern in the antennae of a newly isolated lepidopteran Gq protein subunit cDNA. *Eur J Biochem*. 269: 2133-2142.
- Kaestner, A. 1940 Ordnung der Arachnida: Scorpiones. In W. Kükenthal und T. Krumbach (eds.) *Handbuch der Zoologie*, Band 3, Hälfte 2, Teil 1, Chelicerata. De Gruyter, Berlin. pp 117-240.
- Kennedy, D. 1958. Responses from the crayfish caudal photoreceptor. *Am. J Ophthal*. 46: 19-26.



- Korf, H. W. 1994. The pineal organ as a component of the biological clock: phylogenetic and ontogenetic considerations. *Ann NY Acad Sci.* 719: 13-42.
- Kristianpoller, N., O. Goldstein, L. Litinetsky, J. S. Ishay. 1995. Light curtails sleep in anesthetized hornets: Extraretinal light perception. *Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR.* 27: 193-201.
- Lockett, A. 2001. Eyes and vision. In: Brownell, P. Polis, G. (eds). *Scorpion Biology and Research.* New York: Oxford University Press. pp 79-106.
- Lüttgen, M. A. 1993. Entrainment der circadianen Laufrhythmik durch Lichtzeitgeber: Untersuchung relevanter Lichtparameter am Beispiel der Lokomotionsrhythmik von *Androctonus australis* (Scorpiones, Buthidae). PhD-Thesis. *Fachbereich Biologie.* Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Makita, T. 1982. Molecular organization of hepatocyte peroxisomes. *Int Rev Cytol.* 160: 303.
- McClintock, T. und B. W. Ache. 1989. Histamine directly gates a chlorid channel in lobster olfactory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 8137-8141.
- Meissl, H. und E. Dodt. 1981. Comparative physiology of pineal photoreceptor organs. *Develop Endocrinol.* 14: 61-80.
- Menaker, M. und A. Oksche. 1974. The avian pineal organ. In: D. S. K. Farner Jr und K.C. Parkes (eds.) *Avian Biology.* Academic Press. New York, London. pp 79-118.
- Messenger, J. B. 1981. Comparative physiology of vision in molluscs. In: H. J. Autrum, L. J. Goodman, J. B. Messenger, R. Wehner (eds.) *Comparative Physiology and evolution of vision in invertebrates. C: Invertebrate visual centers and behavior II.* Springer, Berlin. pp 93-200.
- Miyako, Y., K. Arikawa, E. Eguchi. 1993. Ultrastructure of the extraocular photoreceptor in the genitalia of a butterfly, *Papilio xuthus*. *J Comp Neurol.* 327: 458-468.
- Mrosovsky, N. 1995. A non-photoc gateway to the circadian clock of hamsters. Pages 154-77. *Circadian Clocks and Their Adjustments.* Wiley, Chichester, U.K.
- Mrosovsky, N., P. A. Salmon, M. Menaker, M. R. Ralph. 1992. Non-photoc phase shifting in hamster clock mutants. *J Biol Rhythms.* 7: 41-49.
- Müller, J. 1970. Feinbau und Dunkelanpassung der Komplexaugen von *Rhodnius prolixus*. *Zoo. Jb (Abt. Allg. Zool. Physiol.).* 75: 111-133.



- Munger, S. D., J. L. Schremser-Berlin, C. M. Brink, B. A. Battelle. 1997. Molecular and immunological characterization of a G_q protein from ventral and lateral eyes of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Invert Neurosci.* 2: 175-182.
- Nässel, D. R. 1991. Neurotransmitters and Neuromodulators in the Insect Visual System. *Prog Neurobiol.* 37: 179-254.
- Nässel, D. R., M. H. Holmquist, R. C. Hardie, R. Hökanson, F. Sundler. 1988. Histamine-like immunoreactivity in photoreceptors of the compound eyes and ocelli of the flies, *Calliphora erythrocephala* and *Musca domestica*. *Cell Tiss. Res.* 253: 639-646.
- Nelson, D. E. und J. S. Takahashi. 1991. Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol.* 439: 115-145.
- Neuweiler, G. 2003. Neuro und Sinnesphysiologie. In: G. Heldmaier und G. Neuweiler (eds). *Vergleichende Tierphysiologie Band 1* Springer, Berlin. pp 333-356.
- Nultsch, W. und A. Grahle. 1968. *Mikroskopisch-Botanisches Praktikum*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Oksche, A. 1984. Evolution of the pineal complex: correlation of structure and function. *Ophthalmic Res* 16: 88-95.
- Ozaki, M. und Y. Tominaga. 1999. Contact chemoreceptors. In: E. Eguchi und Y. Tominaga (eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp 143-154.
- Page, T. L. 2001. Circadian system of invertebrates. In: J. Takahashi, F. Turek, F. Moore, R. Y. Moore (eds.) *Hb. Behav Neurobiol: Circadian Clocks*. Vol. 12. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ. pp 79-110.
- Pirvola, U., L. Tuomisto, A. Yamatodani, P. Panula. 1988. Distribution of histamine in the cockroach brain and visual system: an immunocytochemical and biochemical study. *J Comp Neurol.* 276: 514-526.
- Plattner, H. und J. Hentschel. 1997. *Taschenlehrbuch Zellbiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Polis, G. A. (ed.) 1990. *The biology of scorpions*. Stanford University Press, Stanford.
- Polis, G. A. und W. D. Sissom. 1990. Life history. In: G. A. Polis (ed.) *The Biology of Scorpions*. Stanford University Press, Stanford. pp 161-223.
- Pollack, I. und A. Hofbauer. 1991. Histamine-like immunoreactivity in the visual system and brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss Res.* 266: 391-398.



- Pophof, B. und W. Van der Goes van Naters. 2002. Activation and inhibition of the transduction process in silkworm olfactory receptor neurons. *Chem Senses*. 27: 435-43.
- Porter, J. A., M. Yu, S. K. Doberstein, T. D. Pollard, C. Montell. 1993. Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINA C unconventional myosin. *Science*. 262: 1038-42.
- Prieto-Sagredo, J. und M. L. Fanjul-Moles. 2001. Spontaneous and light-evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations. *Chronobiol Int*. 18: 759-65.
- Prell, G. D. und J. P. Green. 1986. Histamine as a neuroregulator. *Ann Rev Neurosci*. 9: 209-254.
- Prosser, C. L. 1934. Action potentials in the nervous system of the crayfish. II. Response to illumination of the eye and the caudal ganglion. *J Cell Comp Physiol*. 4: 363-377.
- Renninger, G., C. Lajoie, B. W. J. Hanna, D. Fong, C. House, J. Zelin. 1997. Phase-shifting and entrainment of a circadian rhythm in *Limulus polyphemus* by ocular and extraocular photoreceptors. *Biol Rhythms Res*. 28: 50-68.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron-microscopy. *J Cell Biol*. 17: 208-212.
- Richard, E. A., S. Gosh, J. M. Lowenstein, J. E. Lisman. 1997. Ca²⁺/calmodulin-binding peptides block phototransduction in *Limulus* ventral photoreceptors: Evidence for direct inhibition of phospholipase C. *Proc Natl Aca Sci (USA) (Neurobiol)*. 94: 14095-14099.
- Rodriguez-Sosa, L., A. Picones, G. Calderon-Rosete, S. Islas, H. Arechiga. 1997. Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eye-stalk. *J Exp Biol*. 200: 3067-3077.
- Rodriguez-Sosa, L., M. T. de la Vega, P. Vergara, and H. Arechiga. 1997. Seasonal rhythm of red pigment concentrating hormone in the crayfish. *Chronobiol Int*. 14: 639-45.
- Röhlich, P., B. Aros und S. Virágh. 1970. Fine structure of photoreceptor cells in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Z. Zellforsch*. 104: 345-57.
- Sacunas, R. B., M. O. Papuga, M. A. Malone, A. C. J. Pearson, M. Marjanovic, D. G. Stroepe, W. W. Weiner, S. C. Chamberlain, B. A. Battelle. 2002. Multiple mechanisms of rhabdom shedding in the lateral eye of *Limulus polyphemus*. *J Comp Neurol*. 449: 26-42.



- Sandeman, D. C., R. E. Sandeman, H. G. Couet. 1990. Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish, *Cherax destructor*. *J Neurobiol.* 21: 619-629.
- Sarthy, P. V. 1991. Histamine - a neurotransmitter candidate for Drosophila Photoreceptors. *J Neurochemistry.* 57: 1757-1786.
- Sasagawa, H., R. Narita, Y. Kitagawa, T. Kadowaki. 2003. The expression of genes encoding visual components is regulated by a circadian clock, light environment and age in the honey bee (*Apis mellifera*). *Eur J Neurosci.* 17: 963-970.
- Schlemmermeyer, E., M. Schutte, J. Ammermuller. 1989. Immunohistochemical and electrophysiological evidence that locust ocellar photoreceptors contain and release histamine. *Neurosci Lett.* 99: 73-78.
- Schliwa, M. und G. Fleissner. 1980. The lateral eyes of the scorpion, *Androctonus australis*. *Cell Tissue Res.* 206: 95-114.
- Schuchardt, K., G. Fleissner, G. Fleissner. 2002. Histological Immunocytochemical evidence for a metasomal light sense in scorpions. In: *Eighth Meeting Society for Research on Biological Rhythms, Abstracts*, Jacksonville, FL. pp 152.
- Schwemer, J. 1986. Turnover of photoreceptor membrane and visual pigment in invertebrates. In: H. Stieve (ed.) *The molecular mechanism of photoreception Dahlem Konferenzen*. Springer, Berlin. pp 303-326.
- , und U. Henning. 1984. Morphological correlates of visual pigment turnover in photoreceptors of the fly, *Calliphora erythrocephala*. *Cell Tissue Res.* 236: 293-303.
- Shaw, S. R. 1978. The extracellular space and blood-brain barrier in an insect retina: an ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 188: 35-61.
- Simmons, P. J. und R. C. Hardie. 1988. Evidence that histamine is a neurotransmitter of photoreceptors in the locust ocellus. *J Exp Biol.* 138: 205-219.
- Sissom, W. D. 1988. *Typhlochactas mitchelli*, a new species of eyeless, mountain forest litter scorpion from northeastern Oaxaca, Mexico (Chactidae, Superstitioninae, Typhlochactini). *J Arachnol.* 16: 365-371.
- Sissom, W. D. und J. C. Cokendolpher. 1998. A new troglobitic scorpion of the genus *Typhlochactas* (Superstitionidae) from Veracruz, Mexico. *J. Arachnol.* 26: 285-290.
- Smith, W. C., R. M. Greenberg, B. G. Calman, M. M. Hendrix, L. Hutchinson, L. A. Donoso, B. A. Battelle. 1995. Isolation and expression of an arrestin cDNA from the horseshoe crab lateral eye. *J Neurochem.* 64: 1-13.



- Steinbrecht, R. A. 1999. Olfactory receptors. In: E. Eguchi und Y. Tominaga (eds.) *Atlas of Arthropod sensory receptors*. Springer, Tokyo. pp 155-176.
- Strausfeld, N. J. und U. K. Bassemir. 1985. The organization of giant horizontal-motion-sensitive neurons and their synaptic relationships in the lateral deutocerebrum of *Calliphora erythrocephala* and *Musca domestica*. *Cell Tiss Res.* 242: 531 - 550.
- Stuart, A. E. 1999. From fruit flies to barnacles, histamine is the neurotransmitter of arthropod photoreceptors. *Neuron.* 22: 431-433.
- Taketomi, Y., M. Miyawaki, Y. Katakura. 1992. Endocrine systems of crustacea. In: A. Matsumoto und S. Ishii (eds.) *Atlas of endocrine organs - vertebrates and invertebrates*. Springer, Tokyo. pp 207-226.
- Terakita, A., H. Takahama, T. Hariyama, T. Suzuki, Y. Tsukahara. 1998. Light-regulated localization of the beta-subunit of Gq-type G-Protein in the crayfish photoreceptors. *J Comp Phys A.* 183: 411-417.
- Truman, J. W. 1972. Physiology of insect rhythms. II. The silkworm brain as the location of the biological clock controlling eclosion. *J Comp Physiol.* 81: 99-114.
- Ude, J. und M. Koch. 1982. *Die Zelle - Atlas der Ultrastruktur*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Vafopoulou, X., und C. G. H. Steel. 1991. Circadian Regulation of Synthesis of Ecdysteroids by Prothoracic Glands of the Insect *Rhodnius prolixus*: Evidence of a Dual Oscillator System. *Gen. Comp Endocrinol.* 83: 27-34.
- . 1996. Circadian regulation of a daily rhythm of release of prothoracicotropic hormone from the brain-retrocerebral complex of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) during larval-adult development. *Gen Comp Endocrinol.* 102: 123-129.
- Waterkamp, M., G. Fleissner, M. Thomas, G. Fleissner. 1998. Fine-structural differences between the two types of extraretinal photoreceptors in the Tenebrionid beetle, *Zophobas atratus (morio)* (A) The stemmata. In: N. Elsner und R. Wehner (eds.) *Proc. 26th Göttingen Neurobiol. Conf.* 1998. pp 392.
- Wilkins, L. A. und J. L. Larimer. 1972. The CNS photoreceptors of crayfish: Morphology and synaptic activity. *J Comp Physiol.* 80: 389-407.
- Wikgreen, M. M. Reuter, M. K. S. Gustafsson, P. Lindroos. 1990. Immunocytochemical localization of histamine in flatworms. *Cell Tissue Res.* 260: 479-484.
- Yamashita, S. 1990. Efferent optic nerve impulses in response to illumination of single eyes of orb weaving spiders. *Vis Res.* 30: 817-821.



- Yamashita, H. 2002. Efferent innervation of photoreceptors in spiders. *Mic. Res. Techn.* 58: 356-364.
- Yasuyama, K. und I. A. Meinertzhagen. 1999. Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 412: 193-202.
- Yoshida, M. 1979. Extraocular photoreception. In: Autrum, H.J., M.F. Bennett, B. Diehn, K. Hamdorf, M. Heisenberg, M. Järvilehte, P. Kunze, R. Menzel, W. H. Miller, A. W. Snyder, D. G. Stavenga, M. Yoshida (eds.) *Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates, VII/6A: Invertebrate Photoreceptors*. Springer, Berlin, Heidelberg New York. pp 581-640.
- Zuker, C. 1994. On the evolution of eyes: Would you like it simple or compound. *Science.* 265: 742.
- Zwicky, K. T. 1968. A light response in the tail of *Urodacus*, a scorpion. *Life Sci.* 7: 257-262.
- . 1970 a. Behavioral aspects of the extraocular light sense of *Urodacus*, a scorpion. *Experientia.* 26: 747-748.
- . 1970 b. The spectral sensitivity of the tail of *Urodacus*, a Scorpion. *Experientia.* 26: 317.



I. REZEPTSAMMLUNG

I.1 Chemikalien

(Bezugsquellen der Chemikalien siehe Anhang II)

A) RINGER

Skorpionringer (Bowerman 1976)

14,0 g NaCl
0,11 g KCl
0,5 g CaCl₂
0,2 g MgCl₂
10 ml Konzentrat:
90 ml Aqua bidest.
1 g Glucose

B) PUFFER

Natrium-Cacodylatpuffer

0,08 M mit pH 7,2 und einer Osmolarität von 150 m
100 ml 0,16 M Cacodylatpuffer (Na(CH₃)₂AsO₂·3H₂O)
8,3 ml 0,1 N HCL
91,7 ml H₂O Aqua bidest.

PB (Phosphat Buffer)

4,32 g KH₂PO₄
23,12 g Na₂HPO₄
in 2 l H₂O

PBS (Phosphat Buffer Saline) a

0,01 M mit pH 7,4
28,04 g Na₂HPO₄ x H₂O
5,244 g NaH₂PO₄ x H₂O
18,00 g NaCl
in 2 Liter Aqua bidest.

PBS (Phosphat Buffer Saline) b

0,1 M mit pH 7,4
21,71 g Na₂HPO₄ x H₂O
2,62 g NaH₂PO₄ x H₂O
in 1 l Aqua bidest.

PBS mit Triton X 100

0,25% Triton in PBS

Tris

Trishydroxymethan

24,23 g pro Liter

in 500 ml Aqua bidest. lösen

mit konz. HCl den pH-Wert einstellen auf 7,6

mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen

1l 0,05 M Tris:

250 ml 0,2 M Trispuffer

750 ml Aqua bidest

Triton TBS 0,4% X 100

1l TBS

4 ml Triton X 100

TBS (Tris Buffer Saline)

pH 7,5

29 g NaCl (500 mM)

2,4 g Tris

800 ml der 500 mMolaren NaCl-Lösung

pH mit konzentrierter HCl auf 7,5 einstellen

*C) FIXATIVE*4% Paraformaldehyd (PFA)

70 ml Aqua bidest. auf 55-60°C erhitzen

4g PFA (Pulver) zugeben, unter Rühren etwa 2min lösen

mit NaOH aufklären

+ 30 ml PBS

in 0,1 M Phosphatpuffer rühren, bis PFA vollständig gelöst ist

mit 1 M NaOH den pH auf 7,4 bringen

Glutaraldehydfixierung

3% Glutaraldehyd in

0,08 M Cacodylatpuffer pH 7,2

+ 3,4% Saccharose 6h oder über Nacht

Beispiel für 8 ml:

7 ml 0,08 M Cacodylatpuffer

0,272 g Saccharose

1 ml 25% Glutaraldehyd (960 µl)



Carbodiimidfixierung

4% Carbodiimid
in 0,1 M PB
p.H 7,4

Carnoy'sches Fixierungsgemisch

Abs. Äthanol	:	Chloroform	:	Eisessig
6	:	3	:	1

Methanolfixativ nach Battelle

9 ml 80% Methanol + 1 ml 37% Formaldehyd

Rehydrierung für die Methanolfixierung nach Battelle

je 2 x 5' bei Raumtemperatur in:

ml 100% Methanol : ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2)

30	20
25	25
12,5	37,5
0	50

D) FÄRBUNGEN UND KONTRASTIERUNG

Methylenblaufärbung

0,5% Methylenblau in 1% Borax 1B429 Methylenblau Di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Borax) unter Mikroskopkontrolle auf der Heizplatte bei 70° C färben

Kontrastierung fürs EM

Während der Entwässerung kann Kontrastieren am ganzen Block erfolgen:
Blockstaining = 1g Uranylacetat in 70ml Ethanol p.a.

1 g Uranylacetat in ml Ethanol p.a.
bei 50°C lösen
danach 30 ml Aqua bidest dazu geben
dunkel aufbewahren bei 4°C
Kontrastierung 45min bei 40°C
danach 2-3 x spülen in 70% Ethanol

E) BESCHICHTUNG UND EINBETTUNG

Pioloform (1%)

1 g Pioloform in 100 ml Chloroform lösen.
Die Lösung ist lichtempfindlich und kann für mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden.

Aralditmischung

50 ml Araldit

50 ml Araldit-Härter

5 ml Phthalsäuredibutylester (Dibutylphthalat, DBP)

1,5 ml 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30)

Die Substanzen werden der Reihenfolge entsprechend miteinander vermengt und in Einmalspritzen abgefüllt. Das Gemisch kann bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden

PDE = phenylenediamine

P-phenylenediamine (PED)

frisch 1 ml 60% Glycerol und 2-3 PED Kristalle

Gelatinebeschichtete Objektträger

(L.W. Swanson (1992) Brain maps: Structure of the rat brain. Elsevier Amsterdam – London – New York – Tokyo)

- neue Objektträger in heissem Wasser mit Detergenz mindestens 30' reinigen (besser über Nacht)
- unter fließendem heissen Wasser (ca. 30') spülen bis das Detergenz vollständig entfernt ist
- in destilliertem Wasser spülen (ca. 30', Wasser mehrmals wechseln)
- unter staubfreien Bedingungen das Wasser von den Objektträgern ablaufen lassen und die gereinigten Objektträger für 2' in die Gelatinelösung eintauchen
- beschichtete Objektträger in staubfreier Umgebung trocknen (evtl. im Wärmeschrank bei $30-50^{\circ}\text{C}$)
- beschichtete Objektträger kühl und staubfrei lagern

*F) ABLAUFPROTOKOLLE DER FÄRBUNGEN*Anti-Arrestin- und Opsin-Immunmarkierungen an Paraffinschnitten

Schnitte entparaffinieren: Rotihistol II (10'), Rotihistol II (10') Alkohol I 10', Alkohol II 10', 96% 5', 90% 5', 70% 5', PBS 0,01 mol ($7,2-7,4$ pH)

	Zeit	Temp.
Block. der endog. Perox.: 0,03% H_2O_2 (200 ml 0,01 M PBS + 2 ml 30% H_2O_2)	15'	RT
2 x spülen in 0,01 M PBS	2 x 10'	
1 x spülen in PBS + 0,25% Triton 100	10'	
Präinkubation: 3% NGS: (Objektträger á 200 Mm Lösung) –10 Objektträger= 4 ml Verd. + 120 μl NGS (PBS + Triton) + BSA (0,05-0,1%) + NGS	1h	RT
1. AK: PBS (+Triton) + 1% normal Serum (NGS) + BSA (0,05-0,1%)	über Nacht	RT
3 x spülen in: 0,01 M PBS + Triton	3 x 10'	
2. AK: goat-anti-rabbit 1:200 + 1.5% normal Serum + Verdünnung (PBS + Triton + BSA) 4 ml Verd. + 20 μl AK + 60 μl NGS	30' (30'-60')	RT



3 x spülen in: PBS (letztes Spülen mit etwas PBS/Triton)	10'	
ABC Serum: A + B 1:50 in 0.01M PBS (mindestens 30' vorher ansetzen) 4 ml PBS + 80 µl A + 80 µl B, gut rühren	45' (30'-60')	RT
2 x spülen in 0.01 M PBS	2 x 10'	
1 x spülen in 0.05 M Tris/HCl pH 7,6	3 x 10'	
DAB Reaktion: Konzentration H ₂ O ₂ 0,009% + DAB 10 mg (2 Tabletten) auf 80 ml Tris ≅ 0,025% 2 Tabletten + 80 ml Tris + 240µml (4,5ml Bidest + 500µl H ₂ O ₂ in Schnappdeckelgläschen + schütteln) rühren + filtrieren	je 6'	RT
1 x spülen in 0,05 Tris (1 Teil Tris (Stammlösung 0,2 M Tris) + 3 Teile Aqua bidest.) pH-7,6 (maximale Aktivität der Peroxidase)	10'	
Alkoholreihe ↑ 70% 90% 96% à 3', 2 x 100% 5-10', 2 x Rothihistol	10'	
Fixierung: 4% PFA		
Einbettung: Paraplast		
Schnittdicke: 10 µm		
eindeckeln in: Entellan		

Anti-Histaminimmunmarkierungen an Paraffinschnitten

Schnitte entparaffinieren: Rotihistol I (10'), Rotihistol II (10') Alkohol I 10', Alkohol II 10' 96% 5', 90% 5', 70% 5', PBS 0,01 mol (7,2-7,4 pH).

	Zeit	Temp.
Block. der endog. Perox.: 0,03% H ₂ O ₂ (200 ml Aqua bidest./200 ml 30% H ₂ O ₂)	40'	27°C
2 x spülen in 0,01 M PBS		
Präinkubation: 3% NGS: 1,6 ml Verd. + 42 ml NGS	1h	RT
1. AK: 1:15 000 rb-a-Hist. (1:10)+ 1% normal Serum 3 ml Verd. + 2 ml a-Hist + 30µl NGS	Über Nacht	RT
3 x spülen in: 0,01 M PBS + Triton		
2. AK: goat-a-rabbit 1:200 + 1.5% normal Serum: 1,6 ml + 8 µl anty-rabbit-Antikörper + 24 µ. NGS	30'	RT
3 x spülen in: PBS	1h	
ABC Serum: A + B 1:50 in 0.01 M PBS (mindestens 30' vorher ansetzen)	45'	RT
2 x spülen in 0.01 M PBS		
1 x spülen in 0.05 M Tris/HCl pH 7,6		
DAB Reaktion: Konzentration DAB 0.05 L H ₂ O ₂ 0.009 L	2' 30"	Zu kurz
eindeckeln in: Entellan		
Fixierung: 4% Carbodiimid		
Einbettung: Paraplast		
Schnittdicke: 10 µm		

Rezept für Antikörperfärbung nach Battelle

	Zeit	Temp.
einzelne Schnitte mit einem PAP-Stift umkreisen		RT
spülen in TBS (Tris Buffered Saline) pH 7.6, 50 mM (1.05M)	3x5'	
0.4% Triton X 100 in TBS	15'	RT



spülen in TBS	3 x 5'	
Blockung mit 10% NGS, 1,82% Lysine in TBS	60'	RT
spülen mit TBS	5'	
Antikörper in einer Feuchtkammer (Verdünnt mit 0.1% Triton X, 1% NGS in TBS)	über Nacht	4°C
spülen mit TBS	3 x 5'	
sekundären Antikörper (im Dunkeln halten) [sekundären AK = FITC goat anti-mouse Ig in 0.1% Triton x, 1% NGS in TBS (1=50 Verdünnung)]	60'	RT
spülen mit TBS	3 x 5'	
Eindeckeln mit 60% Glycerol PDE		RT

Wholemount Immunfärbungen der metasomalen Ganglien

	Zeit	Temp.
Inkubation in 0.2% Triton X 100 in TBS	1h	
spülen in TBS	3 x 5'	
Block in Standardblock	1h	
1 x spülen in TBS		
Inkubation mit dem 1. Antikörper	über Nacht	
spülen in: a) TBS b) TBS c) Antikörperverdünnung(ssubstanz)	3 x 30'	
Sekundären Antikörper in Antikörperinkubationsmedium geben	2h	RT
spülen in TBS	3 x 30'	

Vorgehensweise für Immunfärbungen an Paraffinschnitten

	Zeit	Temp.
Präparation		
fixieren		
entwässern 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 2 x 100%	je nach Größe 5-10'	
einbetten in Paraffin		
schneiden		
auf beschichtete Objektträger auftragen		
Schnitte etwas befeuchten und dann positionieren / strecken		Wärmeplatte
entparaffinieren		
Rotihistol	2 x 15'	
Äthanol 100%	5-10'	
95%, 90%, 70%	je 5-20'	
Triton TBS	2 x 5'	
spülen		



- Pinzette und Nadel in 3 Wägeschälchen gießen
- Entwässertes Objekt in Rothihistol eintauchen 2 x 15min
- Objekt durch das 1. paraffingefüllte Wägeschälchen schwenken 20min
- Objekt durch das 2. paraffingefüllte Wägeschälchen schwenken 20min
- Objekt im 3. Wägeschälchen gut positionieren
- Wägeschälchen im Kühlschrank erkalten lassen
- Paraffin aus dem Wägeschälchen herausnehmen
- Paraffinblock zurechtrimmen
- Paraffinblock auf einem Holzblock mit heissem Paraffin festschmelzen

Protokoll für EM-Fixativ- und Einbettung von neuronalem Gewebe für

Semidünnschnitte

- in EM Fixativ mindestens 6h oder über Nacht
- spülen in 0,1 M Cac. Puffer + 3,4% Sacch. 30min, mehrfach wechseln
- nachfixieren in 2% O_5O_4 in Cacodylatpuffer + Saccharose
- mehrfach spülen in Cacodylatpuffer + Saccharose = mindestens 20min, mehrfach wechseln
- entwässern 50%, 70% (eventuell Blockstaining-siehe Rezept), 80%, 90%, 96% Alkohol 2 x 10min
100% Ethanol 2 x 10min
- Propylenoxid 2 x 15'
- Gemisch Propylenoxid-Araldit 1:1 über Nacht
- 2 x reines Araldit je 1h
- (eventuell 1 x im Excikkator)
- (eventuell 1 x ohne Excikkator bei 40°C)
- auspolymerisieren bei 58°C ca. 48h



I.2 Verwendung der Antikörper

Antikörper		Aus	Verdünnung in Schnitt	Verdünnung in Whole mount	Fixativ	Quelle
Limulus Opsin	poly	rabbit	1:500	1:500	Methanolfix	Battelle ¹
Limulus Arrestin	mono	mouse	1 :50	1:50	Methanolfix	Battelle ²
Limulus Myosin	poly	rabbit	1:2000	-	Methanolfix	Battelle ³
G _{αq} /11	poly	rabbit	1:500	1:500	Methanolfix	Santa Cruz Biotechnology
Calmodulin	mono	mouse	1:1000	1:1000	Methanolfix	Battelle
MPI Opsin	poly	rabbit	1:5000	1:1000	Methanolfix	Peichel ⁴
MPI Opsin	poly	rabbit	1:5000	1:1000	4% PFA	Peichel
Histamin	poly	rabbit	1:1000 /15.000	-	Carbodiimid	Delichon
Glutamat	poly	rabbit	1:20000		4% PFA	Sigma
Arrestin	mono	rabbit	1:50		Donoso / 4% PFA	Donoso
anti mouse gekoppelt an FITC		goat	1:25	1:25	Methanolfix	Jackson Immuno Research Labs
anti rabbit gekoppelt an FITC		goat	1:25	1:25	Methanolfix	Jackson Immuno Research Labs
anti mouse gekoppelt an TRITC		goat	1:25	1:25	Methanolfix	Chemicon
anti rabbit gekoppelt an TRITC		goat	1:25	1:25	Methanolfix	Chemicon

¹ siehe Smith et al. 1993 und Batelle et al. 2001

² siehe Batelle et al. 2000, Batelle et al. 2001, Smith et al. 1995 und Calman et al. 1996

³ siehe Batelle et al. 1998 und Batelle et al. 2001

⁴ hergestellt von Jeremy Nathan / John Hopkins University, Baltimore



II. VERWENDETE CHEMIKALIEN MIT QUELLENANGABE

Substanz	Produktname	Seriennummer	Quelle
ABC-Lösung	Vectastain Elite ABC-Kit	PK-6100	Vector Laboratories
Araldit	CY 212	13824	Serva
Araldit	DDSA (Dodecenylsuccinic-acid anhydride)	20755	Serva
Araldit	DMP (2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol)	36975	Serva
Araldit	Phthalic acid dibuthylester	32805	Serva
BSA	Rinderserumalbumin	A3350	Sigma
Blei(II)-nitrat		15335	Fluka
Chromalaun	Kaliumchrom (III)-sulfat	60152	Fluka
DAB	3,3''-Diaminobenzidinetetrahydrochlorid	D5905	Sigma
Entellan		1.07961	Merck
Glutaraldehyd	25%	G5882	Sigma
H ₂ O ₂	Perhydrol, 30%, p.a.	1.07209	Merck
Methylenblau		1B 429	Chroma
NaCl	Natriumchlorid	3951,1	Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	71638	Fluka
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natrium-dihydrogenphosphat-monohydrat	22,35 3-2	Aldrich
NaOH	Natriumlauge	71690	Fluka
Normal Serum	Normal Rabbit Serum	S 5000	Vector Laboratories
Normal Serum	Normal Goat Serum	S 1000	Vector Laboratories
Normal Serum	Normal Horse Serum	S 2000	Vector Laboratories
Normal Serum	Normal Goat Serum	6-6767	Sigma
OsO ₄	Osmiumtetroxyd	R 1017	Plano
Paraffinersatz	Paraplast	P3683	Sigma
PFA	Paraformaldehyd	4005	Merck
Pioloform		R1275	Plano
Propylenoxid		82320	Fluka
Rotihistol		6640	Roth
Saponin		S-2149	Sigma
Tissue TEK		4583	Miles
tri-Natrium-Citrat-2-hydrat	p.a.	A 65648	Merck
Uranylacetat		R 1260A	Plano



III. ANTIKÖRPERLISTE

A) Primärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Produktname, -charakter</u>	<u>Seriennummer</u>	<u>Quelle</u>
Anti Glutamat	polyklonal aus Kaninchen	G-6642	Sigma
Anti Arrestin Limulus	monoklonal aus Maus		Battelle ⁵
Anti Opsin Limulus	polyklonal aus Kaninchen		Battelle ⁶
Anti Blauzapfen Opsin	polyklonal aus Kaninchen	JH-455	Peichl ⁷ MPI Frankfurt
Anti G_{αq}	polyklonal aus Kaninchen	C-19	Santa Cruz Biotechnology
Anti Myosin	polyklonal aus Kaninchen	T31109 AAAC16332	Batelle ⁸
Anti Histamin	polyklonal aus Kaninchen	2121C	Delichon

B) Sekundärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Produktname, -charakter</u>	<u>Seriennummer</u>	<u>Quelle</u>
anti-Kaninchen IgG, biotinylierte Antikörper	anti goat aus Kaninchen	BA 5000	Vectastain
anti-Kaninchen IgG, biotinylierte Antikörper	anti mouse aus Pferd	BA 2000	Vectastain
anti-Kaninchen IgG, biotinylierte Antikörper	anti rabbit aus Ziege	BA 1000	Vectastain
anti-Kaninchen IgG, biotinylierte Antikörper	anti goat aus Kaninchen	BA 4000	Vectastain
anti mouse aus Ziege gekoppelt an TRITC ⁹			Chemicon
anti rabbit aus Ziege gekoppelt an FITC			Jackson Immuno Research Labs

⁵ siehe Batelle et al. 2000, Batelle et al. 2001, Smith et al. 1995 und Calman et al. 1996

⁶ siehe Smith et al. 1993 und Batelle et al. 2001

⁷ hergestellt von Jeremy Nathan / John Hopkins University, Baltimore

⁸ siehe Batelle et al. 1998 und Batelle et al. 2001

⁹ siehe Batelle et al. 1998 und Batelle et al. 2001



Zur Darstellung der sekundären Antikörper wurden die Fluoreszenzmarkierungen zum einen mit TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) verwendet. Ein Rhodaminderivat, das sein Absorptionsmaximum bei 520 + 554 nm und sein Emissionsmaximum bei 582 nm hat. Er stammt aus der Ziege und ist gegen Maus gerichtet. TRITC wurde in einer Verdünnung von 1:100 angewendet. Zum anderen habe ich als zweiten Sekundärantikörper bei Doppelfärbungen FITC (Fluorescein isothiocyanat) – gekoppelte Antikörper - verwendet. Der Antikörper stammt aus der Ziege und ist gegen Kaninchen gerichtet. Ich habe ihn in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Dieser fluorchromierte sekundäre Antikörper hat sein Absorptionsmaximum bei 488 nm und sein Emissionsmaximum bei 520 nm. Die Hintergrundaktivität fiel relativ gering aus und die Fluoreszenz blieb lange erhalten.



IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-HT	Serotonin, bzw. 5-Hydroxy-tryptamin	N	Nucleus einer Photorezeptorzelle
Ax	Axon	NGS	Ziegenserumalbumin
BRN	basale retinale Neurone	NL	Neurolemma
BSA	Rinderserumalbumin	n-MVB	nascent multivesicular body
c	caudal	NPY	Neuronales Protein Y
C	Cilie	Ns	Nucleus einer neurosekretorischen Zelle (Nervenzelle)
Ce	Centriole	nt	Neurotubuli
cGMP	zyklisches GMP (Guanin-Mono-Phosphat)	ON	optischer Nerv
CL	Kapillarlumen	OSGK	Oberschlundganglionkomplex
c-MVB	compact multivesicular body	P	Phaosom
csV	clear synaptiv Vesicles	PBS	Phosphorpuffer in Ringerlösung
CV	coated vesicles	PDE	Phenylendiamine
D	Desmosomen	PDE	Phosphodiesterase
d	dorsal	PDH	„Pigment-Dispersing-Hormone“
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	PFA	Paraformaldehyd
	Tetrahydrochlorid	pL	primäre Lysosomen
DB	dense body	Pm	<i>Paruroctonus mesaensis</i>
dcV	dark-core vesicle	PRC	Phase-Response-Curve
E	Endothelzelle der Kapillarwand	PRIM. LYSOS.	primäre Lysosomen
Eff	efferentes Terminal	PRZ	Photorezeptorzelle
ENSF	efferente neurosekretorische Fasern	PV	nascent pinocytotic vesicle
G	Golgiapparat	r	rostral
GA	Glutaraldehyd	R	roots
GDP	Guanin-Di-Phosphat	RB	residual body (Abbauprodukte Tag)
Glia	Gliazelle	RER	rauhes endoplasmatisches Reticulum
Gliazug	Anschnitt einer Gliazelle	Rh	Rhabdom
GO	Golgi-Apparat	rMV	rhabdomere Mikrovilli
G_{αq}	Untereinheit des Transduzin	S	Synapse
GTP	Guanin-Tri-Phosphat	SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
HC	Hämocyte	SV	smooth vesicle
HL	Hämolympe	T	Lysosomen / nicht näher spezifizierte Membranumbauprodukte / Turnoverprodukte
IS	intrasegmentale Nerven	TBS	Tris-Pufferlösung
-ir	immunreaktiv	TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
KO	Konnektive	TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
L	Lakune	USGK	Unterschlundganglionkomplex
LB	lamellar body	v	ventral
LGN	lateraler Kniehöcker	ZK	Zentralkörper
ML	Metasomaler Lichtsinn	ZNS	Zentrales Nervensystem
MN	metasomales Neuron (Nervenzelle)		
MPI	Arrestin-Myosin und Calmodulin-		
Opsin			
MT	Mitochondrien		
MVB	multivesikuläre Körper		

Kirsten Schuchardt

**Niddagastraße 35
60489 Frankfurt
Tel. 069/ 7896138
kschuchardt@gmx.de**

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Kirsten Schuchardt (geb. Dammann)
Geburtsdatum	18. März 1972
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	verheiratet, ein Kind
Schulbildung	
August 1978 - Juli 1982	Grundschule Frahmstraße in Hamburg
August 1982 - Juli 1988	Gymnasium Blankenese in Hamburg
März 1988 - April 1988	Schüleraustausch Hong Kong
August 1988 - Juli 1989	High School Pretty Prairie, Kansas (USA), Abschluss der Schule mit dem High School Diplom
August 1989 - Juni 1991	Gymnasium Blankenese in Hamburg, Abschluss der Schule mit dem Abitur
Studium	
Oktober 1991	Beginn des Studiums Grundschulpädagogik mit dem Fach Politikwissenschaften an der Technischen Universität Berlin
seit Oktober 1992	Erweiterung zum Haupt- und Realschullehrer durch zusätzliche Aufnahme des Biologiestudiums
Februar 1996	Staatsexamen Teilprüfung in Psychologie und Erziehungswissenschaften
seit April 1996	Erweiterung des Studiums zum Studienrat mit dem Erstfach Biologie
August 1997	Abgabe der Examensarbeit: <i>"Vergleichende Ethologische Untersuchungen zum agonistischen Verhalten der Krebse Eriocheir sinensis und Astacus astacus"</i> Betreuer: Prof. Dr. Joachim Erber
April 1998	Staatsexamen Teilprüfung Biologie
September 1998	Staatsexamen Teilprüfung Politikwissenschaften und Abschluss des Studiums als Studienrat

Dissertation

- November 1998 Beginn der Promotion an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt a.M. am Zoologischen Institut des Fachbereichs Biologie
Betreuer: Prof. Dr. E.-A. Seyfarth, Thema der Dissertation:
„Serotonin und Octopamin im Nervensystem von Spinnen: Lokalisation und Wirkung im Verhalten“
- November 1998 - März 2000 Wissenschaftliche Angestellte (BAT2a/2) im Rahmen des Forschungsprojektes "SE 367/2-3" der Deutschen Forschungsgemeinschaft, befristeter Arbeitsvertrag bis zum 15.03.2000
- April 2000 - Oktober 2002 Stipendium der Hessischen Landesgraduiertenförderung
- August 2000 - Juli 2003 Kollegiatin des Graduiertenkollegs "Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen und Funktionen" der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M
- seit April 2001 Wechsel des Themas und des Betreuers der Promotion
Neuer Betreuer: Prof. Dr. Günther Fleissner
Neues Thema: *„Der metasomale Lichtsinn des Skorpions: Eine immunhistologische und feinstrukturelle Untersuchung“*
- seit Juli 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (BAT 2a/2) im Forschungsprojekt DFG Fl 177/10-1 "Mondlichtrezeptor"
- November 2003 Abgabe der Dissertationsschrift