

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Uroš VIDEMŠEK

**DEGENERACIJA CENTRALNIH FOTORECEPTORJEV PRI VINSKI  
MUŠICI (*Drosophila melanogaster*) SEVA *rdgC***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEGENERATION OF CENTRAL PHOTORECEPTORS IN THE  
FRUIT FLY (*Drosophila melanogaster*) STRAIN *rdgC***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za fotorepcijo na Katedri za fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenoval doc. dr. Petra Stuška in za somentorja asist. dr. Gregorja Belušiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kazimir DRAŠLAR,  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Gregor ZUPANČIČ, recenzent,  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Peter STUŠEK, mentor,  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: asist. dr. Gregor BELUŠIČ, somentor  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 17.12.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Uroš Videmšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK 591.185:595.773(043.2)=163.6  
KG *Drosophila*/fotoreceptor/fosforilacija/rodopsin/degeneracija/repolarizacija/  
elektroretinogram/jakostna krivulja/spektralna občutljivost/*sev/ninaE/rdgC*  
AV VIDEMŠEK, Uroš  
SA STUŠEK, Peter (mentor)/BELUŠIČ, Gregor (somentor)  
KZ SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2008  
IN DEGENERACIJA CENTRALNIH FOTORECEPTORJEV PRI VINSKI MUŠICI  
(*DROSOPHILA MELANOGASTER*) SEVA *rdgC*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 72 str., 5 pregl., 41 sl., 2 pril., 4 str. virov  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Fosforilacija heptahelikálnih receptorskih molekul je pomemben proces pri terminaciji fototransdukcijske kaskade in regeneracije receptorske molekule. Rodopsin v očesu genetsko spremenjenih vinskih mušic (*Drosophila melanogaster*) je primeren model za preučevanje tega procesa. S križanjem smo vzgajali dva seva v namene preučevanja centralnega fotoreceptorja R8, ki vsebuje le rodopsin Rh6. To sta seva *sev;rdgC* in *sev;ninaE* (*sev* – sevenless, odsotna fotoreceptorska celica R7; *rdgC* – okvara RdgC fosfataze in *ninaE* – okvarjen, odsoten rodopsin Rh1). Centralna razreda fotoreceptorskih celic R7 in R8 se glede na vsebnost dveh različnih rodopsinov med sabo vedno enako parita: če R7 vsebuje Rh3, je v R8 vedno prisoten le Rh5 rodopsin, če pa R7 vsebuje Rh4, je v R8 prisoten le Rh6 rodopsin. Ob odsotnosti R7 celic (*sevenless*) se v R8 celicah vedno ekspirira le Rh6. Fotoreceptorji mušic z okvarjeno fosfatazo RdgC so podvrženi hitri, od svetlobe odvisni degeneraciji. Degeneracija ni popolna, saj lahko pri različno starih živalih izmerimo rezidualni ERG. K rezidualnemu ERG degeneriranih *sev;rdgC* mušic prispevajo le centralne fotoreceptorske celice R8. S primerjavo spektralnih občutljivosti sevov *sev;rdgC* in *sev;ninaE* smo pokazali, da lahko študiramo lastnosti posameznih fotoreceptorskih celic *in vivo*, v našem primeru gre za razred R8 centralnih fotoreceptorjev. Ker pa dvojna mutanta vsebuje tudi okvaro *sev*, se pri vseh R8 celicah ekspirira le Rh6 rodopsin, kar smo z našo raziskavo tudi uspeli dokazati.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC 591.185:595.773(043.2)=163.6  
CX *Drosophila*/photoreceptor/phosphorylation/rhodopsin/degeneration/repolarization/  
electroretinogram/intensity curve/spectral sensitivity/*sev/ninaE/rdgC*  
AU VIDEMŠEK, Uroš  
AA STUŠEK, Peter (supervisor)/BELUŠIČ, Gregor (co-supervisor)  
PP SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Biology department  
PY 2008  
TI DEGENERATION OF CENTRAL PHOTORECEPTORS IN THE FRUIT FLY  
(*DROSOPHILA MELANOGASTER*) STRAIN *rdgC*  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 72 p., 5 tab., 41 fig., 2 ann., 4 p. of ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB Phosphorylation of heptahelical receptor molecules is an important process in termination of phototransduction cascade and regeneration of the receptor molecule. Rhodopsin in the eye of genetically modified fruit fly (*Drosophila melanogaster*) is an appropriate model for studying phosphorylation characteristics. We brought up two strains for research purposes of the central photoreceptor R8, which contains only rhodopsin Rh6. We achieved this by two double crossbreeds *sev;rdgC* and control strain *sev;ninaE* (*sev* – sevenless, absence of R7 photoreceptor cells; *rdgC* – non-functional RdgC phosphatase and *ninaE* – non-functional, absent rhodopsin Rh1). Central classes of photoreceptor cells R7 and R8 are pairing up, with regard to containment of two different rhodopsins, always the same way: if R7 contains Rh3, then R8 holds Rh5 rhodopsin and if R7 contains Rh4, then R8 holds Rh6 rhodopsin. When R7 cells are absent (*sevenless*), then R8 cells will express only Rh6. Fruit fly photoreceptors, with degenerated RdgC phosphatase, are subjected to light dependent degeneration. Degeneration is incomplete, so it is possible to measure residual ERG in fruit flies of different ages. It is reported that central photoreceptor cell R8 contribute to residual ERG from degenerated *sev;rdgC* fruit flies. Comparison of *sev;rdgC* mutant's spectral sensitivity with *sev;ninaE* (mutants without R7 cells, with non-functional gene for Rh1 rhodopsin and consequently with only functional R8 photoreceptor cells), indicates that we can study characteristics of individual photoreceptor cells *in vivo*, in our case on central photoreceptor R8 cells. Our crossbreed contains *sev*, therefore all R8 cells express only Rh6 rhodopsin, what we have managed to prove with our research.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 STRUKTURA OČESA VINSKE MUŠICE	2
<b>1.1.1 Lastnosti vidnega pigmenta</b>	<b>4</b>
1.2 TRANSDUKCIJA SVETLOBNEGA SIGNALA	6
<b>1.2.1 Aktivacija fototransdukcije</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2 Terminacija odgovora</b>	<b>8</b>
1.3 ELEKTRORETINOGRAM	11
<b>1.3.1 Elektrofiziološke lastnosti R7 in R8 celic diptero</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Elektrofiziološke značilnosti transgenih sevov <i>rdgC</i></b>	<b>12</b>
1.4 PROBLEMI IN DELOVNA HIPOTEZA	13
<b>2 MATERIAL IN METODE</b>	<b>15</b>
2.1 POSKUSNE ŽIVALI	15
<b>2.1.1 Postopek in shematski prikaz križanja sevov <i>sev z ninaE</i> in <i>z rdgC</i></b>	<b>18</b>
<b>2.1.2 Preparacija poskusne živali</b>	<b>21</b>
2.2 FOTOSTIMULACIJA	21
<b>2.2.1 Svetlobni vir</b>	<b>21</b>
2.2.1.1 Emisijski spekter ksenonove žarnice	22
2.2.1.2 Absorbanca sivih filtrov	23
2.3 REGISTRACIJA ERG	23
2.4 EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI	24
<b>2.4.1 PDA protokol</b>	<b>24</b>
2.4.1.1 Inaktivacija fotoreceptorjev R1-6 in izolacija ERG R7 in R8	25
<b>2.4.2 Meritve jakostne krivulje</b>	<b>25</b>
<b>2.4.3 Meritve spektralne učinkovitosti</b>	<b>26</b>

2.5	OBDELAVA REZULTATOV	26
<b>2.5.1</b>	<b>Uporabljena programska orodja</b>	<b>26</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Statistična obdelava rezultatov</b>	<b>27</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Prilagajanje jakostne krivulje</b>	<b>27</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Izračun spektralne občutljivosti</b>	<b>28</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Prilagajanje krivulje spektralne občutljivosti</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>30</b>
3.1	PDA PRI RAZLIČNIH TRANSGENIH SEVIH	30
3.2	JAKOSTNE KRIVULJE	36
3.3	SPEKTRALNA OBČUTLJIVOST CENTRALNIH FOTORECEPTORJEV	37
3.4	PRIMERJAVA AMPLITUD ABSORPCIJSKIH VRHOV RODOPSINOV R7 IN R8 CELIC	41
<b>4</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>44</b>
4.1	FENOTIP DEGENERIRANIH <i>rdgC</i> IN <i>sev;rdgC</i> MUŠIC	45
<b>4.1.1</b>	<b>PDA kot pokazatelj neenakomerne degeneracije</b>	<b>47</b>
4.2	JAKOSTNA KRIVULJA RAZLIČNIH SEVOV MUŠIC	48
4.3	SPEKTRALNA OBČUTLJIVOST RAZLIČNIH SEVOV MUŠIC	49
4.4	OCENA FIZIOLOŠKEGA STANJA R7 IN R8 RECEPTORJEV TRANSGENIH SEVOV MED STARANJEM	52
4.5	SKLEPI:	52
<b>5</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>VIRI</b>	<b>57</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Absorpcijski vrhovi rodopsina in metarodopsina	5
<b>Preglednica 2:</b> Shematski prikaz postopka križanja sevov <i>sev</i> in <i>ninaE</i>	19
<b>Preglednica 3:</b> Shematski prikaz postopka križanja sevov <i>sev</i> in <i>rdgC</i>	19
<b>Preglednica 4:</b> Delež degeneracije fotoreceptorjev tekom staranja na svetlobi seva <i>rdgC</i>	45
<b>Preglednica 5:</b> Delež degeneracije fotoreceptorjev tekom staranja seva <i>sev;rdgC</i>	46

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba fotoreceptorjev <i>Drosophile</i>	3
<b>Slika 2:</b> C-terminalna regija rodopsinov Rh1 – Rh6	4
<b>Slika 3:</b> Absorpcijski vrhovi rodopsinov Rh1 – Rh6	5
<b>Slika 4:</b> Shema fototransdukcijske kaskade	7
<b>Slika 5:</b> Encimatsko uravnavan fotokemični cikel rodopsina	8
<b>Slika 6:</b> Shema eksperimentalne postavitve	22
<b>Slika 7:</b> Korekcijski faktor nevtralnno sivih filtrov in ksenonove žarnice	23
<b>Slika 8:</b> Primer ERG posnetka izmerjenega po PDA protokolu pri divjem tipu A35 levo in sevu <i>sev</i> desno	32
<b>Slika 9:</b> A35_S, PDA protokol	33
<b>Slika 10:</b> A35_T, PDA protokol	33
<b>Slika 11:</b> <i>ninaE_S</i> , PDA protokol	33
<b>Slika 12:</b> <i>ninaE_T</i> , PDA protokol	33
<b>Slika 13:</b> <i>rdgC_S</i> , PDA protokol	33
<b>Slika 14:</b> <i>rdgC_T</i> , PDA protokol	33
<b>Slika 15:</b> <i>sev_S</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 16:</b> <i>sev_T</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 17:</b> <i>sev;ninaE_S</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 18:</b> <i>sev;ninaE_T</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 19:</b> <i>sev;rdgC_S</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 20:</b> <i>sev;rdgC_T</i> , PDA protokol	35
<b>Slika 21:</b> Primerjava $I_{50}$ svetlobnih jakosti različnih sevov, staranih na 12h/12h svetlo / temnem ciklu	36
<b>Slika 22:</b> Primerjava $I_{50}$ svetlobnih jakosti različnih sevov, staranih v temi	37
<b>Slika 23:</b> A35_S, spektralna občutljivost	38
<b>Slika 24:</b> A35_T, spektralna občutljivost	38
<b>Slika 25:</b> <i>ninaE_S</i> , spektralna občutljivost	39
<b>Slika 26:</b> <i>ninaE_T</i> , spektralna občutljivost	39
<b>Slika 27:</b> <i>rdgC_S</i> , spektralna občutljivost	39
<b>Slika 28:</b> <i>rdgC_T</i> , spektralna občutljivost	39
<b>Slika 29:</b> <i>sev_S</i> , spektralna občutljivost	40



<b>Slika 30:</b> <i>sev_T</i> , spektralna občutljivost	40
<b>Slika 31:</b> <i>sev;ninaE_S</i> , spektralna občutljivost	40
<b>Slika 32:</b> <i>sev;ninaE_T</i> , spektralna občutljivost	40
<b>Slika 33:</b> <i>sev;rdgC_S</i> , spektralna občutljivost	41
<b>Slika 34:</b> <i>sev;rdgC_T</i> , spektralna občutljivost	41
<b>Slika 35:</b> Časovni potek povprečnih amplitud vrhov v UV pri sevih A35, <i>ninaE</i> , <i>rdgC</i> ; staranih na svetlobi	42
<b>Slika 36:</b> Relativna primerjava povprečnih amplitud vrhov v UV posameznih sevov A35, <i>ninaE</i> , <i>rdgC</i> ; staranih v temi	42
<b>Slika 37:</b> Relativna primerjava povprečnih amplitud dolgovalovnih vrhov posameznih sevov A35, <i>ninaE</i> , <i>rdgC</i> , <i>sev</i> , <i>sev;ninaE</i> in <i>sev;rdgC</i> ; staranih na svetlobi	43
<b>Slika 38:</b> Relativna primerjava povprečnih amplitud dolgovalovnih vrhov posameznih sevov A35, <i>ninaE</i> , <i>rdgC</i> , <i>sev</i> , <i>sev;ninaE</i> in <i>sev;rdgC</i> ; staranih v temi	43
<b>Slika 39:</b> Časovni potek degeneracije pri sevu <i>rdgC</i>	46
<b>Slika 40:</b> Časovni potek degeneracije <i>sev;rdgC</i> seva	46
<b>Slika 41:</b> sev <i>ninaE_T</i> : primerjava enakih podatkov normaliziranih pri dveh različnih vrednostih (puščice)	50

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP, ATP	adenozin di-, trifosfat
Arr1, Arr2	arestin 1, arestin 2
DAG	diacilglicerol
DGK	diacilglicerol kinaza, kodira gen <i>rdgA</i>
ERG	elektroretinogram
G-protein	heterotrimetričen gvanin nukleotid vezajoči protein (»heterotrimetric guanine nucleotide binding protein«)
GPCR	z G-proteinom sklopljeni receptor
InaD	ogrodni protein InaD (»Inactivation-no afterpotential«)
IP <sub>3</sub> / InsP <sub>3</sub>	inozitol-1,4,5-trifosfat
LMC	nevroni prvega optičnega ganglija (»large monopolar cells«)
M, M*	metarodopsin, aktivni metarodopsin
PDA	podaljšani depolarizacijski popotencial
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PKC	proteinkinaza C
PLC	fosfolipaza C
R1-6	periferne fotoreceptorske celice v omatidiju dipterskih insektov
R7, R8	centralni fotoreceptorski celici v omatidiju dipterskih insektov
<i>rdgC</i>	retinalna degeneracija C; gen za rodopsinsko fosfatazo
Rh	rodopsin
RoK	rodopsinska kinaza
Trp	»transient receptor potential« ionski kanalček
Trpl	»transient receptor potential-like« ionski kanalček
wt	divji tip

Mala začetnica označuje recisivni gen (npr. *arr1*, gen za arestin 1), velika začetnica pa dominantni gen (npr. *InaD*, gen za ogrodni protein InaD). Okrajšava v poševnem tisku pomeni gen oz. sev z okvaro dotičnega gena (npr. *rdgC*, okvarjen gen za rodopsinsko fosfatazo), okrajšava z veliko začetnico in navadnim tiskom pa protein (npr. Arr1 – arestin 1).

## 1 UVOD

Membranski proteini GPCR (G protein coupled receptors) so velika in variabilna skupina molekularnih receptorjev, ki sodelujejo pri mnogih procesih transdukcije signalov iz zunanjega ali notranjega okolja organizma. Poznanih je več kot tisoč različnih GPCR. Mednje spadajo receptorji različnih nevrottransmiterjev, neuropeptidov in peptidnih hormonov ter receptorji, odgovorni za prenos vidnih, okušalnih in vohalnih dražljajev. GPCR v obliki  $\alpha$  heliksov sedemkrat prečkajo celično membrano. Vezava liganda na zunajcelično domeno povzroči konformacijsko spremembo receptorja, ki se s citoplazemskim delom poveže z G proteinom. Interakcija aktivira G protein, ta pa preko proteinske kaskade posreduje informacijo k specifičnemu znotrajceličnemu efektorju – encimu ali ionskemu kanalčku. Sledi terminacija signalizacije, pri kateri se morajo vsi aktivirani intermediati, vključno z receptorjem, inaktivirati. Fosforilacija receptorja je eden izmed korakov pri njegovi inaktivaciji.

Oko vinske mušice *Drosophila melanogaster* ima v transdukcijskem mehanizmu vključeno heptahelikano receptorsko molekulo – rodopsin. Njegovo aktivacijo proži absorpcija fotona, signal pa se prevede v spremembo električne napetosti celice. S svetlobnim dražljajem je mogoče na enostaven način uravnati aktivnost rodopsina, zato je le ta odličen model za proučevanje fosforilacije pri inaktivaciji GPCR *in vivo*. Obstoj različnih mutant in primerjava njihovih fenotipov omogočata analitičen študij pomena določenega procesa. Pomen fosforilacije receptorske molekule je možno preučiti na eleganten način z elektrofiziološko študijo mutant, ki imajo okvarjen encim za fosforilacijo ali defosforilacijo.

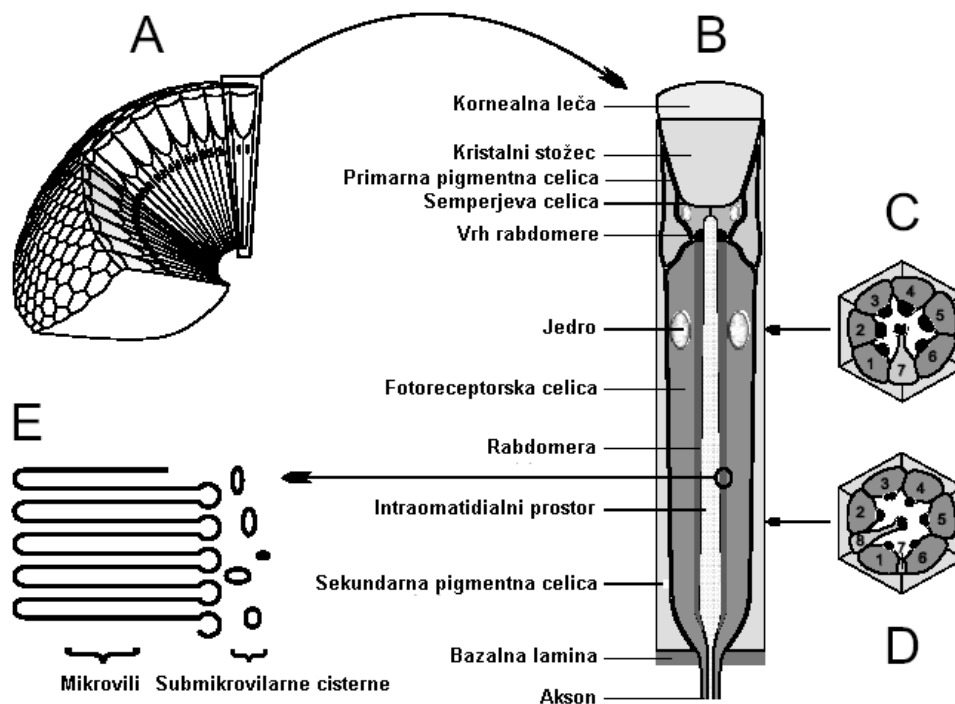
## 1.1 STRUKTURA OČESA VINSKE MUŠICE

Zaznavanje svetlobe pri odraslih vinskih mušicah (*Drosophila melanogaster*) poteka s parom sestavljenih oči in tremi oceli.

Oko *Drosophile* sestavlja približno 700 osnovnih funkcionalnih enot, imenovanih omatidiji. Posamezen omatidij je zgrajen iz osmih fotoreceptorskih celic, ki jih obdaja šest sekundarnih pigmentnih celic. Svetloba vstopa v omatidij skozi kornealno lečo in kristalni stožec. Slednjega obdajata dve primarni pigmentni celici. Štiri Semperjeve celice, ki ležijo nad fotoreceptorskimi celicami, tvorijo nitaste izrastke proksimalno v omatidij in predstavljajo povezavo med kristalnim stožcem in fotoreceptorskimi celicami (Stavenga 1995). Svetloba se absorbira na fotoobčutljivem delu receptorskih celic, tako imenovanih rabdomerah.

Rabdomero vsake fotoreceptorske celice tvori približno 50.000 mikrovilov. Posamezen mikrovil meri v premeru le 60 nm in kot semiavtonomna enota vsebuje vse proteine fototransdukcijske kaskade. Rabdomere osmih fotoreceptornih celic vsakega omatidija sestavljajo rabdom odprtega tipa. Mikrovili sosednjih celic (R1 – R6) se ne stikajo, temveč segajo v skupni zunajcelični prostor, imenovan centralni kanal (slika 1). Receptorski celici R7 in R8 ležita ena nad drugo in tvorita skupno rabdomero ter segata globlje v centralni kanal (Hardie 1985; Stavenga 1995).

Omatidiji so optično ločeni z vmesnimi pigmentnimi celicami. Odprti rabdom omatidija omogoča, da vsaka fotoreceptorska celica vzorči svetlobo iz drugačnega kota, pri čemer delujejo rabdomere enega omatidija, kot svetlobni vodniki, optično ločene med seboj. Aksoni, ki izhajajo iz receptorskih celic, se v nevropilah sestavljenega očesa povezujejo tako, da se vidna informacija sestavlja oziroma superponira. Govorimo o nevralni superpoziciji mušičjega očesa, ki omogoča visoko ločljivost zaradi optične ločenosti in hkrati visoko občutljivost zaradi sestavljanja (superpozicije) vidnega signala (Kirschfeld 1973) na nivoju nevronov višjega reda.



**Slika 1:** Zgradba fotoreceptorjev *Drosophile*

A, Sestavljeno oko. B, zgradba omatidija *Drosophile*. C, prečni prerez distalnega dela omatidija z R7 receptorsko celico. D, prečni prerez proksimalnega dela omatidija z R8 receptorsko celico. E, Shematski prikaz mikrovilarne membrane rabdome. (prirejeno po Paulsen et al. 2001)

Na podlagi strukturnih in funkcionalnih značilnosti delimo fotoreceptorske celice na tri razrede:

- Celice R1-6 so največje, njihove rabdome so razporejene okrog celotnega osrednjega kanala. Vsebujejo modro-občutljivi ftopigment rodopsin Rh1, aksoni pa sinapsirajo z nevroni (LMC nevroni - Large Monopolar Cells) prvega optičnega ganglija, imenovanega lamina.
- Celica R7 leži distalno nad celico R8. Njuni rabdome segata globlje v centralni kanal. R7 vsebuje dve vrsti UV občutljivega rodopsina Rh3 in Rh4 (ali enega ali drugega, nikoli obeh hkrati).
- Celica R8 leži proksimalno pod R7 in vsebuje ali rodopsin Rh5 (absorpcijski vrh v modrem) ali Rh6 (absorpcijski vrh v zelenem delu svetlobnega spektra). Celice R7 in R8 sinapsirajo z nevroni drugega optičnega ganglija, imenovanega medula (Hardie 1985).

Rodopsin Rh3 se znotraj enega omatidija vedno pojavlja v kombinaciji z rodopsinom Rh5, Rh4 pa v kombinaciji z Rh6. Rh4 rodopsin se pojavlja v 70% centralnih fotoreceptorjev, medtem ko Rh3 pa v preostalih 30%. Enako velja za Rh5 in Rh6 rodopsina z odgovarjajočima paroma. Celice dorzalnega obroča, ležečega na obrobju sestavljenega očesa, odstopajo od te zasnove, saj se UV občutljivi rodopsin Rh3 nahaja tako v celicah R7, kot tudi v R8 znotraj enega omatidija (Feiler et al. 1992).

Fotoreceptorske celice ležijo na bazalni lamini, ki predstavlja električno in kemijsko bariero.

### 1.1.1 Lastnosti vidnega pigmenta

Vidni pigment rodopsin je, kot vsi GPCR, heptahelikalna receptorska molekula. Heptahelikalna struktura pripada proteinu opsinu, na katerega je s kovalentno vezjo vezana neproteinska kromofora 3-hidroksi retinal.

Sedem transmembranskih  $\alpha$ -heliksov povezujejo hidrofilne zanke. Na C-terminalnem delu opsinske molekule najdemo potencialna fosforilacijska mesta (Zuker et al. 1985). Potencialna serinska in treoninska fosforilacijska mesta imajo v različnih številih vsi rodopsini (Wessels 2002). Rh1 ima naprimer eno treoninsko in pet serinskih mest, Rh6 pa tri treoninska in štiri serinska potencialna fosforilacijska mesta (glej sliko 2).

Rh1	HPKYRLALKEKCPCCVFGKVDDGKSSDAQSQA- <u>T</u> ASEAESKA-----	373
Rh2	HPKYRIVLKEKCPMCVFGNTDEPKPDAPAS <u>D</u> TE <u>T</u> TSEADSKA-----	349
Rh3	HPRYRMELQKRCPWLALNEKAPES <u>S</u> AVAS <u>T</u> ST <u>T</u> QEPQ <u>O</u> TTAA-----	383
Rh4	HPRYRLELQKRCPWLGVNEK <u>S</u> GEI <u>S</u> SAQ <u>S</u> T- <u>T</u> TQEQ <u>Q</u> TTAA-----	378
Rh5	HPKYRLELERLPWLGIREKHAT <u>S</u> GT <u>S</u> GGQES <u>V</u> AS <u>V</u> SGD <u>T</u> LAL <u>S</u> VQ <u>N</u>	381
Rh6	HPKYKQVLREKMPCLACGKDDL <u>T</u> SD <u>S</u> R <u>T</u> QATAEI--- <u>S</u> ESQA-----	369

**Slika 2:** C-terminalna regija rodopsinov Rh1 – Rh6

Potencialna serinska in treoninska fosforilacijska mesta so podčrtana (prirejeno po Wessels 2002).

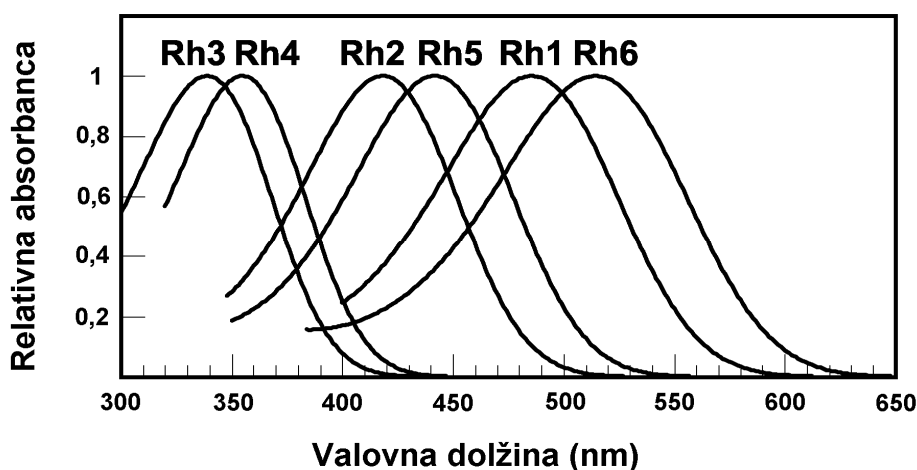
Fotokemični cikel rodopsina poteče po absorpciji fotona ustrezne valovne dolžine. Rodopsin se prek serije termolabilnih intermediatov pretvori v termostabilen metarodopsin.

Obraten proces, reizomerizacija metarodopsina v rodopsin, je tudi odvisna od absorpcije fotona (Stavenga 1995). Absorpcijska vrhova izomer sta zamaknjena pri vseh tipih rodopsinov Rh1-Rh6 (preglednica 1). Večinoma je rodopsin najbolj občutljiv za svetlobo krajših valovnih dolžin, metarodopsin pa za dolgovalovni del vidnega spektra. Oči divjega tipa vinskih mušic so rdeče, ker retinalni zaščitni pigmenti prepuščajo le dolgovalovno svetlobo. Ta ekonomična strukturna strategija zagotavlja dovolj ustrezne svetlobe za rekonverzijo sicer stabilne metarodopsinske molekule (Hardie, Raghu 2001).

**Preglednica 1:** Absorpcijski vrhovi rodopsina in metarodopsina

Mikrospektrofotometrično izmerjene vrednosti lahko pri drugačni merilni metodi odstopajo od navedenih (prirejeno po Salcedo et al. 1999).

	<i>Absorpcijski vrh rodopsina</i>	<i>Absorpcijski vrh metarodopsina</i>
<i>Rh1</i>	486 nm	566 nm
<i>Rh2</i>	418 nm	506 nm
<i>Rh3</i>	331 nm	468 nm
<i>Rh4</i>	355 nm	470 nm
<i>Rh5</i>	442 nm	494 nm
<i>Rh6</i>	515 nm	468 nm



**Slika 3:** Absorpcijski vrhovi rodopsinov Rh1 – Rh6

(prirejeno po Salcedo et al. 1999).

Raziskave ektopično izraženega fotopigmenta Rh6 v celicah R1 – R6 pri *Drosophili* so pokazale, da je le ta manj termostabilen od ostalih rodopsinov oziroma manj stabilen od enako ektopično izraženega rodopsina Rh5, katerega prav tako najdemo v R8 fotoreceptorskih celicah (Salcedo et al. 1999). Termolabilnost dolgovalovnega rodopsina Rh6 bi bila lahko logična rešitev sicer otežene rekonverzije kratkovalovne metarodopsinske oblike zaradi spektralnih lastnosti zaščitnega pigmenta.

Fotoreceptorske celice mušic, gojenih na gojiščih brez vitamina A, imajo nižjo absolutno občutljivost na svetlobo, saj je vitamin A prekurzor 3-hidroksi-retinala ter pospešuje zorenje opsina (Stavenga 1995). Poleg tega imajo mušice, ki so jim iz gojišča odvzeli vitamin A, znatno nižji relativni vrh spektralne občutljivosti v UV v primerjavi z vrhom v modrem delu svetlobnega spektra. Ob normalni dieti se namreč na opsin poleg 3-hidroksi-retinala vežeta še dve molekuli 3-hidroksi-retinola, imenovanega antenski pigment. Absorpcijski vrh antenskega pigmenta je v UV delu spektra in tvori fino vibronično strukturo z vrhovi pri 331, 350 in 369 nm. Prejeta energija se prenese na kromoforo, ki se izomerizira kot običajno (Hamdorf et al. 1992).

## 1.2 TRANSDUKCIJA SVETLOBNEGA SIGNALA

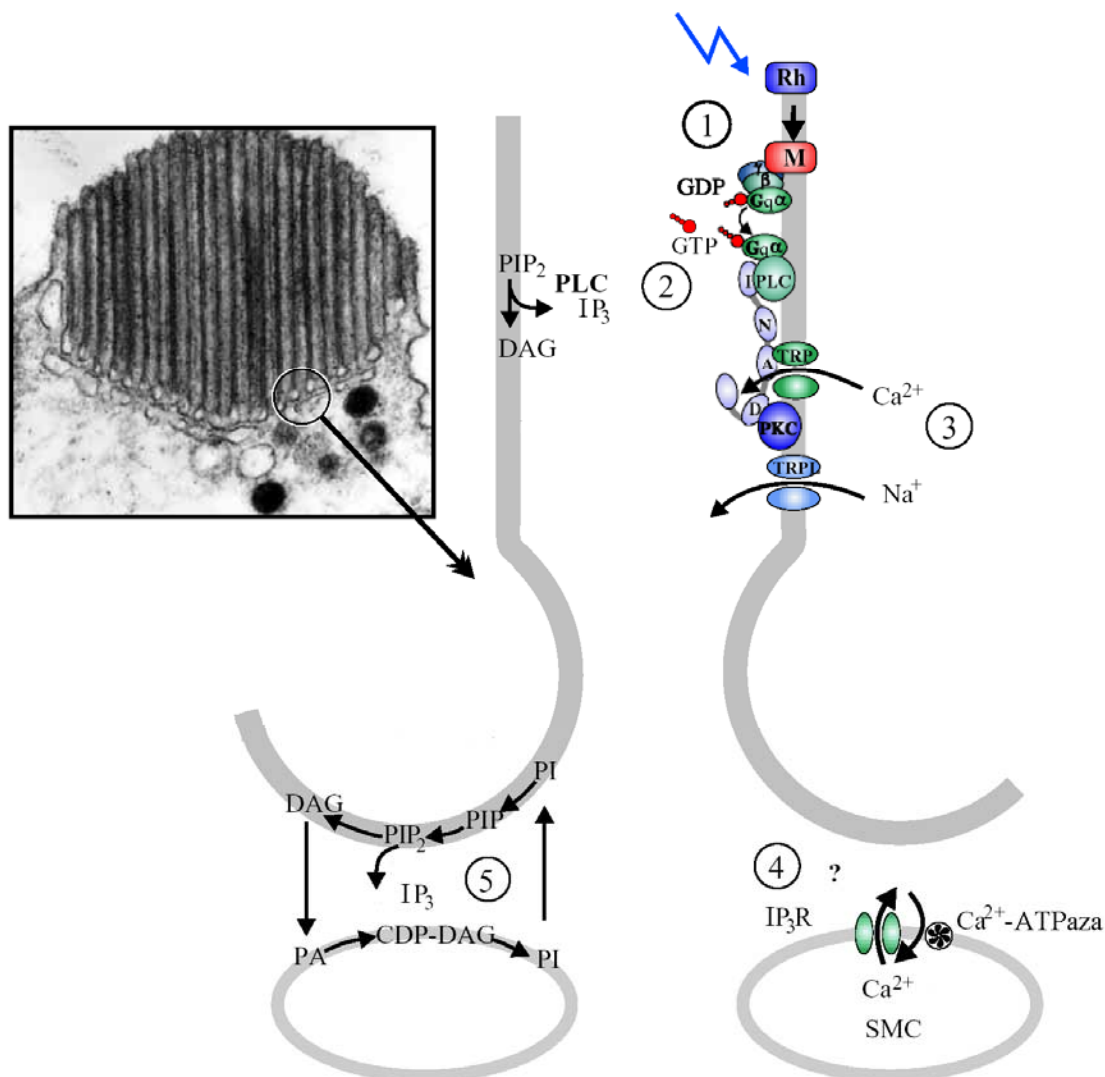
### 1.2.1 Aktivacija fototransdukcije

Fototransdukcija se proži z absorpcijo fotona v rodopsinu, kar povzroči spremembo konformacije 11-cis-3-hidroksiretinala v vse-trans fotoizomero ter nastanek katalitično aktivne metarodopsinske oblike.

Metarodopsin katalizira vezavo GTP na heterotrimerni G-protein. Sprosti se  $G\alpha$  podenota G-proteina, ki aktivira encim fosfolipazo  $C\beta$  (PLC). PLC cepi membransko molekulo fosfatidilinozitol-4,5-difosfat ( $PIP_2$ ) na citosolni inozitol-1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ) in lipofilni diaglicerol (DAG). Preko nepopolno raziskanega mehanizma ta dva produkta delujeta na odprtje TRP in TRPL kanalčkov, končni učinek pa je tok  $Ca^{2+}$  in  $Na^{2+}$  kationov v celico.



Celoten kompleks komponent fototransdukcijske kaskade se nahaja znotraj mikrovila oziroma v njegovih membranah v rabdomernem delu celice. Komponente so med seboj povezane z ogrodnim InaD proteinom, protein NinaC pa celoten signalni kompleks pritrjuje na citoskelet mikrovila. Tovrstna organizacija komponent signalnega kompleksa omogoča optimalne reakcijske razdalje, kar je najbrž vzrok izjemni hitrosti transdukcijske kaskade (Hardie, Raghu 2001).

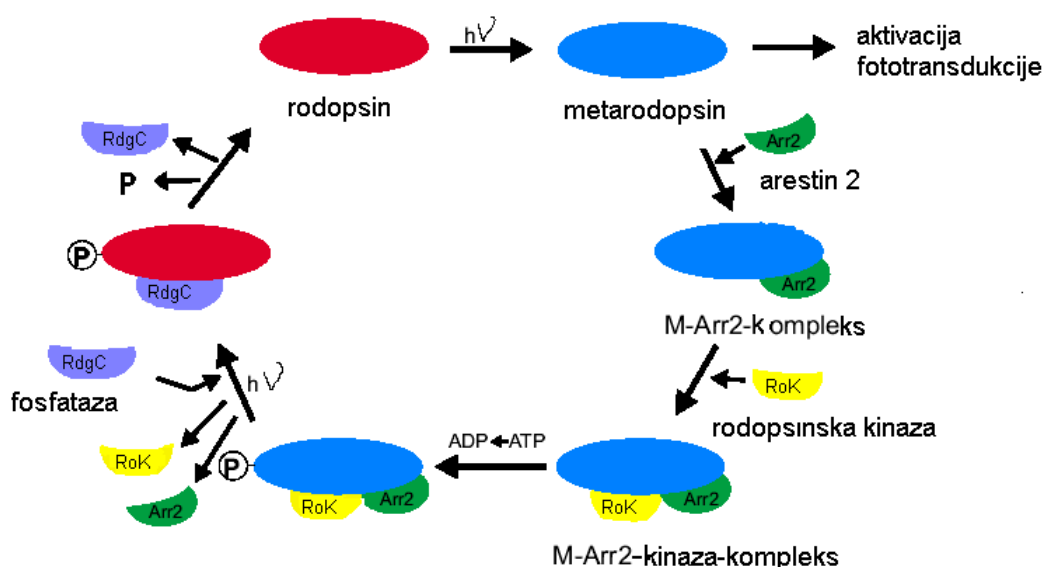


**Slika 4:** Shema fototransdukcijske kaskade

(1) Absorpciji fotona sledi fotokonverzija rodopsina v metarodopsin. Slednji aktivira heterodimerni G-protein s pomočjo izmenjave GTP – GDP. (2) G $\alpha$  podenota G-proteina aktivira PLC. Ta razcepi membranski protein PIP<sub>2</sub> na DAG in IP<sub>3</sub>. (3) TRPL in TRP kanalčki se odprejo po neznanem mehanizmu. Ca<sup>2+</sup> in Na<sup>2+</sup> ioni prodrejo v notranjost celice. (4) Submikrovilarne cisterne so zaloga sekundarnega sporočevalca Ca<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> kanalčki se odprejo po vezavi IP<sub>3</sub> na membrano cisterne. (5) Fosfoinozididni cikel predelave IP<sub>3</sub> in DAG v PIP<sub>2</sub> (prirejeno po Hardie 2001).

## 1.2.2 Terminacija odgovora

Učinkovitost in natančnost transdukcije svetlobnega signala je odvisna od pravočasne deaktivacije vseh elementov transdukcijske kaskade (Hardie 2001). Absorpcija enega fotona in sledeči kvantni sunek je časovno definiran dogodek, pri katerem porast znotrajcelične koncentracije  $Ca^{2+}$  vpliva na zapiranje ionskih kanalov in deaktivacijo encimov. Deaktivacija receptorske molekule ni potrebna za terminacijo kvantnega sunka. Obstajati pa mora mehanizem, ki aktiviranemu receptorju prepreči nadaljnjo proženje signalne kaskade. Stabilna metarodopsinska molekula se sicer ob absorpciji fotona pretvori v rodopsin, vendar je dogodek sorazmerno redek in naključen. Deaktivacija receptorja je zato uravnavana s hitrim in zanesljivim encimsko posredovanim mehanizmom (Scott et al. 1997).



**Slika 5:** Encimatsko uravnavan fotokemični cikel rodopsina

Po absorpciji fotona se rodopsin izomerizira v metarodopsin, ki z delovanjem na G-protein proži transdukcijsko kaskado. Na metarodopsin se veže arrestin 2, ki zavre njegovo katalitično aktivnost. Arrestin 2 se fosforilira, kar omogoči njegovo naknadno razvezavo. Rodopsinska kinaza nato fosforilira serinska in treoninska mesta na C-terminalni regiji opsina. Sledi absorpcija fotona ter reizomerizacija metarodopsina v rodopsinsko obliko. Zaradi nizke afinitete arrestina do rodopsina, se ta odcepi. V zadnji stopnji regeneracije

fosfataza RdgC defosforilira rodopsin, ki je tako pripravljen na nov fotokemični cikel (Belušič 2003).

V sestavljenem očesu *Drosophila melanogaster* sodelujeta pri deaktivaciji rodopsina dve obliki arestina, Arr1 in Arr2. Slednji se v fotoreceptorskih celicah pojavlja v šestkrat višji koncentraciji in ima pomembnejšo vlogo v procesu deaktivacije. Okvare arestina 2 vodijo v hitro, od svetlobe odvisno degeneracijo fotoreceptorskih celic (Dolph et al. 1993). Mutacije Arr1 nimajo tako drastičnih posledic za celico. Fenotip transgene mušice z okvarjenim *arr1* genom, je podoben fenotipu okvarjenega *trpl* gena, zato je možno, da Arr1 omogoča funkcionalno prisotnost Trpl kanalčkov (Belušič 2003). Arr2 sodeluje pri endocitozi okvarjenih rodopsinskih molekul, ker vsebuje prepoznavna mesta za vezavo klatrina (Kiselev et al. 1994).

V procesu deaktivacije prihaja do svetlobno odvisne fosforilacije obeh arestinov. Arr2 se fosforilira s pomočjo  $Ca^{2+}$ / kalmomodulin odvisne proteinske kinaze. Fosforilacija Arr2 je potrebna za odcep Arr2 od rodopsina po končani fotoizomerizaciji (Alloway et al. 1999). Fosforiliran arestin ima manjšo afiniteto do klatrina, zato je možna vloga fosforilacije tudi uravnavanje endocitoze poškodovanih molekul. Arestin, ki se zaradi okvare ni uspel fosforilirati, je z endocitozo izločen iz mikrovila (Alloway 2000).

Rodopsin je v procesu inaktivacije podvržen multipli fosforilaciji z rodopsinsko kinazo (RoK). Fosforilacija C- terminalne regije GPCR receptorja vretenčarjev je pomemben proces deaktivacije, ki za 50% zniža aktivnost receptorja in poveča afiniteto za vezavo arestina (Mendez et al. 2000). Pri vinski mušici fosforilacija nima direktne vloge pri terminaciji fototransdukcijske kaskade. Transgene mušice z manjkajočimi fosforilacijskimi mesti na rodopsinu ne kažejo okvar v električnem odzivu ali pri sposobnosti vezave arestina na metarodopsin (Vinos et al. 1997).

Stopnja fosforilacije se pri rodopsinih Rh1 – Rh6 razlikuje. Avtroradiografske meritve fosforilacije ekotopično eksprimiranih rodopsinov Rh2 – Rh6 z radioaktivnim fosfatom kažejo, da je stopnja fosforilacije pri Rh6 pod mejo detekcije (Wessels 2002).

Defosforilacija rodopsina je zadnja stopnja regeneracije receptorja. Omogoča jo serin – treoninska fosfataza RdgC (»retinal degeneration C«). Sestavljena je iz N terminalne regije z visokim odstotkom podobnosti trem družinam GPCR fosfataz (1, 2A, 2B) in edina

opisana fosfataza z direktnimi vezavnimi mesti za  $\text{Ca}^{2+}$  (Steele 1992). Regulacija RdgC poteka preko interakcije s kalmodulinom, kateri prekine povezavo med N-terminalno regijo in katalitično domeno molekule RdgC. Interakcija kalmodulina in RdgC je nujno potrebna za defosforilacijo rodopsina *in vivo* (Lee et al. 2001). RdgC fosfataza je prisotna samo v sestavljenem očesu in v gobastem telescu centralnih možganov vinske mušice (Steele 1992).

Nasprotno od fosforilacije je defosforilacija rodopsina nujna za preživetje fotoreceptorjev. Izguba *rdgC* gena vodi v od svetlobe odvisno degeneracijo fotoreceptorjev. Transgene vinske mušice z okvarjenim *rdgC* genom prve dni po izpostavi svetlobi ne kažejo znakov degeneracije. Tretji dan po izpostavitvi svetlobi začnejo fotoreceptorske celice propadati, peti dan pa so celice R1-R6 popolnoma degenerirane. Celice R7 in R8 ostajajo še naprej funkcionalne, vendar lahko zaradi okoliških apoptotskih procesov tudi te v določeni meri degenerirajo. Fotoreceptorji v temi gojenih mušic seva *rdgC* in mušic, gojenih na svetlobi na gojišču brez vitamina A, ne propadejo (Steele et al. 1990). Odsotnost degeneracije je opažena na dvojnih mutantah *rdgC* z delecijo C-terminalnih fosforilacijskih mest na rodopsinu (Vinos et al. 1997).

Od svetlobe odvisna degeneracija fotoreceptorskih celic *rdgC* mušic nastopi zaradi apoptoze, procesa regulirane celične smrti. Ekspresija antiapoptotičnega faktorja bakulovirusa p35 v fotoreceptorjih *rdgC* mušic namreč zaustavi proces degeneracije (Davidson et al. 1998). Za razliko od seva *rdgC* je celična smrt *arr2* mušic posledica nekroze (Ranganathan 2003). Prožilec apoptoze pri svetlobi izpostavljenih celicah je kopičenje stabilnih kompleksov arestina 2 in hiperfosforiliranega metarodopsina (Alloway et al. 2000; Kiselev et al. 2000). Z odstranitvijo rodopsina ali arestina M-Arr2 kompleksi ne nastajajo, kar zavre proces degeneracije (Alloway et al. 2000). Prepoznavni adaptor klatrina za internalizacijo M-Arr2 kompleksov je arestin 2. Z endocitozo v klatrinske vezikle vključeni kompleksi potujejo v notranjost citoplazme, kjer po še neznanem mehanizmu inducirajo apoptozo (Alloway et al. 2000; Kiselev et al. 2000).

### 1.3 ELEKTRORETINOGRAM

Elektroretinogram (ERG) je sumarični potencial vseh aktiviranih fotoreceptorskih celic očesa ter pripadajočih LMC nevronov. Ekstracelularna meritev je najučinkovitejša ob namestitvi elektrode tik pod korneo sestavljenega očesa. ERG sestavlja "on" komponenta oziroma hiter hiperpolarizacijski odgovor LMC nevronov ob začetku svetlobnega dražljaja, nespremenljiva komponenta ERG oziroma seštevek receptorskega potenciala in odgovora LMC nevronov, ob koncu osvetljevanja nastopi "off" komponenta LMC nevronov, sledi pa še popotencialna komponenta kot posledica ugašanja odgovora (Belušič 1998).

Poseben, umetno izzvan fenomen podaljšanega depolarizacijskega popotenciala (PDA - prolonged depolarizing afterpotential) nastane, če oko osvetljujemo s svetlobo tiste valovne dolžine, ki pretvori zadosten delež rodopsina v metarodopsin in ne omogoča obratne pretvorbe. Absorpcijski vrhovi rodopsina in metarodopsina so le minimalno zamaknjeni in ob izbiri ustrezne valovne dolžine lahko pretvorimo pretežno rodopsin v metarodopsinsko obliko oziroma metarodopsin skoraj v celoti v rodopsin. Pri tem mora količina nastalega metarodopsina močno presežati količino razpoložljivega arestina. Podaljšana depolarizacija vztraja tudi do nekaj ur, sicer pa vse dokler je ne prekinemo s pulzom "metarodopsinske" svetlobe. PDA je uporabno orodje za proučevanje fototransdukcije in terminacije odgovora.

#### 1.3.1 Elektrofiziološke lastnosti R7 in R8 celic diptero

Amplituda ERG transgenih sevov mušic z nefunkcionalnimi celicami R1-6 v primerjavi z ERG mušic divjega tipa je nižja, zaradi manjšega števila celic, ki pri teh sevih prispevajo k ERG. Opazna je tudi razlika glede prispevka LMC nevronov. Celice R7 in R8 ne tvorijo sinaps z LMC nevroni v lamini, ampak se povezujejo v drugem optičnem centru, ki leži globlje, v meduli. ERG celic R7 in R8 zato ne vsebuje "on" in "off" komponente nevronov, saj z LMC nimajo stika, medularni nevroni pa so preveč oddaljeni, da bi lahko prispevali k ERG.

Zaradi strukturnih lastnosti rabdomere (dolžina in premer) prispe do vsake celice R1-6 več svetlobe kot do R7 in 8. Kljub temu pa je relativen prispevek odgovora celic R7 in 8 k ERG večji od R1-6, najbrž zaradi močnejše ojačitve transdukcijskega signala (Hardie 1978).

Vrh spektralne občutljivosti R7 je v UV delu spektra (Hardie 1978), R8 pa v modro-zelenem delu. Študije na transgenih sevih z ektopično izraženim Rh5 in Rh6 rodopsinom iz celic R8 na celicah R1-6 kažejo, da imata Rh5 in Rh6 dva vrhova, enega v zelenem oziroma modrem delu spektra ( $\alpha$ -absorpcijski pas), in manjšega v ultravijoličnem delu svetlobnega spektra ( $\beta$ -absorpcijski pas).

Med ektopično izraženima rodopsinoma receptorjev R8 obstaja razlika pri izzvanju PDA. Ektopično izražen Rh 5 pri obsevanju z modro svetlobo kaže očiten podaljšan depolarizacijski popotenciali, medtem ko tega pojava pri celicah z ektopično izraženim Rh6 ni mogoče izzvati z monokromatsko svetlobo katerekoli valovne dolžine (Salcedo et al. 1999). PDA transgenih mušic z okvarjenim celicami R1 – R6 nastane po obsevanju z ultravijolično svetlobo.

### 1.3.2 Elektrofiziološke značilnosti transgenih sevov *rdgC*

Mlade do tri dni stare *rdgC* mušice, pri katerih degeneracija fotoreceptorskih celic še ni nastopila, imajo normalen elektroretinogram, značilen za divji tip *Drosophila*. Vzporedno z degeneracijo strukture se z dnevi degradira tudi ERG. Tri dni po izpostavitvi živali svetlobi je odgovor še v mejah normale, po petih dneh pa ostane le še potencial, generiran s celicami R7 in R8. ERG mušic, 2 tedna gojenih v temi, je popolnoma normalen. Tudi *rdgC* mutante, gojene na z vitaminom A revnem gojišču, imajo normalen ERG (Steele et al. 1990).

Vinos s sodelavci (Vinos et al. 1997) navaja defekt inaktivacije ERG pri mladih *rdgC* mušicah, kar pojasnjuje z navidezno zakasnelo repolarizacijo po pulzu oranžne svetlobe. Poleg tega naj bi bila količina svetlobe, ki izzove PDA, pri *rdgC* mušici enaka kot pri

mušici z okvarjenim genom *arr2* (Vinos et al. 1997). Deaktivacijski defekt je lahko posledica kopičenja kompleksov metarodopsin – arestin 2 in internalizacije le teh. Za deaktivacijo receptorske molekule zato ostaja vedno manj arestinskih molekul (Belušič 2003).

Amplituda odgovora se vzporedno zmanjša, z manjšanjem števila celic, ki po degeneraciji prispevajo k ERG. Študije rezidualnega ERG na *sev;rdgC* mušicah do sedaj še niso bile narejene. Idejno gre za razširitev študije opravljene na *rdgC* sevu (Šuštar 2004).

#### 1.4 PROBLEMI IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen našega raziskovalnega dela je bil osvetliti vlogo fosforilacije rodopsina pri *Drosophila melanogaster* v procesu inaktivacije rodopsina. Zanimalo nas je, ali obstaja alternativna pot inaktivacije rodopsinske molekule, brez procesa fosforilacije in morda celo brez interakcije z arestinom. Alternativni mehanizem bi tako omogočil izogib z arestinom posredovani internalizaciji rodopsina in nadaljnji programirani celični smrti.

Dosedanje študije fotoreceptorjev mutantnih sevov vinske mušice z okvarjenim encimom za defosforilacijo rodopsina, kažejo, da so le ti podvrženi hitri, s svetlobo posredovani degeneraciji. Vendar degeneracija ni popolna, saj lahko pri poljubno starih živalih izmerimo rezidualni ERG. Raziskave strukture nakazujejo, da centralni razredi fotoreceptorskih celic preživijo dlje, kakor periferni (Steele et al. 1990). Domnevali smo, da naj bi se apoptozi izognile le tiste R8 fotoreceptorske celice, ki vsebujejo rodopsin Rh6, saj je le ta termično labilen in spontano prehaja iz metarodopsinske v rodopsinsko obliko (Salcedo et al. 1999). V tem primeru fosforilacija rodopsina in vezava arestina nista potrebni za regeneracijo molekule, posledično pa se te celice izognejo apoptozi.

Hipotezo smo želeli preveriti z meritvijo spektralne občutljivosti pri na svetlobi gojenih transgenih mušicah z od fosforilacije rodopsina odvisno degeneracijo fotoreceptorjev (sev *rdgC* in *sev;rdgC*). Osredotočili smo se na mušice z napredovano degeneracijo, pri katerih smo pričakovali vrh spektralne občutljivosti v zelenem delu svetlobnega spektra, značilen

za Rh6 rodopsin. Drug indic za selektivno ohranitev celic z rodopsinom Rh6 je meritev PDA, ki se ga pri teh celicah ne da izzvati. Kot kontrolno smo uporabili sev *ninaE* z okvarjenim genom za rodopsin Rh1, pri katerem so funkcionalni le centralni receptorji R7 in R8 in sev z dvojno mutanto *sev;ninaE* pri katerem je od centralnih fotoreceptorjev funkcionalen le še R8 razred receptorskih celic.



## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 POSKUSNE ŽIVALI

Objekt naših raziskav so bile belooke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), ki v pigmentnih in fotoreceptorskih celicah nimajo zaščitnega pigmenta. Sevi izvirajo z Oddelka za biosenzoriko, Inštituta za fiziologijo, Fakultete za naravoslovne znanosti Univerze Hohenheim v Stuttgartu, Nemčija, in z Oddelka za biologijo Univerze Notre Dame, Indiana, ZDA.

V poskusih smo uporabili naslednje mutantne seve *Drosophila melanogaster*:

a) Sev *rdgC*<sup>P306</sup> (v nadaljevanju *rdgC*):

Gen *rdgC* kodira serinsko-treoninsko fosfatazo, ki se izraža v očeh, ocelih in gobastih telescih v možganih (Steele et al. 1992). Mutacija tega gena vodi v svetlobno odvisno hiperfosforilacijo rodopsina in kasnejšo degeneracijo fotoreceptorjev zaradi kopičenja kompleksov arestina in rodopsina, pakiranja le teh v endosome in proženja signala za apoptozo (Kiselev et al. 2000). Degeneracija nastopi s časovnim zamikom in ne zaobjame vseh fotoreceptorskih celic v omatidiju. Tri dni po začetku osvetljevanja kažejo celice R1–R6 prve znake degeneracije, medtem ko ostajajo centralne celice R7 in R8 nespremenjene. Dva dni kasneje so celice R1–R6 popolnoma degenerirane, znaki degeneracije pa se začnejo pojavljati tudi na centralnih fotoreceptorjih celicah, morda kot posledica apoptotskih procesov okoliških celic. Proces degeneracije se odraža tudi v elektroretinogramu. Mlade ali v temi gojene *rdgC* mušice imajo normalen ERG, značilen za divji tip. Vinos in sodelavci (1997) navajajo posebnosti 0-1 dan starih *rdgC* pri inaktivaciji ERG, medtem ko drugi avtorji ne opažajo razlik (Belušič 2003). Z dnevi izpostavljenosti svetlobi se, vzporedno s strukturnimi spremembami, spreminja ERG. Rezidualni ERG je posledica depolarizacije celic R7 in R8 (Steele in O'Tousa 1990). Odprta ostajajo mnoga vprašanja v zvezi s fosforilacijo in programirano celično smrtjo, zato je sev *rdgC* jedro naših raziskav in delovne hipoteze.

Preliminarne raziskave so pokazale, da fotoreceptorji pri izvornem sevu *rdgC* iz Inštituta za Zoologijo, Univerze v Karlsruhe, ne kažejo znakov apoptoze, temveč le znake delne izgube rodopsina. Verjetno so se pri tem sevu spontano pojavili kompenzacijski mehanizmi, s katerimi fotoreceptorji obidejo popolno degeneracijo. Zato smo za našo raziskavo uporabili sev, ki je bil uporabljen v izvornih raziskavah avtorja O'Touse, z oddelka za biologijo Univerze Notre Dame, Indiana, ZDA. Sev nam je prijazno odstopil sam profesor Joseph O'Tousa.

b) Sev *ninaE*<sup>P17</sup> (v nadaljevanju *ninaE*):

Gen *ninaE* kodira prevladujoči razred opsina, sestavni del rodopsina 1, ki ga najdemo v receptorskih celicah R1-6. Ob mutaciji (natančneje deleciji) tega gena ostanejo celice R1-6 brez rodopsina, zato so nefunkcionalne. Rezidualni ERG mutant *ninaE* je posledica delovanja centralnih receptorjev R7 in R8. Ker ne vsebujejo rodopsina Rh 1, jih mutacija ne prizadene. Ime *ninaE* izhaja iz opaženega fenotipa pri mutantah z izredno nizko vsebnostjo rodopsina, pri katerih PDA ni mogoče izzvati (*nina* – neither inactivation nor afterpotential).

c) Sev *sev*:

Ime izvira iz okrajšave »sevenless«, kar pomeni brez R7 fotoreceptorjev. V tem sevu se nikoli ne razvije R7 razred receptorjev. Posledično vsebujejo vsi R8 fotoreceptorji le Rh6 rodopsin.

d) Sev A35:

To je belooka različica divjega tipa (wt), sev Oregon R. Rodopsini, ki se pojavljajo znotraj posameznih centralnih receptorjev omatidija, se izražajo v nespremenljivih parih in sicer R7 z Rh3 rodopsinom bo vedno v paru z receptorjem R8 in Rh5 rodopsinom, ter R7 receptor z Rh4 rodopsinom z R8 in Rh6 rodopsinom.

e) Sev dvojne mutante *sev;ninaE*:

Dvojna mutanta vzgojena v okviru diplomskega dela po standardnih postopkih križanj brez rekombinacije v katerem se lastnosti sevov *sev* in *ninaE* neprekrivajoče dopolnjujejo (glej zgoraj). Funkcionalni ostanejo le fotoreceptorji razreda R8 z rodopsinom Rh6.



f) Sev dvojne mutante *sev;rdgC*:

Dvojna mutanta vzgojena v okviru diplomskega dela po standardnih postopkih križanj brez rekombinacije v katerem se lastnosti sevov *sev* in *rdgC* neprekrivajoče dopolnjujejo (glej zgoraj). Po degeneraciji fotoreceptorjev R1-6 ostanejo funkcionalni le fotoreceptorji razreda R8 z rodopsinom Rh6.

### 2.1.1 Postopek in shematski prikaz križanja sevov *sev* z *ninaE* in z *rdgC*

V shematskem prikazu križanja sta alela posameznega kromosoma mušice ločena z vodoravno ulomkovo črto, kromosomi med seboj pa s podpičjem. Prikazani so kromosomi v zaporedju: spolni, avtosom 2, avtosom 3; avtosoma 4 ne prikazujemo. Znak + pomeni, da na kromatidi kromosoma ni nobene spremembe glede na divji tip. Znaki *yw*, *CyO* in *Sb* so markerji, ki jih fenotipsko vidimo kot: *yw* – (»yellow-white«) svetlejše in bolj prosojno telo, *CyO* – (»curly wings«) kodrasta krilca, *Sb* – (»stubble«) toge torakalne dlačice. Ti zunanji znaki nam pomagajo pri selekcioniranju pravih potomcev, ki jih uporabimo za naslednji korak – potomec križanja se nahaja pod križcem njegovih staršev. Homozigotno potomstvo smo vzredili z uporabo t.im. balancer kromosomov, ki: (1) nosijo zunanji marker (*CyO*, *Sb*), (2) se ne rekombinirajo z avtosomnimi aleli in (3) so homozigotno letalni. Križanje je potekalo tudi na spolnem kromosomu X, ki se ne rekombinira z Y, zato vzreja homozigotnega potomstva ne zahteva posebnih postopkov. V šestem koraku (v šesti generaciji) smo dobili zelene križance, ki smo jih še elektrofiziološko pregledali in potrdili odsotnost R1-6 in R7 receptorskih celic:

**Preglednica 2:** Shematski prikaz postopka križanja sevov *sev* in *ninaE*

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \times \frac{yw \ CyO \ Sb}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev \ CyO \ Sb}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \times \frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{+} \times \frac{yw}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{ninaE}{ninaE}$$

$$\frac{sev}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{ninaE} \times \frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{ninaE} \times$$

$$\frac{sev}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{ninaE}$$

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{ninaE}{ninaE} \times$$

$$\frac{sev}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{ninaE}{ninaE}$$

**Preglednica 3:** Shematski prikaz postopka križanja sevov *sev* in *rdgC*

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \times \frac{yw \ CyO \ Sb}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev \ CyO \ Sb}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \times \frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{+} \times \frac{yw}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{rdgC}{rdgC}$$

$$\frac{sev}{y} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{rdgC} \times \frac{sev}{sev}^{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+} \frac{\square}{+}$$

$$\frac{sev^{i+} \square + \square}{+} \frac{\square}{rdgC} \quad X$$

$$\frac{sev}{y} \frac{\square}{+} \frac{Sb}{+} \frac{\square}{rdgC}$$

$$\frac{sev \quad \square \quad rdgC}{sev^{i+} + rdgC} \quad X \quad \frac{sev \quad \square \quad rdgC}{y^{i+} + rdgC}$$

Mušice so bile gojene v dvoje različnih svetlobnih pogojih. Prvi set smo gojili na 12-urnem dnevno-nočnem ciklu, pri 21°C. Osvetljene so bile z dvema 18 W fluorescentnima žarnicama Osram Cool White, ter eno 7 W fluorescentno UV žarnico (emisija od 300 do 400 nm, vrh pri 360 nm) na razdalji 30 cm. Drugi set smo gojili v popolni temi znotraj inkubatorjev, pri 21°C. Receptura gojišča sledi v prilogi.

Preučevali smo fenotip degeneriranih *rdgC* in *sev;rdgC* mušic, zato smo v glavnem sklopu naredili poskuse na najmanj 5 dni starih, že degeneriranih mušicah *rdgC* in, zaradi primerljivosti rezultatov, na enako starih mušicah *ninaE* in *sev;ninaE*. Stopnjo degeneracije pri sevih *rdgC* in *sev;rdgC* smo ugotavljali z opazovanjem pod lupo. Pri živalih s popolnoma funkcionalnimi fotoreceptorji je opazna tako imenovana globoka psevdopupila, zatemnitev v notranjosti sestavljenega očesa, ki nastane zaradi superpozicije senc rabdomov fotoreceptorjev R1-R6. Degenerirane *rdgC* mušice zaradi odsotnosti fotoreceptorjev R1-R6 psevdopupile nimajo. Zgornja starostna meja poskusnih živali je bila 15 dni, saj je ERG starejših *rdgC* mušic zaradi propadanja receptorskih celic izredno nestabilen in zato neprimeren za kvantitativno analizo. Eksperiment je bil postavljen sistematično, kar je predvsem optimiziralo čas pridobivanja pravih starostnih skupin eksperimentalnih osebkov. Dnevno smo odbirali sveže izlegle mušice. Vse paralelne skupine poskusnih živali smo ločeno starali v njihovih gojiščih v dvoje različnih svetlobnih pogojih. Meritve smo opravljali v treh različnih starostnih kategorijah: 0-3 dni, 5-8 dni in 10-15. Iz vsake kategorije smo vzeli vsaj 4 osebkove, na katerih smo opravili potrebne raziskave. Skupno smo zbrali podatke od vsaj  $6 \times 2 \times 3 \times 4 = 144$  osebkov: šest različnih transgenih sevov (*A35*, *ninaE*, *rdgC*, *sev*, *sev;ninaE*, *sev;rdgC*), dvoje različnih svetlobnih režimov (dnevno nočni cikel in tema), tri starostne skupine (0-3 dni, 5-8 dni in 10-15 dni) s po vsaj štirimi poskusnimi živalmi.

### 2.1.2 Preparacija poskusne živali

Kakovost ERG je v veliki meri odvisna od preparacije, ki mora zagotavljati čim daljšo obstojnost preparata in hkrati popolno imobilizacijo živali. Za lažjo pritrditev mušice smo odstranili noge in ji glavo vklelili v jarem na bakrenem nosilcu tako, da je bilo eno oko pod ustreznim kotom usmerjeno proti svetlobnem viru. Da bi preprečili gibanje, smo mušici z mešanico čebeljega voska in kolofonije zalepili toraks in proboscis na podlago. Nosilec z živaljo smo nato vstavili na mizico mikromanipulatorja v Faradayevi kletki, ki poleg električne nudi tudi svetlobno izolacijo.

## 2.2 FOTOSTIMULACIJA

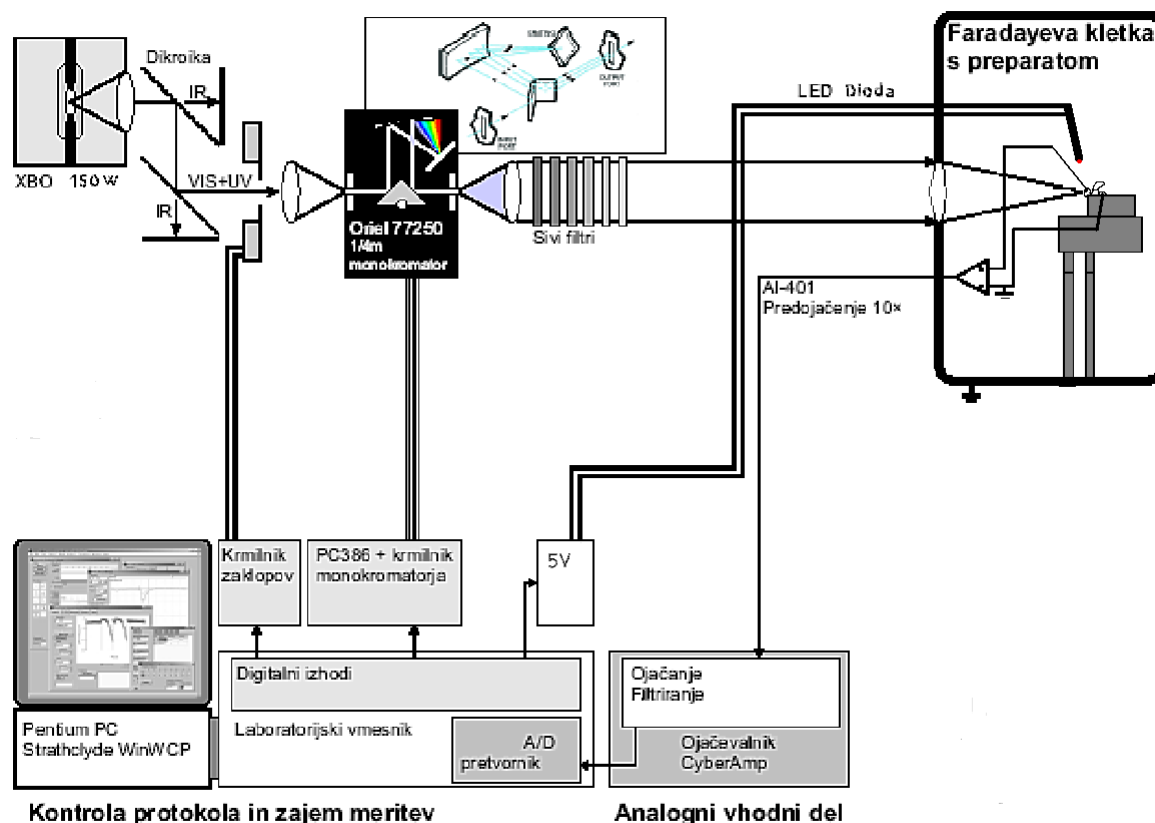
### 2.2.1 Svetlobni vir

Glavni vir svetlobe je bila ksenonova žarnica tipa XBO z močjo 150 W (Osram, Nemčija). V začetni fazi smo svetlobi z dvema, periskopsko postavljenima hladnima zrcaloma eliminirali infrardeči del spektra. Ohlajeno svetlobo smo z lečo zbrali na vhodni reži računalniško vodenega monokromatorja Oriel 77250 (Oriel, Stratford, ZDA).

Širino vhodne in izhodne reže smo ročno prilagajali skladno s protokolom. Širina reže 1,5 mm zagotavlja svetlobni pas 5 nm, kar je pomembno pri merjenju spektralne občutljivosti, da ne pride do mešanja svetlob različnih valovnih dolžin. Pri merjenju spektralne učinkovitosti smo se pomikali skozi svetlobni spekter od 300 do 600 nm s koraki po 5 nm, za izzvanje PDA smo uporabili svetlobo valovne dolžine 360 in 473 nm.

Dolžino svetlobnega pulza smo uravnavali z računalniško vodenim zaklopom (Compur, Nemčija), nameščenim pred monokromatorjem. Svetlobne žarke iz monokromatorja smo kolimirali z vmesno zbiralno lečo. V naslednji fazi žarkovne poti smo v optično os po potrebi ročno vstavljali refleksijske nevtralno sive filtre (Melles Griot, Zeevenar,

Nizozemska). Sledila je še objektna leča, s katero smo svetlobo zbrali na preparat. Vse komponente žarkovne poti prepuščajo UV svetlobo.



Slika 6: Shema eksperimentalne postavitve

### 2.2.1.1 Emisijski spekter ksenonove žarnice

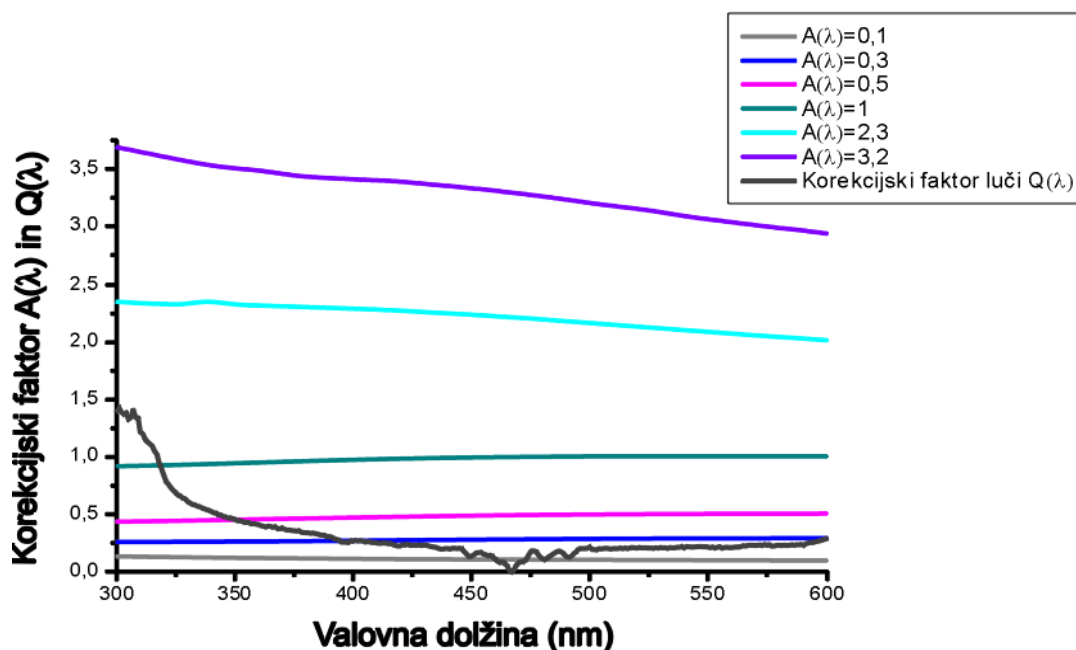
Pri izračunu spektralne občutljivosti očesa smo morali upoštevati karakteristike svetlobnega vira. Gostota fonskega toka vzdolž spektra močno variira, zato je potrebno pri izračunu upoštevati ustrezne normalizacijske faktorje za fonski tok glede na valovno dolžino. S termočlenom (Oriol, Stratford, ZDA) smo izmerili gostoto energijskega toka pri posamezni valovni dolžini od 300 do 600 nm v korakih po 5 nm. Po Planckovi enačbi smo izračunali gostoto fonskega toka. Dobljene vrednosti smo normalizirali na maksimalno vrednost in



logaritmiral. Negativni logaritem fotonskega toka smo uporabili kot korekcijski faktor  $Q(\lambda)$  v izračunu spektralne občutljivosti.

### 2.2.1.2 Absorbanca sivih filtrov

Pri merjenju jakostnih krivulj in spektralne občutljivosti smo svetlobo atenuirali s kombinacijo 6 nevtralnno sivih filtrov. Absorbance 3.2, 2.3, 1, 0.5, 0.3 in 0.1 se skozi spekter nekoliko razlikujejo, zato smo kot korekcijski faktor  $A(\lambda)$  uporabili negativni logaritem tovarniško podanih vrednosti prepustnosti filtrov (glej sliko).



Slika 7: Korekcijski faktor nevtralnno sivih filtrov in ksenonove žarnice

## 2.3 REGISTRACIJA ERG

Steklene kapilare iz borosilikatnega stekla z zunanjim premerom 1.5 mm, notranjim premerom 0.7 mm in filamentom 10  $\mu\text{m}$  smo na "pullerju" P-97 (Sutter, Novato, ZDA) oblikovali v pipete z odprtino cca 10  $\mu\text{m}$  in upornostjo v kiloohmskem razredu. Napolnili smo jih z Davenportovo raztopino (receptura v prilogi), jih vstavili v nosilec z Ag/AgCl žico

(ALA Scientific Inst., Westbury, ZDA) in tako naredili zunajcelične registracijske elektrode. Nosilec z elektrodo smo pritrdili na ročni manipulator (Narishige, Tokio, Japonska) z motorizirano Z-osjo (Maerzhauser, Wetzlar, Nemčija). S polavtomatsko mikromanipulacijo smo predrli korneo in namestili konico elektrode čim bližje površini. Za izdelavo indiferentne elektrode smo uporabili 50  $\mu\text{m}$  klorirano srebrno žico. Nosilec indiferentne elektrode smo pritrdili na bakren blok s preparatom in jo med preparacijo s pinceto namestili v toraks.

Signal, ki smo ga odvajali iz očesa, smo s predojačevalnikom AI 401 desetkratno ojačali in peljali na obdelovalnik signala CyberAmp 320 (Axon Instruments Inc., Union City, ZDA). Izravnali smo potencialno razliko med elektrodama, signal dodatno ojačali (20 do 100-krat) in ga filtrirali z nizkopasovnim filtrom ( $f_c=200$  Hz). Za digitalizacijo signala smo uporabili 12 bitni vmesnik CED 1401+ (CED, Cambridge, Velika Britanija), in ga na PC Pentium računalniku zapisovali s programom Whole Cell Analysis Program (WCP), verzija 3.5.6 (avtor prof. John Dempster, Univerza Strathclyde, Velika Britanija). Poleg zapisa signala program prek digitalnih izhodov omogoča krmiljenje zaklopa, ter drugega računalnika za nadzor monokromatorja.

## 2.4 EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI

### 2.4.1 PDA protokol

Ta protokol smo uporabili na vseh osebkih vseh mutant, ki smo jim kasneje izmerili tudi jakostno krivuljo in spektralno občutljivost (protokola opisana v nadaljevanju). Pet črkovne kratice pomenijo krajšave zaporedja različnih valovnih dolžin svetlobnih pulzov uporabljenih v protokolu. O-oranžna pri 580 nm, B-modra pri 473 nm, U-ultravijolična pri 360 nm. Podatki pridobljeni s tem protokolom nam služijo kot pokazatelj funkcionalnosti posameznih razredov fotoreceptorskih celic. Prva tretjina (OBBOO) protokola preverja prisotnost PDA stanja (zato tudi PDA protokol) R1-6 receptorskih celic, katerih rodopsin Rh1 ima  $\alpha$  absorpcijski pas v modrem. Osrednja tretjina protokola (BUUBB) preverja prisotnost PDA v ultravijoličnem delu spektra. Tukaj so vrhovi Rh3 in Rh4 rodopsina R7

receptorjev. Ponovitev prve tretjine (OBBOO) protokola le preverja, če se razmerje rodopsina in metarodopsina vrne v predhodno ravnovesje.

Protokol smo začeli s 5 sekundnim pulzom pri 580 nm, ki je ves metarodopsin konvertiral v rodopsinsko obliko. Po 15 sekundni pavzi je sledil prvi pulz modre svetlobe (473 nm), v razmaku 15 sekund pa drugi, oba dva z namenom izzvanja PDA. Sledila sta še dva oranžna pulza z enakim trajanjem in enako vmesno pavzo kot prej, ki sta podaljšani depolarizacijski popotencial (PDA) vrnila na mirovno vrednost. Protokol ponovimo, le da smo tokrat uporabili kot prvi pulz modro svetlobo (473 nm), sledila sta dva ultravijolična (360 nm) pulza z enakim trajanjem in enako vmesno pavzo kot prej in še dva v modrem. Od tukaj se zopet ponovi zaporedje prvotnih svetlobnih pulzov, torej en oranžen, dva modra in dva oranžna z enakim trajanjem in enako vmesno pavzo kot prej.

V primeru velike amplitude odgovora *rdgC* in *sev;rdgC* mutant ter z modro svetlobo izzvanega PDA smo dokazali prisotnost celic R1-6 in nepopolno degeneracijo. Protokol smo načeloma izvajali s spektralno ozkopasovnim dražljajem.

#### 2.4.1.1 Inaktivacija fotoreceptorjev R1-6 in izolacija ERG R7 in R8

Pred meritvijo jakostne krivulje in spektralne občutljivosti smo vse osebke osvetlili z 20 sekundnim pulzom modre svetlobe pri 473 nm. Takšen pulz je v fotoreceptorjih R1-6 pretvoril 80% rodopsina v metarodopsin in jih maksimalno depolariziral, torej izzval PDA. Tako smo inaktivirali R1-6 razred fotoreceptorjev in izolirali elektroretinogram centralnih fotoreceptorjev. Pri naknadnem draženju oči smo uporabili dovolj kratke in šibke svetlobne pulze drugih valovnih dolžin, da nismo prekinili PDA v celicah R1-6.

#### 2.4.2 Meritve jakostne krivulje

Izvedba meritev jakostnih krivulj je bila predpogoj meritvam in izračunu spektralne občutljivosti. Odnos med logaritmom intenzitete dražljaja in amplitudo odgovora pri skrajnih jakostnih vrednostih ni več linearen, zato lahko pri merjenju spektralne učinkovitosti prihaja do nezanesljivih izračunov. Predhodna meritve jakostne krivulje nam je služila pri izbiri ustrezne atenuacije dražljaja, tako da so se kasneje odgovori skozi celoten spekter nahajali

znotraj linearne območja odnosa med amplitudo in logaritmom intenzitete. Poleg tega smo parametre jakostne krivulje potrebovali za kasnejši izračun spektralne občutljivosti.

Protokol jakostne krivulje smo izvedli pri valovni dolžini 520 nm, ker je v tem delu spektra oko uporabljenih transgenih *Drosophil* najbolj občutljivo. Svetlobni vir smo zasenčevali s kombinacijami sivih filtrov, ki so prepuščale od  $-6$  log do polne svetlobe v korakih po 0,5 log enote. Svetlobni pulz je venomer trajal eno sekundo. Po meritvi in pred meritvijo spektralne občutljivosti smo živali znova izpostavili močni modri svetlobi (gl. prejšnje podpoglavje 2.4.1.1).

### 2.4.3 Meritve spektralne učinkovitosti

Ob merjenju velikosti odgovorov na dražljaje različnih valovnih dolžin ne upoštevamo karakteristik svetlobnega vira, zato lahko v tej fazi govorimo zgolj o spektralni učinkovitosti. Spektralno občutljivost dobimo šele s kasnejšim izračunom.

Vse osebke smo najprej osvetlili z 20 sekundnim pulzom modre svetlobe pri 473 nm (gl. podpoglavje 2.4.1.1). V nadaljevanju protokola smo dražili s 100 ms svetlobnimi bliski, z valovnimi dolžinami od 300 do 600 nm v korakih po 5 nm. Širino reže monokromatorja smo nastavili na 0.5 mm (svetlobni pas 5 nm). Svetlobo smo atenuirali s kombinacijo nevtralnno sivih filtrov, ki smo jo poprej določili z merjenjem jakostne krivulje. V večini primerov smo uporabili kombinacijo filtrov, ki so prepuščali  $10^{-2}$  prvotne svetlobe. Na ta način smo odgovor oči ohranili znotraj loglinearnega dela jakostne krivulje.

## 2.5 OBDELAVA REZULTATOV

### 2.5.1 Uporabljen programski orodja

Signal smo zapisali v programu WCP in naredili osnovne analize odvisnosti amplitude odgovora od valovne dolžine ali jakosti svetlobe. Amplitudo odgovora smo merili na

platojskem delu ERG. Numerične podatke smo prenesli v Microsoft Excel (Microsoft, ZDA) ali Origin 7.0 (OriginLab Corp., Northampton, ZDA) ali Prism 4.03 (GraphPad Software, ZDA) za nadaljnjo obdelavo. Za slikovni prikaz elektroretinogramov smo signale obdelali s programom CorelDraw (Corel Corp., Ottawa, Canada).

### 2.5.2 Statistična obdelava rezultatov

Po potrebi smo naredili statistično analizo pomembnosti razlik med dvema skupinama s Studentovim T-testom v programu Microsoft Excel. Student T-test izračuna verjetnost (p), da dve skupini podatkov pripadata isti populaciji. Če je  $p < 0.05$ , se dve skupini statistično pomembno razlikujeta.

### 2.5.3 Prilagajanje jakostne krivulje

Prilagajanje (curve fitting) jakostne krivulje smo izvedli v programu Origin 7.0 s prilagajanjem Hillove funkcije. Odnos med velikostjo odgovora in logaritmom jakosti svetlobe izračunati po funkciji, ki sta jo Matić in Laughlin (1981) zapisala v naslednji obliki:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{I^n}{I^n + EC50^n} = \frac{\left(\frac{I}{EC50}\right)^n}{1 + \left(\frac{I}{EC50}\right)^n} = Z \quad (1)$$

kjer je  $V$  = amplituda odgovora,  $V_{\max}$  = maksimalna amplituda odgovora,  $EC50$  = jakost dražljaja, ki izzove polovico maksimalnega odgovora ( $EC50$  se lahko navaja tudi kot  $I_{50}$  ali  $k$ ; enačbe so povzete po biokemijski literaturi, zato bomo v nadaljevanju namesto  $EC50$  raje uporabljali  $I_{50}$ ),  $I$  = intenziteta svetlobe in  $n$  = Hillov koeficient, ki opisuje strmino krivulje.

Pri  $z = V/V_{\max}$  po logaritmiranju dobimo:

$$\log\left(\frac{Z}{1-Z}\right) = n(\log I - \log EC50) \quad (2)$$

Če naneseemo na graf  $\log(z/(1-z))$  v odvisnosti od  $\log I$ , dobimo premico z naklonom  $n$ ,  $I_{50}$  pa je enak obratni vrednosti intenzitete, ko je  $V/V_{\max} = 0.5$ , to je pri  $\log(z/(1-z)) = 0$ .

Parametra  $n$  in  $I_{50}$  sta uporabna za vrednotenje lastnosti očesa. Naklon premice ponazarja dinamično območje svetlobnih jakosti, v katerem je oko funkcionalno (večja strmina pomeni ožje območje delovanja), intenziteta, ki izzove polovico maksimalnega odgovora, pa ima informativno vrednost glede občutljivosti očesa (nižja vrednost  $I_{50}$  pomeni večjo občutljivost).

#### 2.5.4 Izračun spektralne občutljivosti

Relativna spektralna občutljivost je definirana kot funkcija, ki prikazuje recipročne vrednosti faktorjev  $f$  za posamezne valovne dolžine. Faktor  $f$  pove, kolikokrat bi morali povečati intenziteto svetlobe pri dani valovni dolžini, da bi celica odgovorila kot pri svetlobi najbolj učinkovite valovne dolžine in prvotne intenzitete (Hamdorf in Schwemer 1975).

Iz izpeljanke Hillove eksponentne funkcije:

$$\log I = \log EC50 + \frac{1}{n} \left( \log \frac{V}{V_{\max} - V} \right) \quad (3)$$

lahko za odgovor celice na dražljaj pri vsaki valovni dolžini  $V(\lambda)$  izračunamo efektivno intenziteto  $I(\lambda)$ , ki bi pri kriterijski valovni dolžini sprožila prav tak odgovor. Negativni logaritem iskanega faktorja  $f$  lahko potem zapišemo kot vsoto efektivne intenzitete  $I(\lambda)$  ter korekcijskega faktorja luči  $Q(\lambda)$  in filtrov  $A(\lambda)$ :

$$-\log f(\lambda) = Q(\lambda) + A(\lambda) + \log I(\lambda) \quad (4)$$

Relativno spektralno občutljivost izračunamo kot obratno vrednost faktorja  $f$ :

$$S(\lambda) = 1/f(\lambda) = 10^{-\log f} \quad (5)$$

Izračunane vrednosti spektralne občutljivosti smo zaradi medsebojne primerljivosti spektrov različnih sevov mušic normirali na povprečno vrednost enega izmed vrhov krivulje.

### 2.5.5 Prilagajanje krivulje spektralne občutljivosti

Krivuljo spektralne občutljivosti smo prilagajali po predpostavki Stavenga (2000), da je možno absorpcijske pasove rodopsina opisati z modificirano eksponentno funkcijo, podobno Gaussovi:

$$\varepsilon = A \exp [-a_0 x^2 (1 + a_1 x + a_2 x^2)] \quad (6)$$

kjer je  $x = \log(\lambda/\lambda_{\max})$ ,  $\lambda_{\max}$  pa absorpcijski vrh pasu posameznega rodopsina. Vidne karakteristike rodopsina so v največji meri odvisne od  $\alpha$  – absorpcijskega pasu. Zato smo krivuljo spektralne občutljivosti prilagajali kot seštevek  $\alpha$  – pasov rodopsinov Rh3, Rh4, Rh5 in Rh6. Konstante eksponentne funkcije za  $\alpha$  – pas znašajo:  $A = 1$ ,  $a_0 = 380$ ,  $a_1 = 6.09$ ,  $a_2 = 3 a_1^2/8 = 13.9$

Prilagajanje krivulje spektralne občutljivosti smo izvedli v programu Origin7.0. Program je izračunal sorazmerni prispevek posameznega rodopsina k krivulji spektralne občutljivosti. V kolikor jakostna krivulja, ki smo jo tekom eksperimentov pridobili, ni vsebovala območja saturacije – nasičenja odgovora, s prilagajanjem Hillove enačbe ni bilo mogoče natančno ugotoviti vrednosti  $V_{\max}$  in  $n$ . Zato smo parametre Hillove funkcije pridobili v postopku reverzne Hillove transformacije. Spektralne občutljivosti, izračunane z reverzno Hillovo transformacijo smo empirično prilagajali nomogramom rodopsina Rh6 in tako prilagodili (»fitting«) parametra  $V_{\max}$  in  $n$ . Parametra sta se zadovoljivo ujemala z vrednostmi iz postopka prilagajanja (fitanja) po Hillu. Vendar je bila na ta način ocena zanesljivosti prilagajanja mnogo višja.

### 3 REZULTATI

Največji delež diplomskega dela je obsegal postopek križanja sevov *sev*, *rdgC* in *ninaE*. Pri mušicah, katerih zunanji telesni markerji (gl. Material in metode) so indicirali uspešno križanje, smo opravili še elektrofiziološka testiranja. Elektoretinogrami, s katerimi smo pokazali, da dvojno mutirani sevi združujejo zelene mutacije, so del rezultatov, prikazanih v nadaljevanju poglavja. Na tem mestu izpostavljam, da smo pri dvojnih mutantah kontrolirali prisotnost spodaj navedenih fenotipskih značilnosti ERG.

- a) uspešen prenos mutacije *sevenless* smo ugotavljali na osnovi:
  - odsotnosti z UV svetlobo izzvanega PDA centralnih fotoreceptorjev
  - spektralne občutljivosti centralnih fotoreceptorjev, izmerjene po inaktivaciji R1-6 z modro svetlobo, ki spominja na absorpcijski spekter rodopsina R6 ( $\lambda_{\max}=515$  nm)
- b) uspešen prenos mutacije *ninaE* smo ugotavljali na osnovi:
  - odsotnosti globoke psevdopupile zaradi okvare gena za rodopsin Rh1 (celice R1-6)
  - odsotnosti z modro svetlobo izzvanega PDA receptorjev R1-6
  - odsotnosti »On« in »Off« tranzientov, značilnih za sinapse med R1-6 in LMC nevroni
- c) uspešen prenos mutacije *rdgC* smo ugotavljali na osnovi
  - postopne degeneracije fotoreceptorjev R1-6 (ERG postaja podoben ERG *ninaE*)
  - upočasnjene repolarizacije po močnih svetlobnih pulzih

#### 3.1 PDA PRI RAZLIČNIH TRANSGENIH SEVIH

Podaljšan depolarizirajoči popotencial predstavlja skrajno energijsko obremenitev za fotoreceptorske celice. Izzvati ga je moč le, če je v fotoreceptorjih dovolj rodopsina. Z izbranimi valovnimi dolžinami lahko selektivno inaktiviramo posamezne razrede fotoreceptorjev. Če so celice zdrave, se na prekinitev PDA z dolgovalovno svetlobo odzovejo s hitro repolarizacijo. Prisotnost in kakovost PDA nam je služila kot pokazatelj



integritete posameznih razredov fotoreceptorjev ter vsebnosti rodopsinov v receptorskih celicah.

Primer PDA pri divjem tipu A35, izzvanega z modro in UV svetlobo, ter PDA pri sevu *sev*, izzvanega z modro svetlobo prikazuje slika 8. Sev A35 služi kot kontrola celotnega eksperimenta. Pri tem sevu lahko izzovemo »modri« PDA (pulz 473 nm), ki inaktivira celice R1-6, zatem pa lahko s pulzom 360 nm inaktiviramo še celice R7 (»UV« PDA), ostane le odgovor R8. »Modri« PDA prekinemo z oranžno, »UV« PDA pa z modro svetlobo. Pri sevu *sev* lahko prav tako izzovemo »modri« PDA (pulz 473 nm), ki inaktivira celice R1-6. Ta sev nima R7 celic in zato pulz pri 360 nm ne povzroči »UV« PDA. »Modri« PDA prav tako prekinemo z oranžno svetlobo.

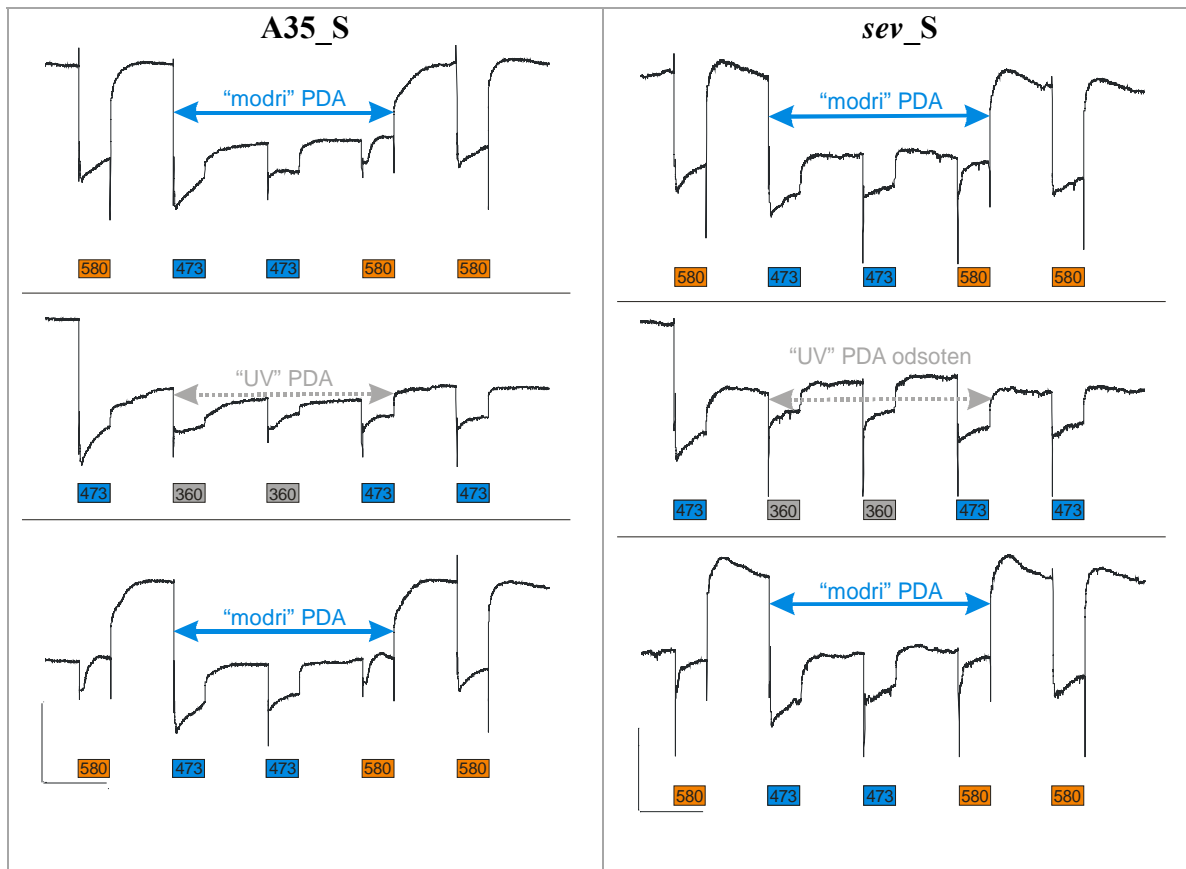
Rezultati na slikah od 9 do 20 so prikazani v naslednjem sosledju transgenih sevov: A35, *ninaE*, *rdgC*, *sev*, *sev;ninaE*, *sev;rdgC*. V levem stolpcu so prikazani ERG mušic, gojenih na svetlobi (12/12h), v desnem stolpcu pa ERG mušic, gojenih v popolni temi. Vsi osebki so bili stari 5-8 dni. S – pri vsaki sliki pomeni svetloba, T pa tema.

V temi gojenih sevih A35, *rdgC*, *sev*, *sev;rdgC* se pojavi upočasnjena repolarizacija ob oranžnem pulzu svetlobe za »modrim« PDA. Razlagamo si jo z metabolno nezadostno podprtimi znotrajceličnimi procesi (Zupančič, G., Meglič, A., ustni vir). Iz nabora sevov in točno specifičnega mesta v protokolu, kjer se ta »utrujenost« pojavlja je razvidno, da se pri vinskih mušicah temno adaptirajo le R1-6 fotoreceptorske celice.

K ERG seva *ninaE* prispevajo le receptorji R7 in R8, zato so ERG *ninaE* podobni ERG sevov A35 in *rdgC* po »modrem« PDA. Tudi ERG nepopolno degeneriranih oči seva *rdgC* tvorijo zgolj odgovori R7 in R8. Zato ERG *ninaE* in A35 po modrem PDA uporabljamo za kontrolo fiziološkega stanja centralnih fotoreceptorjev dvojnih mutant *sev;ninaE* in *sev;rdgC*.

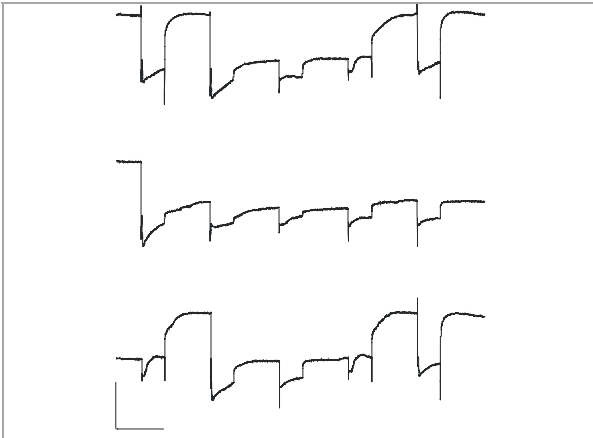
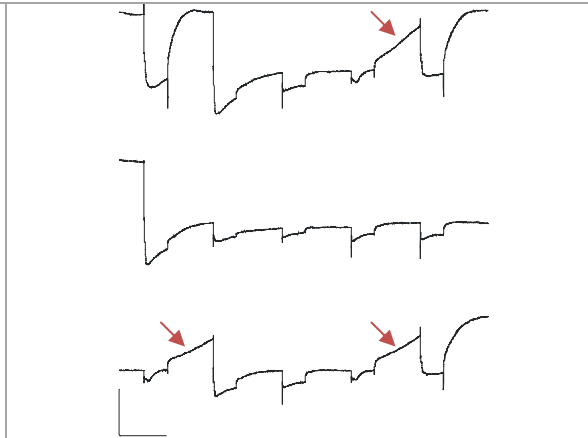
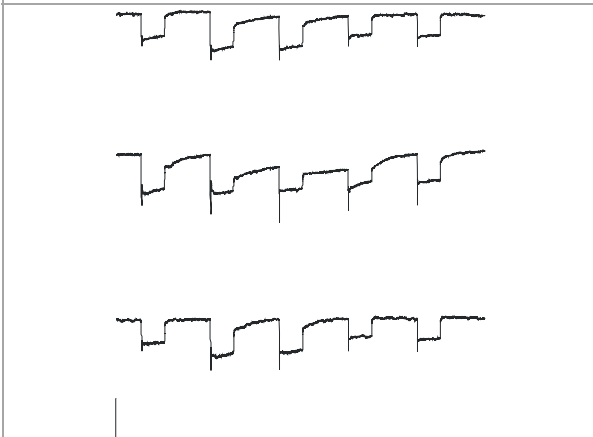
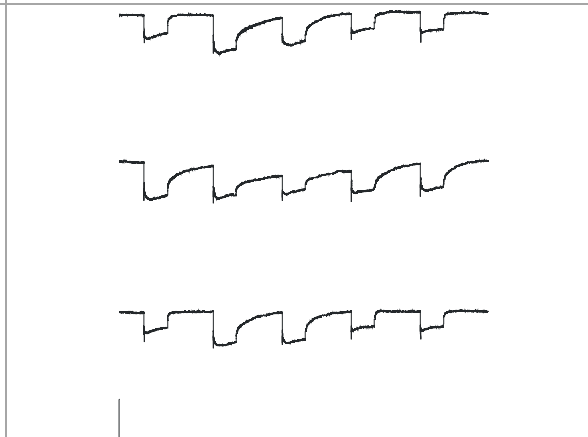
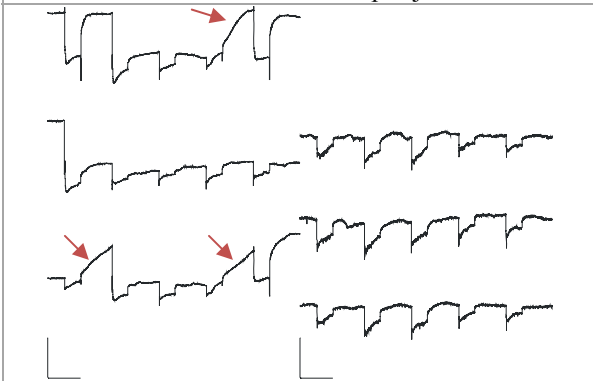
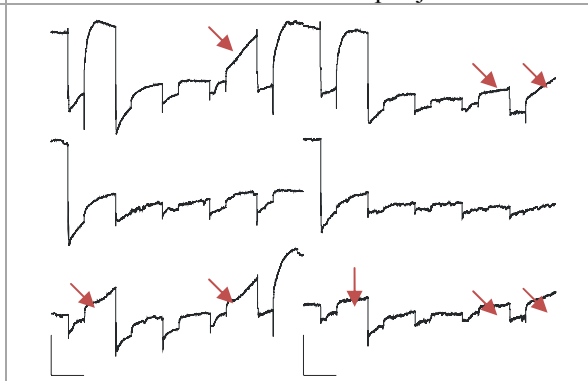
Sev *sev* predstavlja kontrolni sev za dvojni mutanti.

Vsi PDA posnetki so sestavljeni iz treh sledi; gornja prikazuje zapis odgovora izzvanega z OBBOO svetlobnim tretmajem, osrednja sled z BUUBB in spodnja zopet z OBBOO.

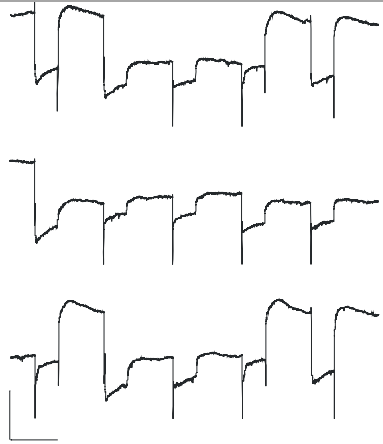
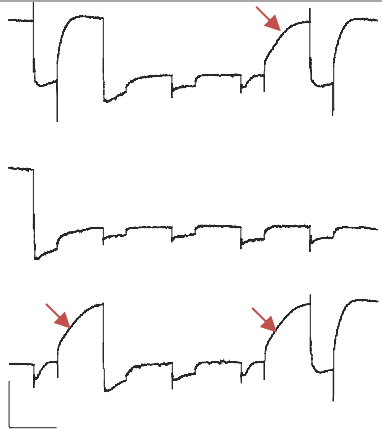
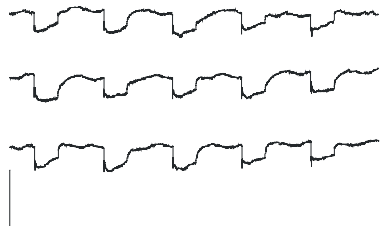
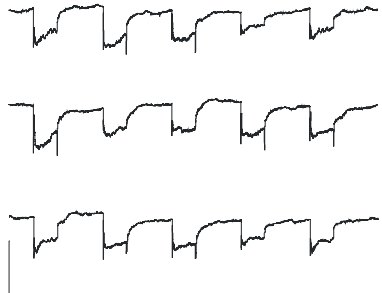
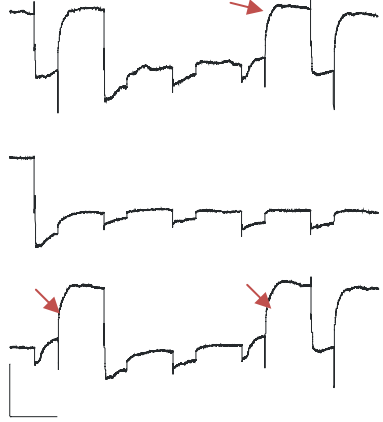
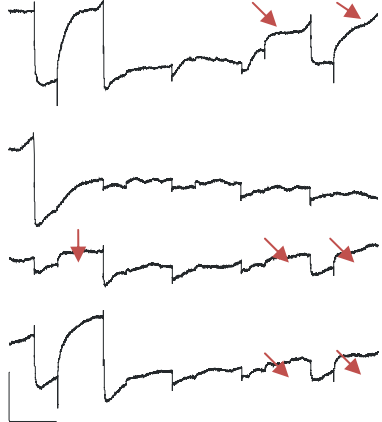


**Slika 8:** Primer ERG posnetka izmerjenega po PDA protokolu pri divjem tipu A35 levo in sevu *sev* desno. Primerka staranja na svetlobi. Neprekinjena meritev skozi vse tri posnetke: OBBOO, BUUBB, OBBOO; O – oranžen (580 nm), B – moder (473 nm), U – ultravijoličen (360 nm) pulz svetlobe.

**Opomba:** na vsakem posnetku je merilce v spodnjem levem vogalu kalibrirano na  $y=10\text{mV}$ ,  $x=10\text{ms}$ .

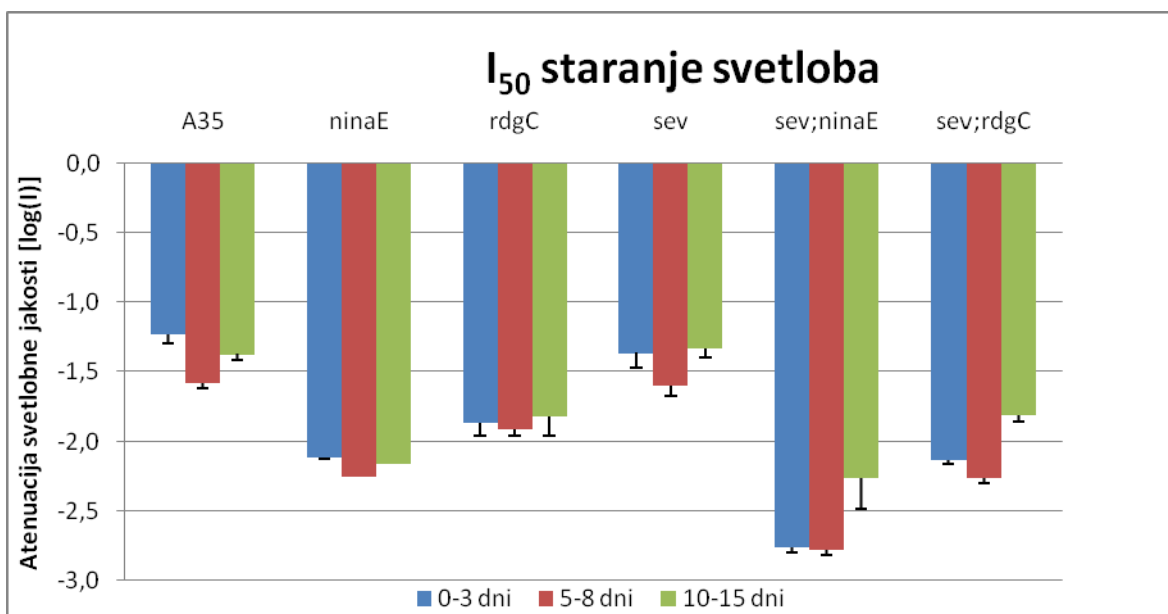
 <p><b>Slika 9:</b> A35_S, PDA protokol                  PDA na vseh sledih, funkcionalni vsi fotoreceptorji</p>	 <p><b>Slika 10:</b> A35_T, PDA protokol                  PDA na vseh sledih, upočasnjena repolarizacija (puščice), funkcionalni vsi fotoreceptorji</p>
 <p><b>Slika 11:</b> <i>ninaE_S</i>, PDA protokol                  Ni »modrega« PDA. »UV« PDA pri srednji sledi, funkcionalni le centralni fotoreceptorji</p>	 <p><b>Slika 12:</b> <i>ninaE_T</i>, PDA protokol                  Ni »modrega« PDA. »UV« PDA pri srednji sledi, funkcionalni le centralni fotoreceptorji</p>
 <p><b>Slika 13:</b> <i>rdgC_S</i>, PDA protokol                  Dva osebka: <b>levi</b> – upočasnjena repolarizacija (puščice) – prvi znaki degeneracije R1-6 receptorjev, PDA na vseh sledih; <b>desni</b> – degeneracija potekla, vprašljiv PDA na osrednji</p>	 <p><b>Slika 14:</b> <i>rdgC_T</i>, PDA protokol                  Dva osebka: oba z različno upočasnjeno repolarizacijo (puščice); <b>desni</b> se vidno »utruga« tekom protokola; funkcionalni vsi fotoreceptorji – R1-6 pešajo</p>

sledi; funkcionalni le centralni fotoreceptorji	
---	--

 <p><b>Slika 15:</b> <i>sev_S</i>, PDA protokol</p> <p>Prisoten le »modri« PDA (zgornja in spodnja sled); ni »UV« PDA; funkcionalni R1-6 in R8 fotoreceptorji</p>	 <p><b>Slika 16:</b> <i>sev_T</i>, PDA protokol</p> <p>Prisoten le »modri« PDA (zgornja in spodnja sled); ni »UV« PDA; upočasnjena repolarizacija (puščice), funkcionalni R1-6 in R8 fotoreceptorji</p>
 <p><b>Slika 17:</b> <i>sev;ninaE_S</i>, PDA protokol</p> <p>Ni »modrega« PDA (<i>ninaE</i> mutacija), ni »UV« PDA (<i>sevenless</i> mutacija); funkcionalni le R8 fotoreceptorji</p>	 <p><b>Slika 18:</b> <i>sev;ninaE_T</i>, PDA protokol</p> <p>Ni »modrega« PDA (<i>ninaE</i> mutacija), ni »UV« PDA (<i>sevenless</i> mutacija); funkcionalni le R8 fotoreceptorji</p>
 <p><b>Slika 19:</b> <i>sev;rdgC_S</i>, PDA protokol</p> <p>PDA pri gornji in spodnji sledi, ni UV PDA (<i>sevenless</i> mutacija), posnetek ne kaže nikakršnih znakov upočasnjene repolarizacije (puščice), v tem sevu in tej starostni skupini so bili vsi merjeni osebki brez opaznih znakov degeneracije; torej so funkcionalni R1-6 in R8 fotoreceptorji.</p>	 <p><b>Slika 20:</b> <i>sev;rdgC_T</i>, PDA protokol</p> <p>PDA pri gornji in spodnjih dveh sledih (četrtja je pridobljena z enakim protokolom kot tretja – OBBOO), stopnjevanje upočasnjene repolarizacije (puščice); funkcionalni so R1-6 in R8 fotoreceptorji. Odgovor R1-6 skozi meritev postopoma ugaša.</p>

### 3.2 JAKOSTNE KRIVULJE

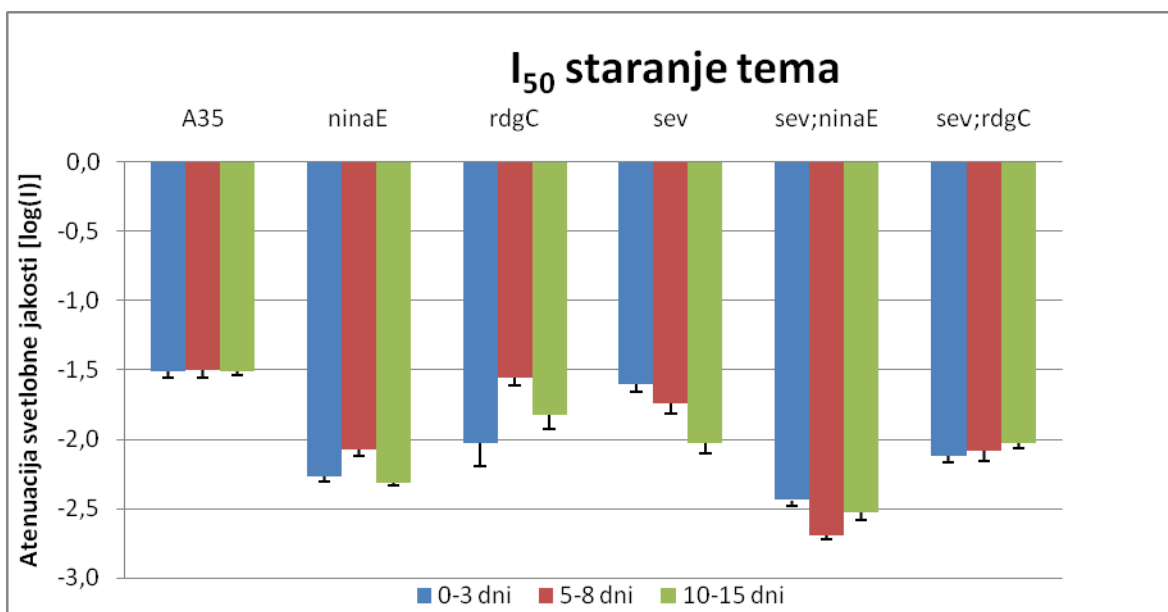
Jakostne krivulje smo izmerili zatem, ko smo z modro svetlobo inaktivirali fotoreceptorje R1-6. Beležili smo odgovore centralnih fotoreceptorjev izzvane s svetlobnimi pulzi valovne dolžine 520 nm. Njihovo jakost smo atenuirali skozi nevtralno sive refleksijske filtre v korakih po 0.5 log enote, začenši z milijoninko (-log 6) polne svetlobe (1=log 0). Pridobljene krivulje imajo obliko sigmoidne funkcije z manjkajočim saturacijskim delom (maksimumom). Z nelinearno regresijo smo iz »fitov« teh podatkov pridobili manjkajoči ključni podatek  $V_{max}$ , potreben za izračun  $I_{50}$  – svetlobno jakost, ki izzove polovico maksimalnega odgovora. Podatke smo uredili v spodnja stolpična grafa.



**Slika 21:** Primerjava  $I_{50}$  svetlobnih jakosti različnih sevov, staranih na 12h/12h svetlo / temnem ciklu

A35 in *sev* imata najmanjši  $I_{50}$  v vseh starostnih skupinah. Njune jakostne krivulje so od vseh najbolj zamaknjene k višjim jakostim svetlobe. Ta dva seva kažeta največjo neobčutljivost centralnih receptorjev po inaktivaciji perifernih fotoreceptorjev. Oči mušic teh dveh sevov so občutljivejše na atenuacijo svetlobne jakosti v primerjavi z ostalimi štirimi. Največjo občutljivost kaže sev *sev;ninaE*.

Opazen je trend naraščanja občutljivosti centralnih fotoreceptorjev znotraj sevov med 0-3 dni in 5-8 dni starimi mušicami in nato vpad do starostne kategorije 10-15 dni pri vseh sevih, razen *rdgC*, katerega R7 in R8 celice so ves čas približno enako občutljive.



Slika 22: Primerjava I<sub>50</sub> svetlobnih jakosti različnih sevov, staranih v temi

Pri v temi gojenih mušicah ne opazimo skupnega trenda tekom staranja. Najmanj občutljiv je sev A35, najbolj pa *sev;ninaE*.

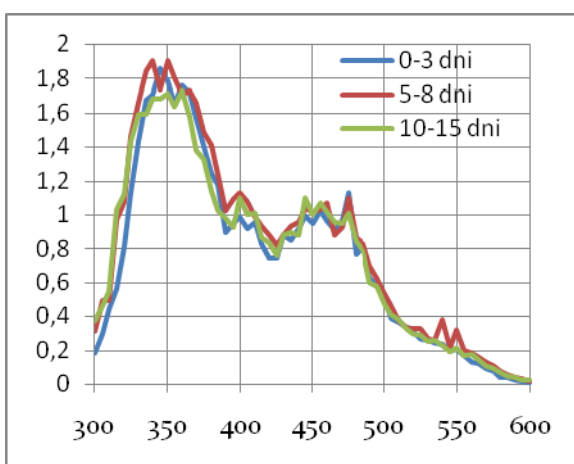
### 3.3 SPEKTRALNA OBČUTLJIVOST CENTRALNIH FOTORECEPTORJEV

Spektralne občutljivosti smo izmerili zatem, ko smo z modro svetlobo inaktivirali fotoreceptorje R1-6. Meritev občutljivosti od 300 do 600 nm na 5 nm natančno je v celoti potekla znotraj časovnega okna, v katerem so fotoreceptorji R1-6 ostali inaktivirani, kar smo preverili s PDA protokolom po zaključeni meritvi.

Krivulje prikazujejo sumarične spektralne občutljivosti celotne populacije celic R8 (vsi sevi) in R7 (vsi, razen *sev*, *sev;ninaE*, *sev;rdgC*). Vsaka krivulja posebej prikazuje spektralno občutljivost v različnih starostnih obdobjih znotraj posameznega seva. Predstavljeni so rezultati, pridobljeni v okviru dveh svetlobnih režimov: pri mušicah gojenih v svetlobi ter temi. Opazimo pojavljanje dveh vrhov pri sevih A35, *ninaE* in *rdgC*.

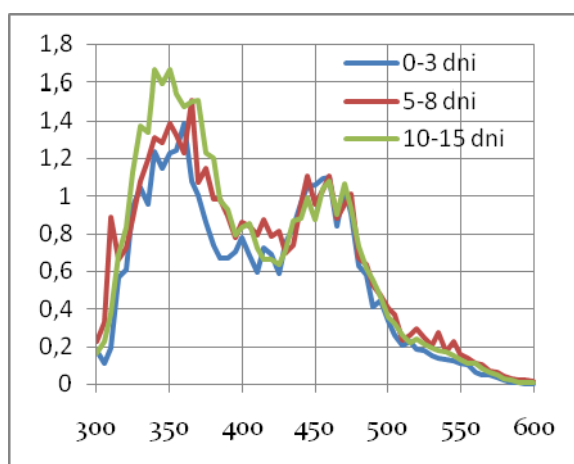
Kratkovalovni vrh (~360 nm) je predstavnik povprečja absorpcijskih vrhov, značilnih za UV rodopsina Rh3 in Rh4 fotoreceptorskega razreda R7 celic. Dolgovalovni vrh (~460 nm) je povprečje absorpcijskih vrhov, značilnih za rodopsina Rh5 (modri) in Rh6 (zeleni) fotoreceptorskega razreda R8 celic. Pri mutantih *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC* opazimo le en dolgovalovni vrh (~500 nm), ki ustreza absorpcijskemu vrhu Rh6 rodopsina R8 receptorjev.

Rezultati so normalizirani na občutljivost pri 465 nm, saj je vsem sevom skupna funkcionalnost R8 receptorskih celic. Tako smo fiksirali absorpcijski vrh R8 receptorjev in opazovali spremembe R7 vrhov glede nanj.



**Slika 23:** A35\_S, spektralna občutljivost

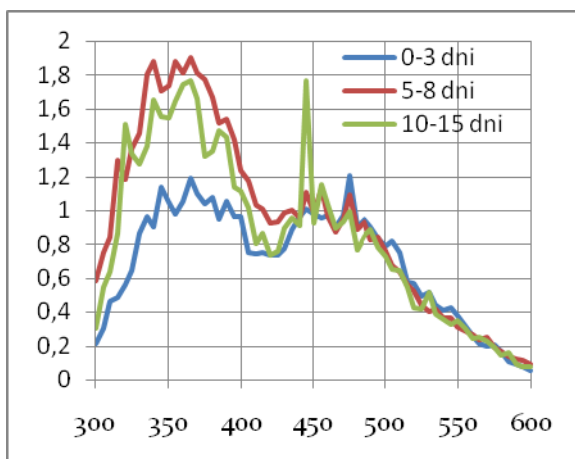
Absorpcijski vrh R7 receptorjev v UV je v vseh starostnih obdobjih višji od vrha R8 v modro zelenem



**Slika 24:** A35\_T, spektralna občutljivost

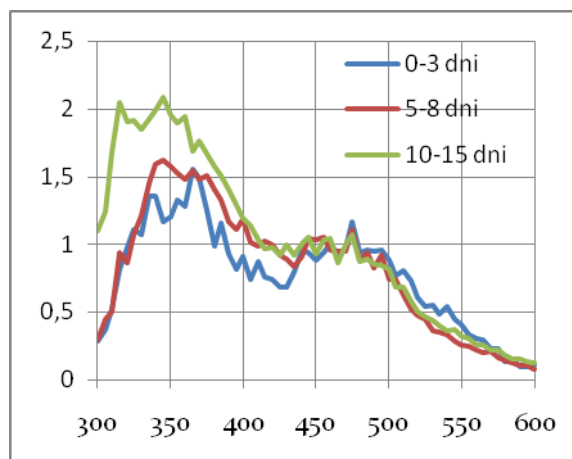
Absorpcijski vrh R7 receptorjev je s staranjem glede na R8 vrh višji





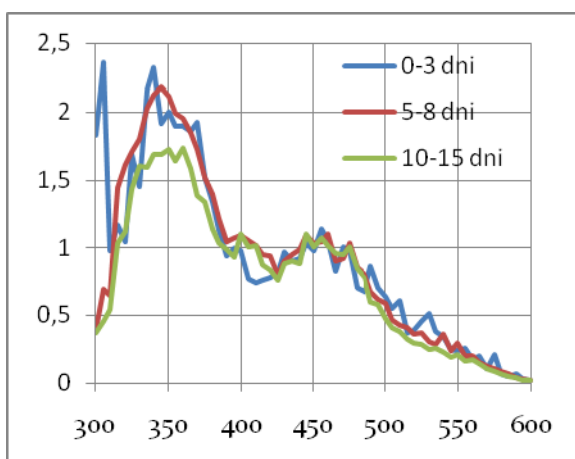
**Slika 25:** *ninaE\_S*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh R7 receptorjev je s staranjem glede na R8 vrh višji



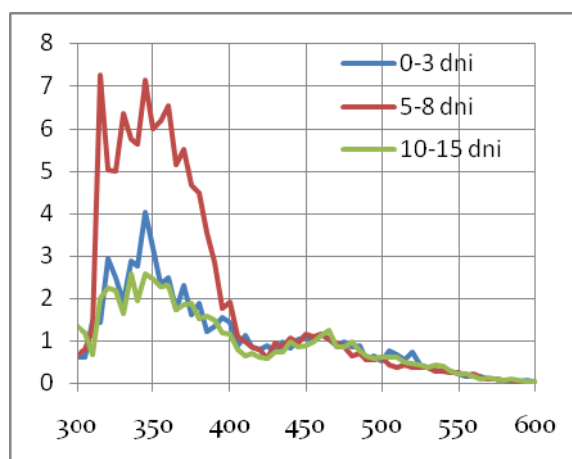
**Slika 26:** *ninaE\_T*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh R7 receptorjev se s staranjem glede na R8 vrh viša



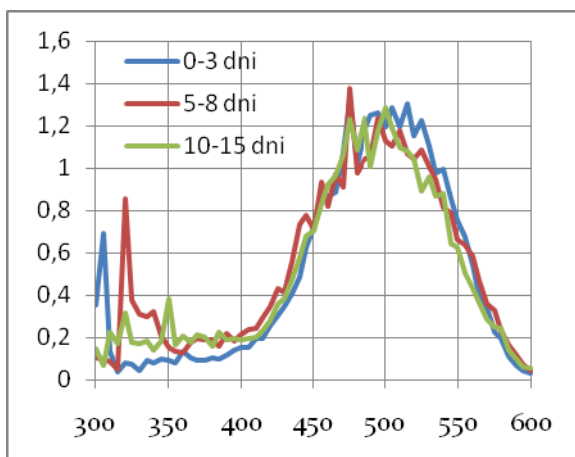
**Slika 27:** *rdgC\_S*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh R7 receptorjev je v vseh starostnih obdobjih višji od R8 vrha



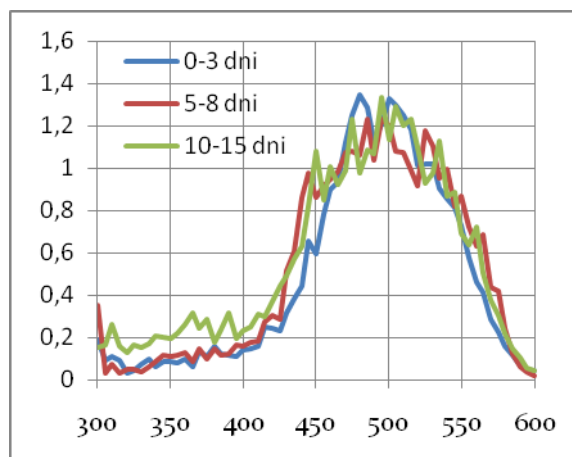
**Slika 28:** *rdgC\_T*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh R7 receptorjev je s staranjem glede na R8 vrh višji (izstopajoči vrh 5-8 dni stare sledi bi lahko bil posledica napake v preračunavanju doprinosov korekcijskih faktorjev)



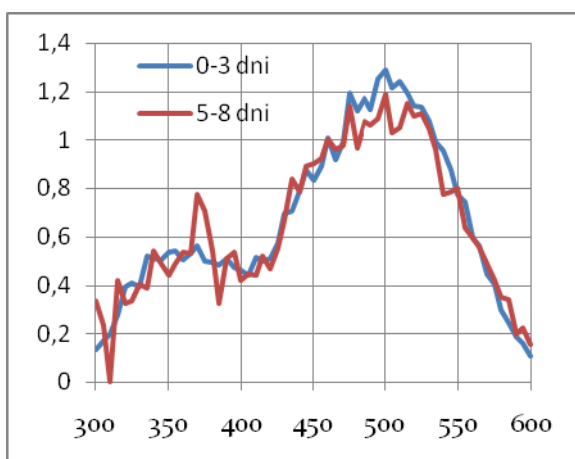
**Slika 29:** *sev\_S*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno



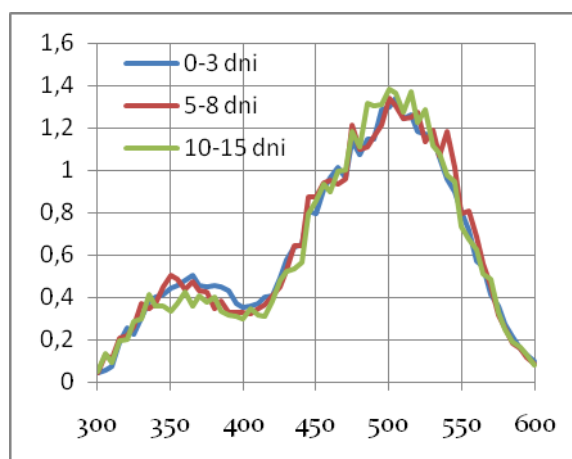
**Slika 30:** *sev\_T*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno



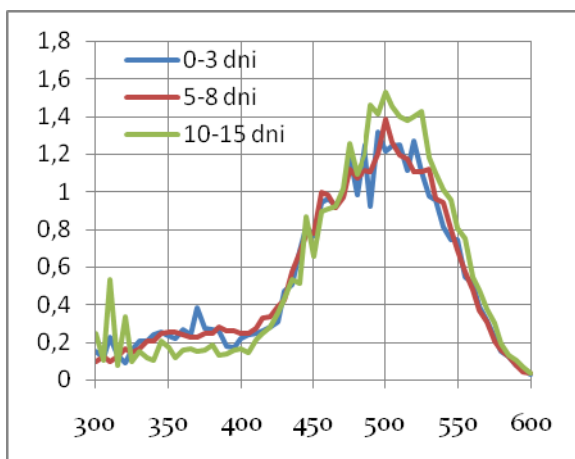
**Slika 31:** *sev;ninaE\_S*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno; 10-15 dni stare mušice imajo prešibek ERG signal



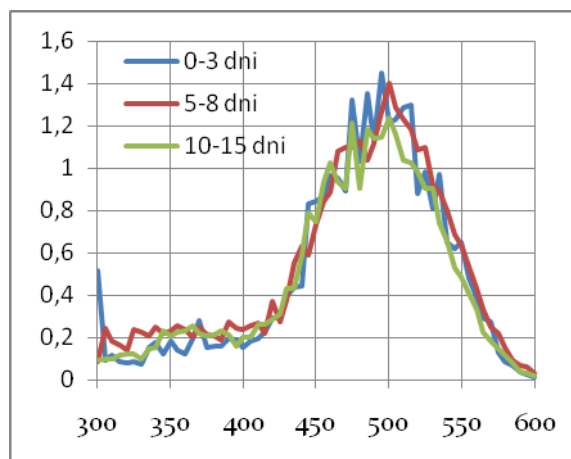
**Slika 32:** *sev;ninaE\_T*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno



**Slika 33:** *sev;rdgC\_S*, spektralna občutljivost

Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno



**Slika 34:** *sev;rdgC\_T*, spektralna občutljivost

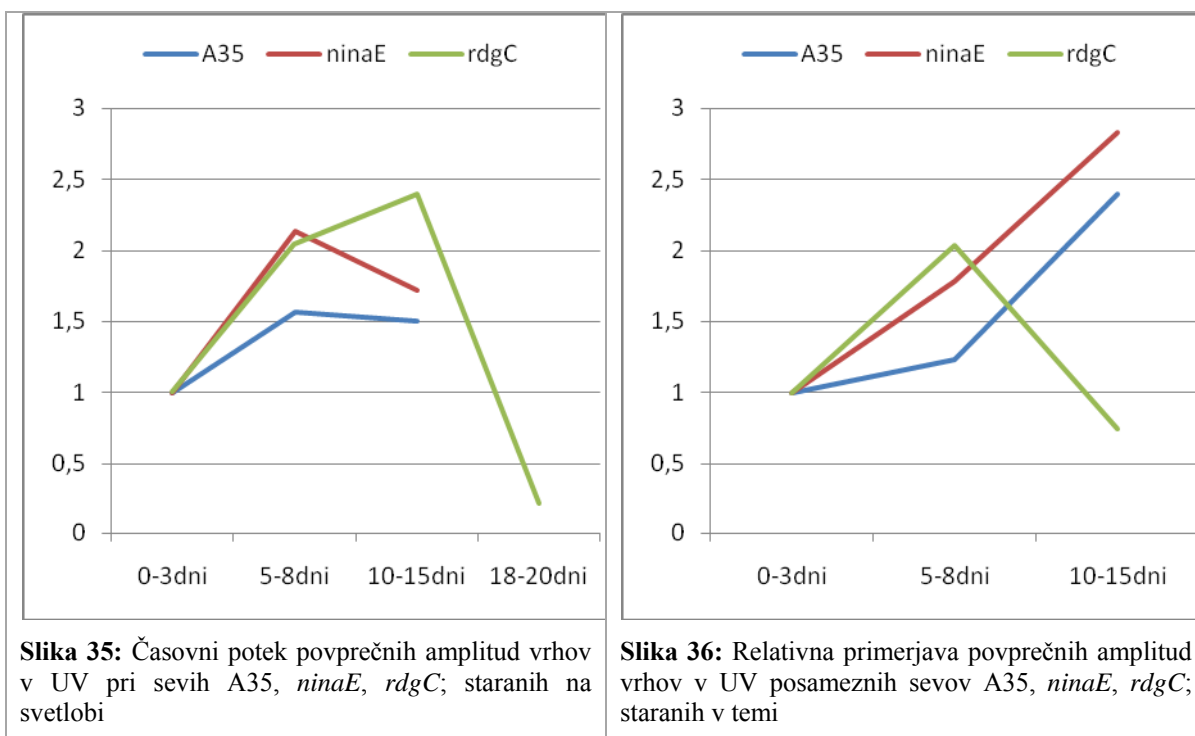
Absorpcijski vrh Rh6 rodopsina R8 celic se s staranjem ne spreminja signifikantno

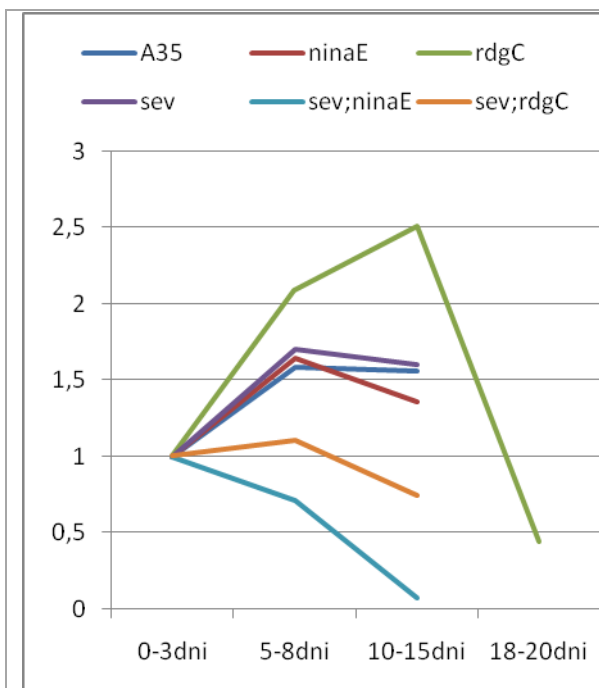
Z ERG izmerjena kompleksna spektralna občutljivost centralnih fotoreceptorjev mušic je delno problematična zaradi številnih korakov normalizacije med izračunavanjem. Iz spektralne občutljivosti lahko ocenimo le razmerja med razredi funkcionalnih receptorjev. Pri izračunavanju izgubimo informacijo o absolutni amplitudi ERG, ki je povezana s fiziološkim stanjem celotnega očesa.

### 3.4 PRIMERJAVA AMPLITUD ABSORPCIJSKIH VRHOV RODOPSINOV R7 IN R8 CELIC

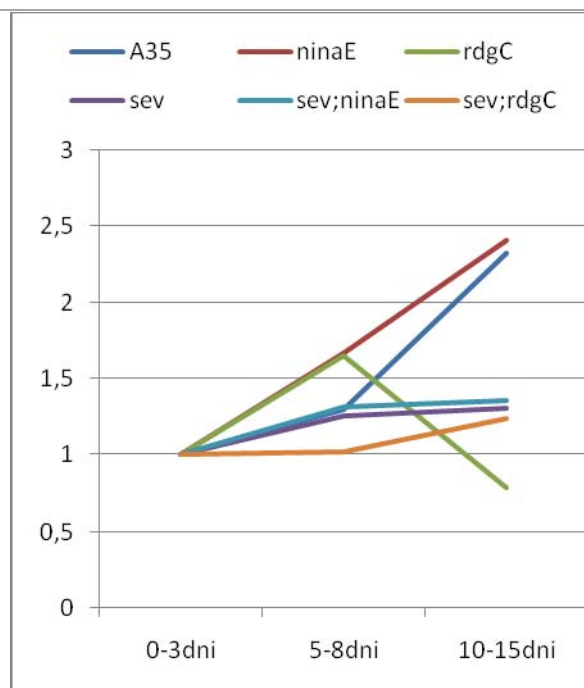
Amplituda ERG odraža podatek o celotni količini funkcionalnih fotoreceptorjev v očesu in daje informacijo o stanju dozorelosti ali degeneracije očesa. V nadaljevanju analize smo primerjali absolutne napetosti ERG posameznih mušic znotraj sevov po posameznih starostnih obdobjih. Zanimala sta nas predvsem pasova valovnih dolžin, ki zajemata  $\alpha$  absorpcijske vrhove R7 ( $360 \pm 20$  nm) in R8 fotoreceptorjev ( $500 \pm 20$  nm). Enak postopek smo izvedli tako na mušicah gojenih na svetlobi, kot tudi v temi. Ker pa smo s protokolom spektralne občutljivosti pokazali odsotnost aktivnosti R7 receptorjev pri sevih *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC*, smo primerjavo kratkovalovnih amplitud ( $360 \pm 20$  nm) opustili pri obeh svetlobnih tretmajih.

Amplitude ERG posameznih sevov smo normirali na podatek pri najmlajši skupini (0-3 dni starih) mušic, saj so mušice živele v enakih pogojih znotraj posamezne paralele (svetloba – tema). Zato velikost ERG vseh mušic v točki 0-3 dni zavzema vrednost 1, skozi časovni potek pa lahko sledimo relativnim spremembam občutljivosti pri posameznih sevih.





**Slika 37:** Relativna primerjava povprečnih amplitud dolgovalovnih vrhov posameznih sevov A35, *ninaE*, *rdgC*, *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC*; staranih na svetlobi



**Slika 38:** Relativna primerjava povprečnih amplitud dolgovalovnih vrhov posameznih sevov A35, *ninaE*, *rdgC*, *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC*; staranih v temi

#### 4 RAZPRAVA IN SKLEPI

Uspešno smo ustvarili dva seva vinske mušice, ki združujeta mutaciji *sev* in *rdgC* oziroma *sev* in *ninaE*. Oba seva predstavljata izviren model očesa, ki vsebuje le en sam tip fotoreceptorjev, t.j. centralni fotoreceptor R8: sev *sev;ninaE* od izleganja do smrti, sev *sev;rdgC* pa od dneva, ko nastopi apoptotska smrt R1-6. Spektralna občutljivost *sev;ninaE* in degeneriranega seva *sev;rdgC* je zelo podobna absorpcijskemu spektru izoliranega rodopsina Rh6. Nekateri avtorji (Salcedo et al. 1999) so glavne lastnosti Rh6 že preučili preko ERG mušic, pri katerih so gen za Rh6 izrazili ektopično v receptorjih R1-6 seva *ninaE* (brez Rh1). Naš model pa omogoča analitičen študij zeleno občutljivega rodopsina Rh6 v nativnem okolju centralnega fotoreceptorja.

V elektrofiziološki študiji smo se osredotočili na preučevanje lastnosti sevov *rdgC* in *sev;rdgC* z napredovano degeneracijo fotoreceptorjev. Merili smo rezidualni ERG, h kateremu naj bi prispevale celice R7 in R8 pri *rdgC* sevu (Steele et al. 1990), ter celice R8 pri *sev;rdgC* sevu. Zato smo za primerjavo uporabili mušice *ninaE* in *sev;ninaE*, ki imajo funkcionalne le centralne fotoreceptorje R7 in R8 pri *ninaE* sevu in R8 receptorje pri *sev;ninaE* sevu. Vrednotimo lahko razlike med elektoretinogrami vseh sevov, posnetimi pod enakimi eksperimentalnimi pogoji.

Vse seve smo gojili na svetlobi (12h S/ 12h T) in v temi, saj pri mutiranih sevih svetloba izzove degeneracijo oči, gojenje v temi pa ne. Vendar pa smo pri naših kontrolnih paralelnih sevih, gojenih v temi (predvsem sev A35, slika 10) opazili upočasnjeno repolarizacijo po močnih svetlobnih pulzih. To je sicer znak, ki ga uporabljamo kot enega od pokazateljev prisotnosti postopne degeneracije pri *rdgC* in *sev;rdgC* sevih. Fenomen, ki najbrž odraža nezadostno razvitost fotoreceptorjev, je bil na vinski mušici elektrofiziološko opisan nedavno (Wolfram et al. 2004). Ta pojav pa smo opazili tudi v našem laboratoriju pri muhi *Calliphora vicina*. Eksperimentalno so ugotovili, da je v takšnih fotoreceptorjih signal iz mitohondrijev pol nižji, kot signal pri živalih, gojenih na svetlobi. (Zupančič, G., Meglič, A., ustni vir). Fototransdukcija ali širše gledano, vid na splošno, je metabolno zelo zahteven proces, s katerim se živali s slabše razvitimi fotoreceptorji težko spopadajo, kar je

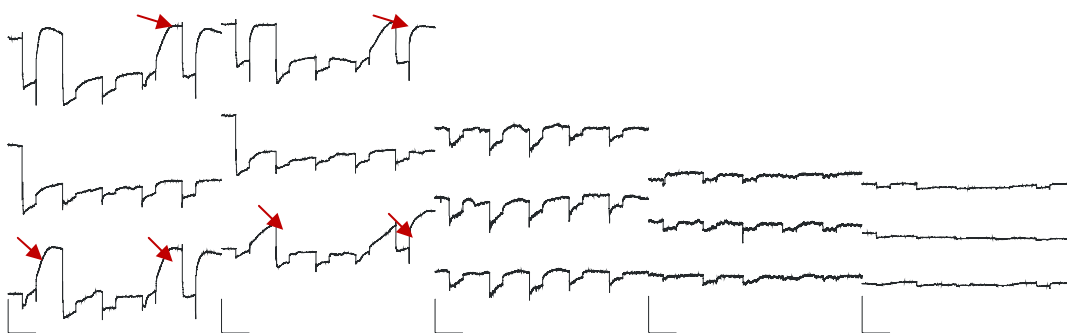
opazno predvsem pri skrajno obremenjujočih dražljajih. Od tod tudi upočasnjena repolarizacija.

#### 4.1 FENOTIP DEGENERIRANIH *rdgC* IN *sev;rdgC* MUŠIC

Primarni viri navajajo, da se degeneracija pri *rdgC* pojavi četrti do šesti dan po izpostavitvi 12-urnemu dnevno-nočnem ciklu svetlobe (Ranganathan 2000, Šuštar 2004). Žal tega nismo opazili, in lahko sami z gotovostjo trdimo le, da se odstotek osebkov z od svetlobe odvisne degeneracije s starostjo nad šestimi dnevi viša, saj je degeneracija R1-6 fotoreceptorskih celic pri sevih *rdgC* in *sev;rdgC*, izpostavljenih svetlobi, precej variabilna med posameznimi osebki. Kljub temu, da so bile vse starostne skupine ves čas izpostavljene enakim svetlobnim in temperaturnim pogojem, se navkljub temu pojavljajo posamezni osebki z znaki degeneracije celo v najmlajšem starostnem obdobju 0-3 dni, ter narobe: osebki brez znakov degeneracije so bili prisotni celo v starostni skupini 10-15 dni. Tako smo ugotovili, da ni jasnega časovnega mejnika, ki bi zagotavljal, da je degeneracija pri vseh osebkih že potekla. Izrazito nizek signal ERG smo opazili le v starostni skupini 18-20 dni, ki pa zaradi prenizke amplitude odgovorov ni ustrezala kriterijem naše kvantitativne analize. Zato smo v nadaljnjo analizo vključili le tiste podatke, ki so bili pridobljeni iz osebkov z degeneriranimi očmi (znaki: zmanjšana amplituda ERG, zmanjšan signal iz R1-6, upočasnjena repolarizacija).

**Preglednica 4:** Delež degeneracije fotoreceptorjev tekom staranja na svetlobi seva *rdgC*

Starostna skupina	0-3 dni	5-8 dni	10-15 dni	18-20 dni
Delež degeneracije	80%	40%	80%	100%
Št. osebkov	5	5	5	2

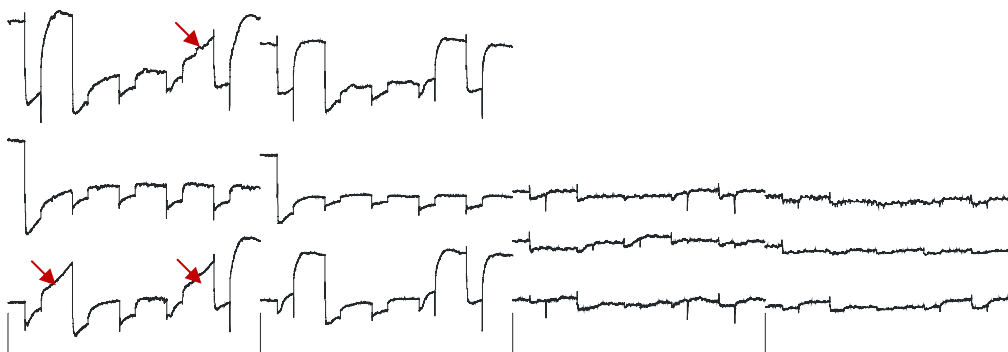


**Slika 39:** Časovni potek degeneracije pri sevu *rdgC*

Živali so bile izpostavljene 12-urnemu dnevno nočnemu ciklu (pet posnetkov različnih osebkov iz štirih starostnih obdobj). Prvi stolpec z leve, starost 0-3 dni: počasna repolarizacija po oranžnem pulzu (puščice), PDA po modrem. Drugi in tretji stolpec z leve, starost 5-8 dni. Drugi stolpec, izrazitejša upočasnjena repolarizacija (puščice), tretji stolpec, degeneracija R1-6, odsoten signal iz R1-6 celic. Četrti stolpec, starost 10-15 dni: signal iz R7 in R8, upada. Peti stolpec, starost 18-20 dni. Signal iz R1-6 še prisoten, zelo slabo razmerje signal:šum. Kalibracija v spodnjem levem vogalu  $y=10\text{mV}$ ,  $x=10\text{s}$ .

**Preglednica 5:** Delež degeneracije fotoreceptorjev tekom staranja seva *sev;rdgC*

Starostna skupina	0-3 dni	5-8 dni	10-15 dni	18-20 dni
Delež degeneracije	33,3%	0%	35%	100%
Št. osebkov	6	6	20	4



**Slika 40:** Časovni potek degeneracije *sev;rdgC* seva

Živali so bile izpostavljene 12-urnemu dnevno nočnemu ciklu (štirje posnetki različnih osebkov iz štirih starostnih obdobj). Prvi stolpec z leve, starost 0-3 dni: počasna repolarizacija po oranžnem pulzu (puščice), ni PDA po modrem. Drugi stolpec z leve, starost 5-8 dni: ni upočasnjene repolarizacije ali znakov degeneracije, ni PDA po modrem pulzu. Tretji stolpec, starost 10-15 dni: degeneracija R1-6, odsoten signal iz R1-6 celic, ni PDA po modrem pulzu. Četrti stolpec, starost 18-20 dni: signal le iz R8, zelo slabo razmerje signal:šum. Kalibracija v spodnjem levem vogalu  $y=10\text{mV}$ ,  $x=10\text{s}$ .

Pri vseh starostnih skupinah sevov *rdgC* in *sev;rdgC*, gojenih v temi smo ugotovili, da se degeneracija ni zgodila niti pri enem osebku, saj se je pri OBBOO protokolu vedno pojavil



PDA v modrem delu spektra, ki je pokazatelj funkcionalnih R1-6 fotoreptornih celic. Prav tako je BUUBB protokol pokazal pri *rdgC* sevu prisotnost PDA v ultravijoličnem, ki je pokazatelj funkcionalnih R7 receptorjev in odsotnost istega PDA pri sevu *sev;rdgC* in *sev;ninaE*, ter s tem pokazal odsotnost R7 receptorjev. Sodimo, da dvojni mutaciji *sev;rdgC*, *sev;ninaE* v temi ne izzoveta degeneracije fotoreceptorjev. Omenimo naj, da se je pri tej skupini sevov, za razliko od istih sevov, gojenih na svetlobi, v vseh primerih pojavila upočasnjena repolarizacija ob koncu PDA, ki, kot smo prej omenili, kaže na nerazvitost fotoreceptorjev.

Elektroretinogrami *rdgC* in *sev;rdgC* mušic z napredovano degeneracijo fotoreptorskih celic imajo znatno nižjo amplitudo v primerjavi z amplitudo ERG v času pred nastopom degeneracije fotoreceptorjev. Zmanjšana amplituda in značilna oblika ERG brez "on" in "off" komponent LMC nevronov, dokazujeta nefunkcionalnost fotoreptorskih celic R1 – R6. Celice R7 in R8 tvorijo sinapse z ganglijskimi celicami v meduli, ki leži golobje, pod lamino.

Amplituda rezidualnega ERG upada od dneva, ko propadejo receptorske celice R1 – R6, do dneva, ko je signal preveč nestabilen za uspešen zapis. Sprva sta ERG *rdgC* in *ninaE* mušic primerljiva. To pomeni, da ostaja po degeneraciji celic R1 – R6 večina centralnih celic R7 in R8 funkcionalnih. Po tednu dni se zniža amplituda in spremeni oblika rezidualnega ERG. Steele s sodelavci (Steele et al. 1990) domneva, da je propad centralnih fotoreceptorjev *rdgC* mušic posledica okoliških apoptotskih procesov, ki spremenijo kemizem ekstracelularnega prostora. Znotraj časovnega okvirja našega eksperiment mi nismo opazili znakov takšnega propadanja.

#### **4.1.1 PDA kot pokazatelj neenakomerne degeneracije**

Valovna dolžina dražljaja, ki izzove PDA, ima zaradi znanih vrednosti absorpcijskih vrhov rodopsinov Rh1 – Rh6 (Salcedo et al. 1999, Feiler et al. 1988) informativno vrednost o funkcionalnosti določenega razreda receptorskih celic. Pri mladih, nedegeneriranih *rdgC* in *sev;rdgC* mušicah nastopi PDA po osvetljevanju z modro svetlobo (Rh1:  $\lambda_{\max}=473$  nm),

kar je dokaz funkcionalnosti receptorskih celic R1 – R6. Na enak način odgovarjajo tudi fotoreceptorji mušic divjega tipa. S stopnjevanjem degeneracije se receptorske membrane počasneje repolarizirajo. Prehodno stanje (pred popolno apoptozo R1-6 receptorjev) ima za rezultat podoben ERG zapis, kot v temi gojene mušice divjega tipa, čeprav so razlogi za to povsem različni. Zato lahko zapoznelo repolarizacijo pri sevih *rdgC* in *sev;rdgC* gojenih na svetlobi razumemo kot pokazatelj stopnje degeneriranosti.

Po propadu receptorskih celic R1 – R6 pri okrog pet dni starih, na svetlobi gojenih *rdgC* mušicah, izzove PDA dražljaj ultravijolične svetlobe, prekine pa ga dražljaj modre svetlobe. Zelo podoben ERG imajo *ninaE* mušice. V tej fazi očitno preživijo vse centralne fotoreceptorne celice R7, kot tudi R8.

#### 4.2 JAKOSTNA KRIVULJA RAZLIČNIH SEVOV MUŠIC

Umeritev jakostne krivulje je predpogoj meritve in izračuna spektralne občutljivosti. Po inaktivaciji receptorjev R1-6 z modro svetlobo smo jo izmerili za vsako mušico posebej pri valovni dolžini 520 nm. To je valovna dolžina v neposredni bližini absorpcijskega vrha Rh6 rodopsina R8 fotoreceptorjev, ki je ostal funkcionalen pri vseh sevih. Žal pa naše meritve vselej ne vsebujejo saturacijskega dela sigmoidne krivulje – maksimalnega odgovora, ki je ključen za izračun parametra  $I_{50}$  (jakost dražljaja, ki izzove za polovico manjši odgovor od  $V_{max}$ ). Sklepamo, da vir svetlobe uporabljen v eksperimentalnih protokolih, pri tej valovni dolžini ne izseva zadostnega števila fotonov, ki bi lahko saturiralo R8 receptorje. Za pridobitev parametra  $I_{50}$  (sliki 21 in 22) smo uporabili nelinearno regresijo na združenih podatkih skupin štirih do devetih živali posameznega seva in pogojev gojenja. Empiričnim podatkom smo prilagajali Hillovo sigmoidno krivuljo s programom Prism 4.0.

Iz podatkov, na svetlobi gojenih mušic, je razvidno, da so po močnem modrem pulzu, s katerim izzovemo PDA v perifernih receptorjih, centralni receptorji sevov A35 in *sev* najbolj neobčutljivi na draženje s svetlobo pri 520 nm. Sevi z okvarjenimi perifernimi receptorji (*ninaE*, *rdgC*, *sev;ninaE*, *sev;rdgC*) pa imajo centralne receptorje bolj občutljive.

Pri sevih A35 in *sev* so periferne receptorske celice R1-6 prisotne in funkcionalne skozi ves čas in pri vseh pogojih gojenja. Zato je pri teh sevih inaktivacija z modrim pulzem najučinkovitejša, ter povzroči močno in trajno depolarizacijo velike populacije receptorjev. Menimo, da PDA lahko izzove močno povratno inhibicijo odgovora receptorskih celic R7 in R8, bodisi preko nevronske negativne povratne zanke, ali pa zaradi močno spremenjenih razmer v zunajceličnem prostoru in aktivnega posega pigmentnih celic v obremenjen sistem. Omenimo naj, da test občutljivosti s 520 nm pulzi ne ločuje med sevoma A35 in *sev*, saj pri obeh izzove le odgovor R8 celic z Rh6 rodopsinom; rodopsina Rh3 in Rh4 slabo absorbirata v tem delu spektra. Centralni receptor R8 z Rh5 rodopsinom pa najbrž pri sevu A35 moder PDA pulz inaktivira na podoben način, kakor R1-6 celice. Dejstvo pa je, da kažejo centralni fotoreceptorji obeh dvojnih mutant največjo občutljivost. Pri obeh sevih odgovor izvira iz homogene populacije fotoreceptorjev R8 z Rh6. V kontekstu tako spremenjene retine imajo ti fotoreceptorji najbrž najmanj inhibiran odgovor zaradi morebitne odsotnosti negativnih povratnih zank v zvezi z R7, ali pa je epifenomen dvojne mutacije večja stopnja ojačanja fototransdukcijske kaskade.

Pri vseh sevih (razen *rdgC*) je opaziti splošen trend tekom staranja: iz prve v drugo starostno kategorijo se občutljivost poveča iz druge v tretjo kategorijo pa zmanjša.

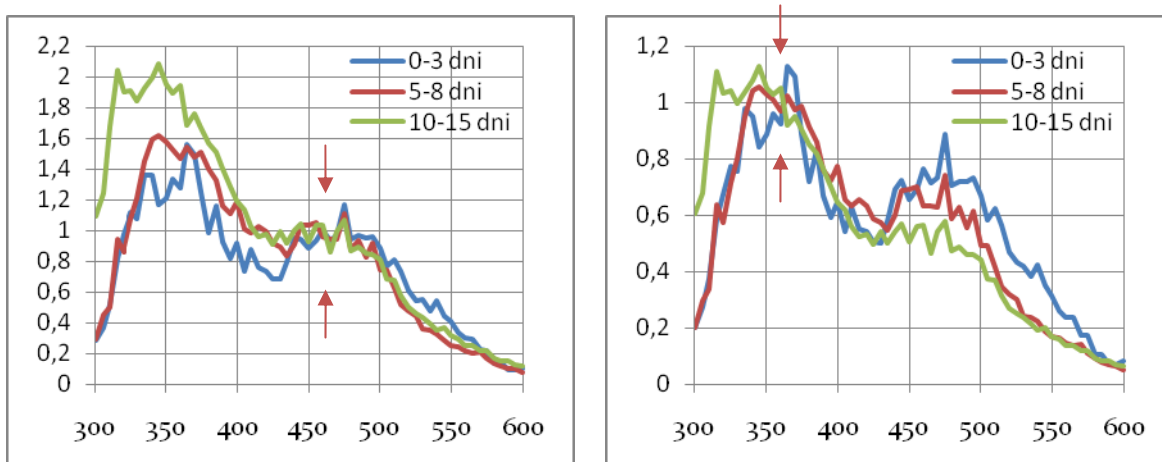
V temi gojene mušice skozi staranje ne kažejo značilnega časovnega vzorca. Najnižjo stopnjo občutljivosti na svetlobni dražljaj kažejo centralni fotoreceptorji A35. Sev *ninaE* v primerjavi z na svetlobi gojeno paralelo *ninaE* ne kaže pomembnih razlik. Podobno velja za sev *sev;ninaE*. Primerjava staranja sevov *rdgC* in *sev;rdgC* v temi kaže na večje sipanje parametrov jakostne krivulje, vendar v tem vzorcu nismo opazili kakšne posebne zakonitosti.

#### 4.3 SPEKTRALNA OBČUTLJIVOST RAZLIČNIH SEVOV MUŠIC

Spektralno občutljivost mušic smo spremljali v treh starostnih obdobjih, vselej po močnem modrem svetlobnem pulzu. Pri ugotavljanju propadanja R1-6 receptorjev *rdgC* in *sev;rdgC* sevov tekom tega staranja smo najprej preverjali odsotnost pseudopupile ter se še nato

vseeno o njihovi nefunkcionalnosti prepričali z ERG zapisi pridobljenimi s PDA protokoli. Tako smo za tretje starostno obdobje (10-15 dni) teh dveh sevov uporabili le osebkke z napredovano degeneracijo R1-6 fotoreceptorjev. Govorimo le o osebkih gojenih na svetlobnem 12h /12h dnevno nočnem ciklu, saj pri mutantah gojenih v temi degeneracija fotoreceptorjev ne poteče. V obeh svetlobnih režimih opazimo zelo podobne rezultate med dvema skupinama sevov: (1) vrhovi R7 receptorjev pri ~360 nm in vrhovi R8 receptorjev pri ~460 nm sevov *A35*, *ninaE* in *rdgC*, ter (2) le en vrh R8 receptorja in sicer Rh6 rodopsinski vrh pri ~500 nm pri sevih *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC*. Podobnost prve skupine temelji na nefunkcionalnosti perifernih R1-6 fotoreceptorjev, ki so bodisi inaktivirani s pulzom modre svetlobe (*A35* in *rdgC* gojen v temi) ali nefunkcionalni zaradi odsotnosti rodopsina Rh1(*ninaE*) ali degenerirani (*rdgC* gojen na svetlobi). Pri drugi skupini veljajo enake zakonitosti glede R1-6 receptorjev kot pri prvi, s ključno razliko, da imajo ti sevi odsotne R7 centralne fotoreceptorske celice.

Poleg tega, da imamo opravka s šestimi različnimi sevi, se mušice med sabo že same po sebi razlikujejo v velikosti ERG signalov. Trendi sicer ostanejo znotraj sevov dobro razvidni, same amplitude pa različno variirajo. Zato smo morali pridobljene podatke med samo najprej normalizirati, da smo jih lahko kasneje tudi ovrednotili. Vse krivulje spektralnih občutljivosti smo normalizirali na valovno dolžino, pri kateri je kompleksna spektralna občutljivost R8 celic najbolj stabilna:  $465 \pm 10$  nm. Samo celice R8 so namreč prisotne v vseh sevih. Podatki imajo relativne vrednosti, zato je lahko iz teh rezultatov odčitavamo le spremembe razmerja med količinami celic R7 in R8 tekom staranja.



Slika 41: sev *ninaE\_T*: primerjava enakih podatkov normaliziranih pri dveh različnih vrednostih (puščice)

**levo:** pri  $465 \pm 10$  nm      in      **desno:** pri  $360 \pm 10$  nm

Konkreten primer: sev *ninaE* gojen v temi (slika 41). Posnetek lahko tolmačimo na dva načina, (1) da se s staranjem občutljivost R7 receptorjev povečuje. Ko pa taiste podatke normaliziramo na R7 vrh ( $360 \pm 10$  nm), lahko posnetek tolmačimo, (2) da se s staranjem občutljivost R8 receptorjev zmanjšuje. Prav zaradi tega si je najboljše podatke relativno predočiti in razmišljati o relativnih medsebojnih odnosih, saj so izmerjene spektralne občutljivosti uporabne le v primerjalnem, ne pa v absolutnem smislu.

Vsekakor smo tudi v tem segmentu uspeli dokazati funkcionalnost R8 fotoreceptorjev v vseh sevih ter odkrili, da za njegovo preučevanje zadostuje že sev *sev*, saj lahko s pravilnim svetlobnim tretmajem inaktiviramo R1-6 fotoreceptorje – z modrim pulzom izzovemo PDA. Ugotovili smo, da lahko teh šest sevov, uporabljenih tekom raziskave, razvrstimo v dve med sabo različni si skupini. V prvi, ki vsebuje seve *A35*, *ninaE*, *rdgC*, sta delujoča oba razreda centralnih fotoreceptorjev. V drugi skupini, ki vsebuje sev *sev* ter dvojni mutanti *sev;ninaE* in *sev;rdgC*, deluje le R8 razred centralnih fotoreceptorjev. Zato smo pri prvi skupini izmerili kompleksno spektralno občutljivost centralnih fotoreceptorjev z dvema vrhovoma, pri drugi skupini pa samo z enim. Poleg tega rezultat kaže, da je bila pri vseh sevih inaktivacija R1-6 (če so pri sevu prisotni) uspešna.

Feiler s sodelavci (Feiler et al. 1992) navaja, da se rodopsin Rh3 pojavlja približno v 30 odstotkih celic R7, Rh4 pa v nadaljnjih 70 odstotkih. Zaradi koekspresije parov rodopsinov Rh3 in Rh5 ter Rh4 in Rh6 znotraj enega omatidija, se tudi rodopsina Rh5 in Rh6 pojavljata v razmerju 3:7 v celicah R8. Sodeč po odgovoru na spektralno raznolike dražljaje in funkcionalno razporeditev rodopsinov mora biti prispevek R8 celic z Rh6 k amplitudi ERG manjši v primerjavi z Rh5 vsebujočimi celicami.

Signifikantnost sprememb tekom staranja na svetlobi med merilnima obdobjema 5-8 in 10-15 dni seva *rdgC* smo preverili s Studentovim T-testom. Ugotovili smo, da razlika statistično ni pomembna ( $p=0.56$ ). To pomeni, da so R7 fotoreceptorji tekom staranja ostali neprizadeti.

#### 4.4 OCENA FIZIOLOŠKEGA STANJA R7 IN R8 RECEPTORJEV TRANSGENIH SEVOV MED STARANJEM

Sev *rdgC* kaže trend propadanja centralnih fotoreceptorjev tekom staranja na svetlobi tako v kratko-, kot v dolgovalovnem območju (slike 35 do 38). Trend pri staranju v temi ni tako očiten. Nekajkrat pa smo od svetlobe odvisno degeneracijo sevov *rdgC*, *sev;rdgC* opazili tudi tekom samega eksperimenta. V temi gojena žival je bila med poskusom prvič izpostavljena svetlobi, kar je lahko sprožilo degeneracijo fotoreceptorjev v nekaj minutah. Posnetek v prilogi kaže potek degeneracije pri *rdgC* sevu v 5 roku minut (Priloga 2). Pojav je sporadičen.

Sev *sev;rdgC* preseneča s svojo nespremenljivostjo in se tekom staranja ne spreminja signifikatno. Tudi v temi ni bistvenih sprememb, in bi morda kakršnekoli spremembe lahko opazili le zaradi prej omenjenega sporadičnega pojava.

Porast velikosti ERG tekom staranja (najvišje vrednosti v 5-8 dni starih osebkih) tako v temi kot na svetlobi gojenih mušic, je lahko posledica zorenja fotorepcijskega aparata in bazalne lamine, preko katere registriramo pretežni del signala.

#### 4.5 SKLEPI:

- Ustvarili smo dva seva vinske mušice, ki združujeta mutaciji *sev* in *rdgC* oziroma *sev* in *ninaE*. Oba seva predstavljata izviren model očesa, ki vsebuje le en sam tip fotoreceptorjev, t.j. centralni fotoreceptor R8: sev *sev;ninaE* od izleganja do smrti, sev *sev;rdgC* pa od dneva, ko nastopi apoptotska smrt R1-6. Spektralna občutljivost *sev;ninaE* in degeneriranega seva *sev;rdgC* je zelo podobna absorpcijskemu spektru izoliranega rodopsina Rh6. Za razliko od drugih sorodnih raziskav, omogoča naš model analitičen študij zeleno občutljivega rodopsina Rh6 v nativnem okolju centralnega fotoreceptorja.

- Pri sevih *rdgC* in *sev;rdgC* s staranjem v primerjavi s kontrolnima sevoma *ninaE* in *sev;ninaE* pada ERG signal, kar je najverjetneje posledica apoptotskih procesov R1-6 celic, razporejenih okoli centralnih fotoreceptorjev.
- Degradacija PDA pri *rdgC* mušicah z degeneriranimi celicami R1 – R6 ne govori v prid zastavljeni hipotezi prednostnega preživetja receptorskih celic, ki vsebujejo rodopsin Rh6 s termolabilno metarodopsinsko konformacijo. Po daljšem času izpostavljenosti mušic na svetlobi smo uspeli izzvati »UV« PDA, ki je pokazatelj funkcionalnosti R7 receptorskih celic.
- Časovnega poteka od svetlobe odvisne degeneracije R1-6 celic v splošnem ne moremo natančno opredeliti. Mušice so si med seboj glede na elektrofiziološke odgovore preveč različne. Zagotovo pa se delež na svetlobi degeneriranih oči s starostjo povečuje.
- Z našimi rezultati smo potrdili, da sev *sev* predeterminira nadaljnjo ekspresijo le Rh6 rodopsina v R8 fotoreceptorskih celicah. To je jasno razvidno iz spektralnih občutljivosti vseh sevov, ki vsebujejo *sev* mutacijo: *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC*.
- Degeneracija R1-6 celic v temi gojenih sevov *rdgC* in *sev;rdgC* ne poteče. Upočasnjeno repolarizacijo tekom PDA protokola, ki bi lahko kazala na degenerativne procese, smo opazili pri vseh sevih, ki vsebujejo funkcionalne R1-6 fotoreceptorje (vsi sevi razen *ninaE* in *sev;ninaE*). Doslej je veljalo, da gre celo za fiziološko manifestacijo mutacije *rdgC*, naši podatki pa tega ne potrjujejo.
- Podatki, pridobljeni iz jakostnih krivulj so absolutne vrednosti, ki smo jih mogli uporabiti v nadaljnjih računskih postopkih. Medtem, ko nam spektralne občutljivosti povedo le relativna razmerja med posameznimi absorpcijskimi vrhovi centralnih fotoreceptorjev. Podatki eni z drugimi se tako dopolnjujejo in oboji dokazujejo, da ostanejo centralni fotoreceptorji tekom staranja tako na svetlobi, kot v temi gojenih mušic, neprizadeti (razen v sevih, kjer mutacija *sev* narekuje drugače – brez R7 celic). Ohranijo se razmerja v populacijah centralnih fotoreceptorjev in nasploh te populacije

- Vseh šest sevov, uporabljenih tekom te raziskave, lahko po zaslugi genetske manipulacije in svetlobnih tretmajev (20 sekundni modri pulz pred izvajanjem protokola spektralne občutljivosti) uvrstimo v dve, po ERG zapisih, različni skupini. Prva skupina sevov *A35*, *ninaE*, *rdgC* odgovarja na draženje z R7 in R8 centralnimi fotoreceptorja. Druga skupina sevov *sev*, *sev;ninaE* in *sev;rdgC* pa z R8 razredom centralnih fotoreceptorjev
- Izkazalo se je, da so se tudi na sevu *rdgC* uporabljenem v naših eksperimentih sčasoma spontano pojavili kompenzacijski mehanizmi, ki zaobidejo popolno degeneracijo. Nadaljnji selekcijski pritiski favorizirajo večje preživetje le teh. Zato sklepamo, da ta mutacija vpliva na viabilnost osebkov. Primerljivost podatkov z izvirnih člankov in na splošno med raziskavami narejenimi z različnimi sevi *rdgC* je zatorej otežena.
- Proces degeneracije fotoreceptorjev je pri sevu vinske mušice z okvarjenim genom za fosfatazo *RdgC* neenakomeren. Očitno centralnih fotoreceptorjev ta okvara ne ovira, saj pri vseh sevih ostanejo funkcionalni. S temi dokazi smo ovrgli našo izvirno hipotezo o sicer zakasneli degeneraciji centralnih R7 in R8 – Rh5 receptorskih celic.



## 5 POVZETEK

Z G proteini sklopljene receptorske molekule predstavljajo najpomembnejšo družino molekularnih receptorjev, ki sodelujejo pri številnih transdukcijskih mehanizmi. Primerno orodje za preučevanje je uporaba genetsko spremenjenih vinskih mušic (*Drosophila melanogaster*), ki imajo v fototransdukcijskem mehanizmu vključeno heptehelikano receptorsko molekulo, rodopsin. Njegovo aktivacijo in ugašanje proži absorpcija fotona. Pri ugašanju posredujejo vezava arestina in multipla fosforilacija ter defosforilacija citoplazemskega terminalnega konca rodopsinske molekule.

V našem delu smo želeli osvetliti pomen fosforilacije rodopsina pri *Drosophila melanogaster* v procesu inaktivacije rodopsina. Zanimalo nas je, če obstaja alternativna pot inaktivacije rodopsinske molekule, brez procesa fosforilacije. Dosedanje študije mutantnih sevov vinske mušice z okvarjenim encimom za defosforilacijo rodopsina (*RdgC*), kažejo, da so njihovi fotoreceptorji podvrženi hitri, s svetlobo pogojeni degeneraciji. Vendar degeneracija ni popolna, saj lahko pri poljubno starih živalih izmerimo rezidualni ERG. Domnevali smo, da se apoptozi izognejo centralne R8 fotoreceptorske celice, predvsem tiste, ki vsebujejo rodopsin Rh6. Metarodopsinska oblika Rh6 je termično labilna in spontano prehaja v rodopsinsko obliko. Zato morda fosforilacija rodopsina Rh6 ni nujna za regeneracijo receptorske molekule, posledično pa bi se ta razred celic lahko izognil apoptozi.

Hipotezo smo preverili z meritvijo spektralne občutljivosti pri transgenih mušicah z od fosforilacije rodopsina odvisno degeneracijo fotoreceptorjev (sev *rdgC*), ter pri transgenih mušicah z dvojno mutacijo *sev;rdgC*, ki so poleg prej omenjenega še brez R7 fotoreceptorskih celic. Osredotočili smo se na mušice z napredovano degeneracijo, pri katerih smo pričakovali vrh spektralne občutljivosti v zelenem delu svetlobnega spektra, značilen za Rh6 rodopsin. Drug indic za selektivno ohranitev celic z rodopsinom Rh6 je meritev PDA, ki se ga pri teh celicah zaradi nestabilne metarodopsinske konformacije ne da izzvati. Kot kontrolni sev smo uporabili *ninaE* mušice z okvarjenim genom za rodopsin Rh1, pri katerih so funkcionalni le centralni receptorji R7 in R8, ter dvojno mutanto

*sev;ninaE*, ki ima poleg prej omenjene okvare še odsotne R7 receptorje. Poleg tega smo vsem sevom postavili še kontrolno paralelo gojeno v temi, ki je služila kot dokaz, da od svetlobe odvisna degeneracija v temi ne poteče.

V namene preučevanja centralnega fotoreceptorja R8 smo vzgojili dva seva, ki vsebujeta le Rh6 rodopsin. To smo dosegli z dvojnima mutantama *sev;rdgC* in *sev;ninaE*. Glede na zakonitost centralnega razreda fotoreceptorskih celic, da se ob odsotnosti R7 celic (npr. mutanta *sev*) v R8 celicah ekspresira le Rh6 rodopsin, smo tako prvi zabeležili in okarakterizirali ERG, jakostno krivuljo ter spektralno občutljivost Rh6 rodopsina *in vivo*. Ti podatki so nam koristili kot šablona, saj smo po naši hipotezi pričakovali, da se bo sev *rdgC* gojen na svetlobi obnašal podobno tem.

Izkazalo se je, da v sevu *rdgC* z apoptozo propadejo le periferne R1-6 celice, centralni R7 in R8 fotoreceptorji pa ostanejo neprizadeti in funkcionalni. Tekom staranja se zmanjšuje njihova amplituda odgovora na enako izzvane svetlobne dražljaje. Odgovori so zadovoljivo podobni njihovi kontroli seva *ninaE*. Tako lahko ovržemo hipotezo o časovno odvisnem propadu R7 in Rh5 vsebujočimi R8 fotoreceptorji na svetlobi gojenih mušic. Saj ne kažejo nikakršnih podobnosti s sevoma *sev;ninaE* in *sev;rdgC* pri katerih dejansko funkcionira le z Rh6 rodopsinom opremljena R8 fotoreceptorska celica. To dokazuje, da lahko izvorno hipotezo ovržemo.

## 6 VIRI

- Alloway, P., Dolph, P.J. (1999). A role for the light dependent phosphorylation of visual arrestin. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:6072-6077.
- Alloway, P., Howard, L., Dolph, P.J. (2000). The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. Neuron 28:129-138.
- Belušič, G. (1998). Elektrofiziologija fotoreceptorjev različnih mutant vinske mušice. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Belušič, G. (2003) Vpliv genetsko spremenjenega fototransdukcijskega kompleksa na potek ERG vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Doktorsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Davidson, F.F. and Steller, H. (1998). Blocking apoptosis prevent blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. Nature 391, 587-591
- Dolph, P. J., Ranganathan, R., Colley, N. J., Hardy, R. W., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1993). Arrestin function in inactivation of G protein- coupled receptor rhodopsin *in vivo*. Science 260:1910-1916.
- Feiler R., Bjornson R., Kirschfeld K., Mismer D., Rubin G.M., Smith D.P., Socolich M., Zuker C.S. (1992) Ectopic expression of ultravioletrhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. J Neurosci 12:3862–3868.

- Hamdorf, K., Hochstrate, P., Hoeglund, G., Moser, M., Sperber, S., Schlecht, P. (1992). Ultraviolet sensitizing pigment in blowfly photoreceptors R1-6; probable nature and binding sites. *Journal of comparative physiology A* 171:601-615
  
- Hamdorf, K., Schwemer, J. (1975) Photoregeneration and the adaptation process in insect photoreceptors. *Photoreceptor Optics*, ed. A.W.Snyder in R.Menzel, 263-289
  
- Hardie, R.C. (1978). Electrophysiological Analysis of Fly Retina. 1: Comparative Properties of R1-6 and R7 and 8. *J.comp. Physiol.* 129: 19-33.
  
- Hardie, R.C. (1985). Functional organisation of the fly retina. *Progress in Sensory Physiology.* 5:1-79. Springer, Berlin.
  
- Hardie, R.C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J.Exp.Biol.* 204:3403-3409
  
- Hardie, R.C., Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature.* 413: 186-193
  
- Huber, A., Belušič, G., Da Silva, N., Bahner, M., Gerdon, G., Drašlar, K., and Paulsen, R. (2000). The *Calliphora rpa* mutant lacks the PDZ domain-assembled INAD signalling complex. *Eur J Neurosci* 12:3909-3918.
  
- Kirschfeld, K. (1973). Das neurale Superpositionsauge. V:Fortshritte der Zoologie. 21:229-257. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
  
- Kiselev, A., and Subramaniam, S. (1994). Activation and regeneration of rhodopsin in the insect visual cycle. *Science* 266:1369-1373.
  
- Kiselev, A., Socolich, M., Vinos, J., Hardy, R. W., Zuker, C. S., Ranganathan, R. (2000). A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* 28:139-152.

Lee, S., Montell, C. (2001). Regulation of the Rhodopsin Protein Phosphatase, RDGC, through Interaction with Calmodulin. *Neuron* 32:1097-1106

- Matić, T., Laughlin, S.B. (1981) Changes in the intensity-response function of an insect's photoreceptors due to light adaptation. *Journal of Comparative Physiology – A*. 145: 169-177

- Mendez, A., Burns, M. E., Roca, A., Lem, J., Wu, L.-W., Simon, M. I., Baylor, D. A., and Chen, J. (2000). Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron* 28:153-164.

- Ranganathan, R. (2003). A matter of life or death. *Science*, 299:1677-1679

- Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L.V., Chou, W.H., Paulsen, R., Britt, S.G. (1999). Blue- and green- absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J. Neurosci.* 19:10716-10726

- Scott, K. and Zuker, C. (1997). Lights out: deactivation of the phototransduction cascade. *Trends. Biochem. Sci.* 22:350-354

- Stavenga, D.G. (1995). Insect retinal pigments: Spectral characteristics and physiological functions. *Progress in Retinal and Eye Research*. 15:231-259

- Stavenga, D.G., Oberwinkler, J., Postma, M. (2000). Modeling primary visual processes in insect photoreceptors. *Handbook of Biological Physics* 3:529-570

- Steele, F., O'Tousa, J. (1990). Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila*. *rdgC* mutant. *Neuron* 4:883-890

- Steele, F., Washburn, T., Rieger, R. (1992). *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69:669-676
  
- Šuštar, M. (2004). Potek od fosforilacije rodopsina odvisne degeneracije fotoreceptorjev pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*, Insecta: Diptera). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
  
- Vinos, J., Jalink, K., Hardy, R.W., Britt, S.G., and Zuker, C.S. (1997). A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* 277:687-690
  
- Wessels, G. (2002) Funktionsanalyse der lichtaktivierten Phosphorylierung des Rhodopsins (Rh1) von *Drosophila melanogaster* mittels gerichteter Mutagenese und Keimbahntransformation. Doktorska naloga, Universitaet Karlsruhe.
  
- Zuker, C. S., Cowman, A. F., Rubin, G. M. (1985). Isolation and structure of a rhodopsin gene from *Drosophila melanogaster*. *Cell* 40, 851-858

## ZAHVALA

Zahvaljujem se:

- asist. dr. Gregorju Belušiču za veliko mero potrpežljivost, ki jo je porabil zame, ter za razumevajoč odnos do mojih jutranjih spalnih navad;
- doc. dr. Petru Stušku za mentorstvo pri diplomski nalogi in za (pre)mnoge odmore, s katerimi mi je pomagal premagati miselne ovire in me spravil nazaj na pravo pot;
- doc. dr. Kazimirju Drašlarju za vso znanje, natančnost in red, ki ga je uspel vcepiti v moje »podstrešje«;
- doc. dr. Gregorju Zupančiču za vodstvo, znanje in nasvete, ki sem jih bil deležen;
- Suzani Logar, Alešu Škorjancu in Andreju Megliču za dobro družbo, tehnično pomoč ter nasvete;

Skratka zahvala za uspešno zaključeno delo, ki je pred vami gre celotni Katedri za fiziologijo živali;

- dr. David Richterju, Raziskovalni center Karlsruhe, za načrt postopka pridobitve ustreznih križancev;
- ter celi moji družini, ki je morala prenašati mojo betežnost, nezgovornost in vsesplošno odsotnost, še posebej v zadnjih dnevih nastajanja tega dokumenta.

Hvala!

## PRILOGA 1

### SESTAVA GOJIŠČA ZA VINSKE MUŠICE

- agar 2.4 g
- sladkor 6.4 g
- kvas 21.0 g
- koruzna moka 16.8 g
- voda 200.0 mL

prekuhamo ob mešanju

ohladimo na 60°C in dodamo

- nipagin (metilester 4-hidroksibenzojske kisline, 10% v etanolu) 128mL
- vitamin C 100 mg
- propionska kislina 10 mL

### SESTAVA DAVENPORTOVE FIZIOLOŠKE RAZTOPINE ZA INSEKTE

NaCl: 6,7 g

KCl: 0,15 g

CaCl<sub>2</sub>: 0,12 g

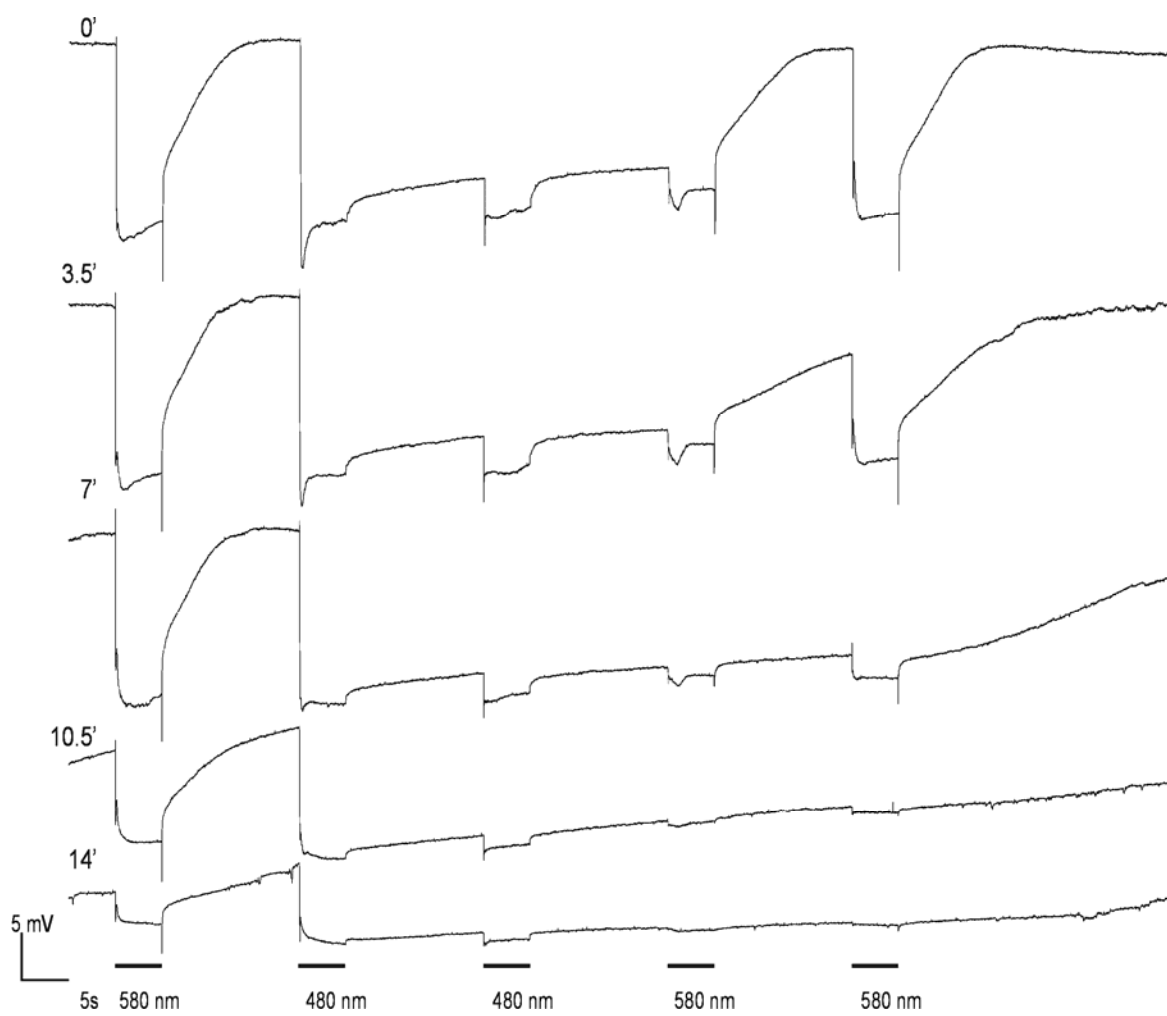
NaHCO<sub>3</sub>: 0,15 g

v 1000 mL vode

pH = 7,2



## PRILOGA 2



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Uroš VIDEMŠEK

**DEGENERACIJA CENTRALNIH  
FOTORECEPTORJEV PRI VINSKI MUŠICI  
(*Drosophila melanogaster*) SEVA *rdgC***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008