

Ulrich Storz

Untersuchungen zur spektralen Empfindlichkeit von  
*Aplysia californica*  
mit elektrophysiologischen und optischen Methoden

2002

Dekan: Prof. Dr. R. J. Paul  
Erster Gutachter: Prof. Dr. R. J. Paul  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Klämbt  
Tag der mündlichen Prüfung:  
Tag der Promotion:

Stoffwechselphysiologie

Untersuchungen zur spektralen Empfindlichkeit von  
*Aplysia californica*  
mit elektrophysiologischen und optischen Methoden

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Ulrich Storz aus Münster

2002

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster, den .....

Hiermit erkläre ich mich mit der Zulassung von Zuhörerinnen/Zuhörern bei der mündlichen Prüfung einverstanden / nicht einverstanden.

Münster, den .....

## **Danksagung**

Mein allererster Dank gilt meinen Eltern und meiner Tante Ursula Richmering für ihre Liebe, Geduld und Großzügigkeit.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. R. J. Paul möchte ich dafür danken, daß er mir die Welt der spannungsabhängigen Farbstoffe überantwortet hat, sowie für seine Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit.

Michael Allan, Esq., danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit korrekturlesen. Gleiches gilt für Dr. Hans-Ulrich Steeger, dem ich auch in anderer Hinsicht viel verdanke, insbesondere was unser gemeinsames Faible für marine Tiere betrifft.

Meinen MitdoktorandInnen Bertram Becher, Jürgen Freitag, Christopher Bäumer und Gabriele Müller, den technischen Assistentinnen Ina Buchen und Gudula Müller sowie Dr. Ralf Pirow danke ich für das freundliche Klima im Institut, das von ständigem gegenseitigen Interesse, einem einmalig innovativen Esprit und einer chronischen Musikalität geprägt war.

Rudi Derks gilt mein besonderer Dank für seine Hilfsbereitschaft und sein Interesse an den technischen Problemen, mit denen ich ihn regelmäßig konfrontiert habe. Georg Plenge und Ludger Sasse danke ich für Hilfeleistung bei vielen kniffligen Elektronikproblemen.

Die Hilfe und Freundlichkeit, die ich durch die Doktores Erwin Speckmann, Larry Cohen und Brian Salzberg erfahren habe, ist mit Worten kaum zu beschreiben. Ohne Ihre Unterstützung im Umgang mit spannungsabhängigen Farbstoffen wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen.

Gleiches und noch mehr gilt für Kohtaro Kamino, Katsushige Sato und Yoko Momose-Sato, denen ich für ihre unbeschreibliche Gastfreundschaft bei zwei Forschungsaufenthalten an der Tokyo Medical and Dental University sowie für Ihre großzügigen Farbstoffspenden zu großem Dank verpflichtet bin.

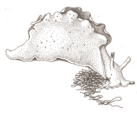
Jack Rogers und seinen Kollegen Rick Gray, Bill Smith and Ray Ideker verdanke ich einen wunderschönen Aufenthalt an der University of Alabama. Ich möchte mich für die entgegengebrachte Gastfreundschaft und das aufrichtige Interesse herzlich bedanken.

Jon Jacklet, Jian-Young Wu und Etsuro Ito danke ich für bereitwillige und wiederholte Hilfe per e-mail. Sie haben durch ihre Unterstützung dem Begriff der "Scientific Community" alle Ehre gemacht.

Matthias Sammer gilt mein Dank für seine ehrliche, aufrichtige und ernste Art, mit der er Borussia Dortmund wieder auf Kurs gebracht hat.

Ich danke den Mitgliedern der Band strand, Thilo Schenk, Marcel Bach und Edwin Steffen, für wunderschöne Stunden im Proberaum, im Studio und auf der Bühne.

Meiner Lebensgefährtin Judith Jaeger danke ich für Geduld und Verständnis. Die vergangenen Jahre waren für uns nicht leicht, aber gemeinsam haben wir schlimme Zeiten überstanden und sehen hoffentlich besseren entgegen.



“SO IF ONE IS VERY AGGRESSIVE HE WILL BE ABLE TO OBTAIN WORK EVEN UNDER THE MOST SUB-NORMAL ECONOMIC CONDITIONS, BUT ONLY BECAUSE THERE ARE OTHERS, LESS AGGRESSIVE THAN HE. [...] AND SIMILARLY, WE CANNOT JUSTLY APPROVE THE SUCCESS MANUALS THAT TELL OUR HIGH SCHOOL GRADUATES HOW TO GET A JOB – THERE BEING JOBS FOR ONLY HALF OF THEM ! [...]

CONSIDER THE SEA-HARE *TETHYS*, A SHELL-LESS, FLABBY SEA-SLUG, ACTUALLY A MARINE SNAIL, WHICH MAY BE SEEN CRAWLING ABOUT IN TIDAL ESTUARIES, SOMEWHAT RESEMBLING A RABBIT CROUCHED OVER. A CALIFORNIA BIOLOGIST ESTIMATED THE NUMBER OF EGGS PRODUCED BY A SINGLE ANIMAL DURING A SINGLE BREEDING SEASON TO BE MORE THAN 478 MILLION ! [...] OBVIOUSLY, ALL THESE EGGS CANNOT MATURE, ALL THIS POTENTIAL CANNOT, *MUST NOT*, BECOME REALITY, ELSE THE OCEAN WOULD SOON BE OCCUPIED EXCLUSIVELY BY SEA-HARES. [...] ON THE AVERAGE, PROBABLY NO MORE THAN THE BIBLICAL ONE OR TWO ATTAIN FULL MATURITY. [...] NOW PICTURE THE COMBINATION MOTHER-FATHER SEA-HARE (THE ANIMALS ARE HERMAPHRODITIC, WITH THE USUAL CROSS-FERTILIZATION) PARENTALLY BLESSING ITS OFFSPRING WITH THESE WORDS: ‘WORK HARD AND BE AGGRESSIVE, SO YOU CAN GROW INTO A NICE HUSKY *TETHYS* LIKE YOUR TEN-POUND PARENT.’ IMAGINE IT, THE HYPOCRITE, THE ILLUSIONIST, THE POLLYANNA, THE GENIAL LIAR, SAYING THAT TO ITS MILLIONS OF EGGS *EN MASSE*, WITH THE DICE LOADED AT SUCH A RATIO ![...] AND THERE IS EVEN A SEMBLANCE OF TRUTH IN THE PARENT SEA-HARE’S ADMONITION, SINCE EVEN HERE, WITH THIS ALMOST INFINITESIMAL DIFFERENTIAL: THE RACE IS STILL TO THE SWIFT AND/OR TO THE LUCKY.”

### John Steinbeck, *The Log from the Sea of Cortez*



“IN THE TIBETAN BUDDHIST PANTHEON OF ENLIGHTENED BEINGS, CHENREZIG IS RENOWNED AS THE EMBODIMENT OF THE COMPASSION OF ALL THE BUDDHAS, THE BODHISATTVA OF COMPASSION. AVALOKITESHVARA IS THE EARTHLY MANIFESTATION OF THE SELF BORN, ETERNAL BUDDHA, AMITABHA. HE GUARDS THIS WORLD IN THE INTERVAL BETWEEN THE HISTORICAL SAKYAMUNI BUDDHA, AND THE NEXT BUDDHA OF THE FUTURE MAITREYA. ACCORDING TO LEGEND, CHENREZIG MADE A VOW THAT HE WOULD NOT REST UNTIL HE HAD LIBERATED ALL THE BEINGS IN ALL THE REALMS OF SUFFERING. AFTER WORKING DILIGENTLY AT THIS TASK FOR A VERY LONG TIME, HE LOOKED OUT AND REALIZED THE IMMENSE NUMBER OF MISERABLE BEINGS YET TO BE SAVED. SEEING THIS, HE BECAME DESPONDENT AND HIS HEAD SPLIT INTO THOUSANDS OF PIECES. AMITABHA BUDDHA PUT THE PIECES BACK TOGETHER AS A BODY WITH VERY MANY ARMS AND MANY HEADS, SO THAT CHENREZIG COULD WORK WITH MYRIAD BEINGS ALL AT THE SAME TIME. SOMETIMES CHENREZIG IS VISUALIZED WITH ELEVEN HEADS, AND A THOUSAND ARMS FANNED OUT AROUND HIM. CHENREZIG MAY BE THE MOST POPULAR OF ALL BUDDHIST DEITIES, EXCEPT FOR BUDDHA HIMSELF -- HE IS BELOVED THROUGHOUT THE BUDDHIST WORLD. HE IS KNOWN BY DIFFERENT NAMES IN DIFFERENT LANDS: AS AVALOKITESHVARA IN THE ANCIENT SANSKRIT LANGUAGE OF INDIA, AS KUAN-YIN IN CHINA, AS KANNON IN JAPAN.”

### Tenzin Gyatso, 14th Dalai Lama of Tibet

## ***abbreviations***

5-HT	5-hydroxy-tryptamin (serotonin)
A/D	analog to digital
AC	alternating current
AP	action potential
BDM	butanedione monoxime
CAP	compound action potential
CCD	charge-coupled device
CMOS	complementary metal oxide semiconductor
DC	direct current
ECG	electrocardiogram
EEG	electroencephalogram
EPSP	excitatory postsynaptic potential
FFT	Fast Fourier Transformation
fMRI	functional magnet resonance imaging
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GFP	green fluorescent protein
Hb	haemoglobin
I/V	current to voltage
IC	integrated circuit
LED	light emitting diode
NA	numerical aperture
OD	outer diameter
PDA	photodiode array
PET	Positron Emission Tomography
QE	light quantum efficiency
S/N	signal-to-noise ratio
TTL	Transistor Transistor Logic
TTX	Tetrodotoxin
UV	ultraviolet light (280 – 390 nm)
VIS	visible light (390 – 780 nm)
VSD	voltage sensitive dye
$\Delta I/I$	fractional light intensity change

# Table of contents

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1. VISION CHAIN OF <i>APLYSIA</i>	2
1.2. SPECTRAL SENSITIVITY IN <i>APLYSIA</i> AND OTHER GASTROPODS	3
1.3. PHOTOTAXIS IN <i>APLYSIA</i> AND OTHER GASTROPODS	3
1.4. IMPACT OF SOLAR UV ON <i>APLYSIA</i>	4
1.5. OUTLINE OF THE EXPERIMENTAL PROGRAM	5
1.6. VOLTAGE SENSITIVE DYES AS A TOOL FOR NEUROPHYSIOLOGY	5
1.6.1. The method	5
1.6.2. Historical outline	6
1.6.3. Advantages and limitations	7
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>8</b>
2.1. ANIMALS	8
2.1.1. <i>Aplysia californica</i> Cooper (Aplysiidae, Anapsidea, Ophistobranchia, Gastropoda)	8
2.1.2. <i>Lymnaea stagnalis</i> Linneaus (Lymnaeidae, Basommatophora, Pulmonata, Gastropoda)	8
2.1.3. <i>Xenopus laevis</i> Daudin (Aglossa, Anura, Amphibia)	8
2.1.4. <i>Palaemon elegans</i> Rathke (Palaemonidae, Natantia, Decapoda, Malacostraca)	8
2.2. BEHAVIORAL TESTING	9
2.3. EXTRACELLULAR RECORDING TECHNIQUES OF <i>APLYSIA</i> OPTIC NERVE ACTIVITY	11
2.3.1. Determination of the spectral sensitivity in the UV	12
2.3.2. Bleaching experiments	14
2.4. INTRACELLULAR RECORDING OF MEMBRANE POTENTIAL	15
2.4.1. Receptor potentials of <i>Aplysia</i> retina cells	15
2.4.2. Membrane potential recording of cerebral ganglion cell responses after eye stimulation	17
2.4.3. <i>Xenopus</i> atrium recordings	18
2.5. OPTICAL RECORDINGS OF MEMBRANE POTENTIAL CHANGES	19
2.6. PRELIMINARY VSD EXPERIMENTS	20
2.6.1. Laser-diode based apparatus for real-time ratiometric measurements	20
2.6.2. <i>Xenopus</i> neurohypophysis	21
2.6.3. <i>Lymnaea</i> nerves	23
2.6.4. <i>Xenopus</i> atrium	24
2.7. <i>APLYSIA</i> OPTICAL RECORDINGS	24
2.7.1. <i>Aplysia</i> cerebral ganglion	24
2.7.2. <i>Aplysia</i> abdominal ganglion	26
2.8. <i>PALAEEMON</i> EYESTALK EXPERIMENTS	26
2.9. LISTING OF THE PHOTODIODE ARRAYS USED IN THIS STUDY	28

<b>3. RESULTS .....</b>	<b>29</b>
3.1. BEHAVIORAL EXPERIMENTS	29
3.2. SPECTRAL SENSITIVITY	31
3.3. BLEACHING EXPERIMENTS	32
3.4. RECEPTOR POTENTIAL MEASUREMENTS	36
3.5. CEREBRAL GANGLION CELL RESPONSES AFTER EYE STIMULATION	39
3.6. OPTICALLY MEASURED ACTION POTENTIALS IN THE <i>XENOPUS</i> NEUROHYPOPHYSIS	40
3.7. OPTICAL RECORDINGS OF <i>LYMNAEA</i> NERVE ACTION POTENTIALS	42
3.8. <i>XENOPUS</i> ATRIUM OPTICAL RECORDINGS	44
3.9. OPTICAL RECORDINGS OF THE <i>APLYSIA</i> ABDOMINAL GANGLION	47
3.10. OPTICAL RECORDINGS OF THE <i>APLYSIA</i> CEREBRAL GANGLION	49
3.11. <i>PALAEMON</i> EYESTALK RECORDINGS	53
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>55</b>
4.1. SPECTRAL SENSITIVITY	55
4.2. ON THE COMPOSITION OF PIGMENTS IN THE <i>APLYSIA</i> RETINA	55
4.2.1 Two different cell types with different spectral sensitivities ?	56
4.2.2 Do a UV rhodopsin and a VIS rhodopsin coexist in the same receptor cells ?	57
4.2.3 Is a sensitizing pigment or the rhodopsin $\beta$ -peak responsible for the UV sensitivity ?	60
4.3. THE PROJECTION OF VISUAL STIMULI IN THE <i>APLYSIA</i> CEREBRAL GANGLION	61
4.4. THE EFFECTS OF UV AND GREEN LIGHT ON <i>APLYSIA</i> PHOTOTAXIS	62
4.5. INTERPRETATION OF OPTICAL SIGNALS FROM <i>LYMNEA</i> NERVES	64
4.6. OPTICAL MEASUREMENTS OF CARDIAC ACTION POTENTIALS	65
4.7. RESULTS OF THE RATIOMETRIC MEASUREMENTS	66
4.8. ON THE PRINCIPLES OF VOLTAGE SENSITIVE DYES	67
4.8.1. Noise considerations	68
4.8.2. Choice of an adequate imaging device	70
4.8.3. Fluorescence or absorbance dyes	71
4.9. FUTURE PERSPECTIVES OF OPTICAL TECHNIQUES IN NEUROPHYSIOLOGY	73
4.9.1. FRET dyes	73
4.9.2. Genetically encoded probes	74
4.9.3. Nonlinear optical measurements of second harmonic generation	75
4.9.4. Better imaging systems	76
4.9.5. Optical stimulation techniques	77
<b>5. SUMMARY .....</b>	<b>79</b>
<b>6. REFERENCES .....</b>	<b>80</b>

**7. APPENDIX .....87**

7.1. DYES	87
7.2. SPECTRA	88
7.2. QUICKBASIC PROGRAMS	89
7.3. FLEXISTIM SOFTWARE	90
7.4. CONSIDERATIONS ON REAL-TIME RATIOOMETRY	91
7.5. CUSTOM-MADE INSTRUMENTS	92
7.5.1. Stimulus isolation unit	92
7.5.3. Extracellular amplifier	93
7.5.4. Photodiode module	93
7.5.5. Power supply	93