

**Mechanismen der lichtabhängigen Translokation des
Ionenkanals TRPL in den Photorezeptoren von
Drosophila melanogaster.**

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Nina Esther Meyer
aus Heilbronn

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: Prof. Dr. Armin Huber
Korreferent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 2005

Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Artikel:

Chorna-Ornan I, Tzarfaty V, Ankri-Eliahoo G, Joel-Almagor T, Meyer NE, Huber A, Payre F, Minke B (2005). Light-regulated interaction of Dmoesin with TRP and TRPL channels is required for maintenance of photoreceptors. *J Cell Biol* 171, 143-152.

Kongressbeiträge:

Meyer N, Huber A (2005). An F1 genetic screen for translocation defects of the ion channel TRPL-eGFP in *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* 84, Suppl. 55, 124.

Meyer N, Paulsen R, Huber A (2004). Relocation of the TRPL ion channel in *Drosophila* photoreceptors depends on the presence of rhodopsin, the TRP channel and the scaffolding protein INAD. *Eur J Cell Biol* 83, Suppl. 54, 72.

Meyer N, Paulsen R, Huber A (2003). Subcellular targeting of the TRPL ion channel in *Drosophila* photoreceptors studied with the aid of a TRPL-eGFP reporter gene. In: 18th European *Drosophila* Research Conference October 2-4, 2003 (U. Nauber and E. Vetter eds.), H21.

Meyer N, Paulsen R, Huber A (2003). Light-regulated ion channel relocation in photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster* - a TRPL-eGFP reporter gene study. In: Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th meeting of the German Neuroscience Society 2003 (N. Elsner and H. Zimmermann eds.) Thieme, Stuttgart, New York, p537.

Meyer N, Paulsen R, Huber A (2003). Analysis of light-regulated relocation of the TRPL ion channel in *Drosophila* photoreceptors using an eGFP reporter gene. *Eur J Cell Biol* 82, Suppl. 53, 114.

Danksagung

Armin Huber danke ich vielmals für seine wertvollen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen und seine Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit. Bei Prof. Martin Bastmeyer möchte ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Korreferats danken.

Ganz herzlich danken möchte ich Tanja Landmann für ihre wertvolle Unterstützung bei etlichen Kreuzungen und bei der Durchführung so mancher immunocytochemischer Analysen. Vor allem beim Einbetten der Präparate war sie eine große Hilfe. Der Arbeitsgruppe von Prof. Baruch Minke an der Hebrew University in Jerusalem danke ich für die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen und der Bereitstellung der gewonnenen Daten für diese Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für das freundschaftliche Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen. Dies gilt insbesondere für meine liebe Kollegin und Bürogenossin Kristina Hartmann, die mich immer großartig unterstützt und mit ihrer erfrischenden Art so manches Mal für Erheiterung gesorgt hat.

Ein spezieller Dank geht an meine Computer-Experten Thorsten Rucktäschel, Roberto Lattanzio, Dirk Lehnert und meinen Bruder Jan, die immer ein offenes Ohr für Schwierigkeiten hatten und ohne die so manches Problem wohl nicht gelöst worden wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meine Arbeit immer nachhaltig unterstützt und gefördert haben.

Ein herzliches Dankeschön geht natürlich auch an Florian, für sein Vertrauen, seine Geduld und seine immerwährende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das visuelle System von <i>Drosophila melanogaster</i>	4
2.2	Signaltransduktion in den Photorezeptoren von <i>Drosophila</i>	6
2.3	Die Ionenkanäle der TRP-Familie	9
2.3.1	Der Ionenkanal TRPL	11
2.4	Problemstellung	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Chemikalien und sonstige Materialien	15
3.1.1.1	<i>Bakterien und Konstrukte</i>	16
3.1.1.2	<i>Häufig verwendete Puffer und Lösungen</i>	16
3.1.2	Antikörper	18
3.1.3	Versuchstiere	18
3.1.3.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	18
3.1.3.2	<i>Kaninchen</i>	20
3.1.4	Soft- und Hardware, spezielle Geräte	20

3.2 Methoden	21
3.2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen	21
3.2.2 Belichtung der Fliegen	21
3.2.3 Präparation biologischen Materials	23
3.2.3.1 <i>Präparation von Gesamtextrakten aus Drosophila Köpfen</i>	23
3.2.3.2 <i>Präparation der Fliegen für Immuncytochemie</i>	23
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	24
3.2.4.1 <i>Isolierung von RNA aus Drosophila Köpfen</i>	24
3.2.4.2 <i>Herstellung von Digoxigenin-markierter cRNA-Sonde</i>	24
3.2.4.3 <i>Northern Blot</i>	24
3.2.4.4 <i>Rekombinante Expression in E. coli M15[pREP4]: Antigenexpression</i>	25
3.2.5 Biochemische Methoden	27
3.2.5.1 <i>Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay</i>	27
3.2.5.2 <i>SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese</i>	27
3.2.5.3 <i>Färbung der Proteine auf SDS-Gelen mit Coomassie</i>	28
3.2.5.4 <i>Western Blot</i>	28
3.2.5.5 <i>Färbung von PVDF-Membranen mit Amidoschwarz</i>	29
3.2.5.6 <i>Immunisierung von Kaninchen</i>	29
3.2.5.7 <i>Affinitätsreinigung von Antiseren</i>	30
3.2.6 Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	30
3.2.6.1 <i>Anfertigung von Cryoschnitten für die Immuncytochemie</i>	30
3.2.6.2 <i>Durchführung der Immunmarkierungen auf Cryoschnitten</i>	30
3.2.6.3 <i>Dokumentation von Fluoreszenzsignalen</i>	31
3.2.6.4 <i>Wasserimmersionsmikroskopie</i>	31
3.2.6.5 <i>Quantifizieren von Fluoreszenzsignalen</i>	33
3.2.6.6 <i>Beobachtung der tiefen Pseudopupille</i>	33
3.2.7 <i>Drosophila-Genetik</i>	34
3.2.7.1 <i>Durchführung von Kreuzungen</i>	34
3.2.7.2 <i>Mutagenese-Screen</i>	34

3.2.7.3	<i>Lokalisation von Mutationen mittels Deletionskartierung</i>	36
3.2.8	Elektrophysiologie	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Erzeugung und Aufreinigung von Antiserum gegen <i>Drosophila</i>-TRP	40
4.2	Spezifität der Antikörper α-DmTRPL und α-GFP	42
4.3	Expression von TRPL-eGFP in transgenen <i>Drosophila</i>	43
4.3.1	Abschätzung der mRNA-Menge an <i>trpl-eGFP</i> in transgenen Fliegen	43
4.3.2	Abschätzung der Proteinmenge an TRPL-eGFP in transgenen Fliegen	44
4.4	Funktionalität von TRPL-eGFP	46
4.5	Lichtabhängige Wanderung von TRPL-eGFP	47
4.6	Kinetik der TRPL-eGFP Wanderung	48
4.7	Einfluss von Schlüsselkomponenten der Phototransduktionskaskade auf die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP	50
4.7.1	Die lichtabhängige Wanderung von TRPL-eGFP ist abhängig von funktionalem Rhodopsin	51
4.7.2	Die Rolle der Arrestine bei der lichtabhängigen Wanderung des TRPL-eGFP	54
4.7.3	Einfluss der α -Untereinheit des visuellen G-Proteins auf die lichtabhängige Translokation des TRPL-eGFP	55
4.7.4	Phospholipase C β	57
4.7.5	Der Ionenkanal TRP ist essentiell für die Translokation des TRPL-eGFP: Proteine, die die Funktion von TRP beeinflussen	58
4.8	Mögliche zellbiologische Transportmechanismen	61
4.9	Mutagenese-Screen	63
4.9.1	Herstellung der für den Mutagenesescreen benötigten Mutanten	65
4.9.2	Übersicht über den Ablauf des Mutagenese-Screens	68
4.9.3	Charakterisierung der Mutante NM(2L)4.52	70
4.9.3.1	<i>Deletionskartierung</i>	75
4.9.4	Charakterisierung der Mutanten mit Mutation auf dem Chromosomenarm 3R	78

5	Diskussion	83
5.1	Expression von TRPL-eGFP in transgenen <i>Drosophila</i>	84
5.2	TRPL-eGFP bildet funktionelle Kanäle	85
5.3	Vergleich der Kinetiken der Wanderung von TRPL-eGFP in <i>Drosophila</i> und TRPL in <i>Calliphora</i>	87
5.4	Rolle von Komponenten der Phototransduktionskaskade für die Wanderung von TRPL-eGFP	89
5.4.1	Diskrepanzen bei der Internalisierung von TRPL-eGFP und TRPL	91
5.5	Mögliche Mechanismen der TRPL Wanderung	91
5.6	Mutagenesecscreen	95
5.7	Deletionskartierung	99
	Literaturverzeichnis	102
	Abkürzungen	120
	Anhang	123

1 Zusammenfassung

Die signalvermittelte Translokation von Signalproteinen zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten ist ein neuartiger Mechanismus um die Funktion von Signalwegen zu modulieren. Die Phototransduktionskaskade von *Drosophila* ist ein prototypischer G-Protein gekoppelter Signalweg, der in der Öffnung der Kationenkanäle TRP („*transient receptor potential*“) und TRPL („*TRP-like*“) gipfelt. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der TRPL-Kanal zwischen den Rhabdomeren und dem Zellkörper lichtabhängig hin- und herwandert, wobei diese Wanderung die Zusammensetzung der Ionenkanäle in der rhabdomerischen Membran modifiziert und eine Langzeit-Adaptation hervorruft [6], [7]. Dennoch ist der molekulare Mechanismus, der dieser Wanderung zugrunde liegt, noch nicht bekannt.

Um diesen Mechanismus aufzuklären wurde in der vorliegenden Arbeit ein mit eGFP [20], [29], [36] markiertes TRPL in den Photorezeptoren von *Drosophila* exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass TRPL-eGFP funktionale Ionenkanäle mit denselben Eigenschaften wie native Kanäle bildet. Die Wanderung des TRPL-eGFP konnte in den intakten Augen beobachtet werden. Durch Kreuzungen mit verfügbaren *Drosophila*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung einer kleinen Fraktion von Rhodopsin und von geringen Mengen an Gq Protein ausreicht, um die Internalisierung des TRPL-eGFP auszulösen. Die Aktivierung der Phototransduktionskaskade ist notwendig für die Internalisierung des TRPL-eGFP, was auf eine kritische Rolle für das Anwachsen der lichtinduzierten Ionenleitfähigkeit und den darauf folgenden Ca^{2+} -Einstrom für den Wanderungsprozess hinweist. Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass die Endozytose von TRPL-eGFP Dynamin-unabhängig ist, wohingegen eine Mutation des unkonventionellen Myosin III, NINAC, eine komplette Wanderung von TRPL-eGFP in den Zellkörper verhindert.

Mit dem Ziel, neue Mutanten mit einem Defekt in der Translokation des TRPL-eGFP zu identifizieren, wurde ein Mutagenese-Screen durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen F1-Screen, der auf dem Flp/FRT System basiert. Mittels mitotischer Rekombination wurden in der F1-Generation heterozygote *Drosophila* erzeugt, welche in Teilen des Auges homozygot für die betreffende Mutation sind. Die vorliegende Arbeit stellt die sechs aus diesem Screen hervorgegangenen Mutanten vor. Die Mutante NM(2L)4.52, bei der die Mutation auf dem Chromosomenarm 2L lokalisiert ist, wurde genauer charakterisiert. Die Mutation, die in dieser Mutante erzeugt wurde, ist rezessiv und homozygot lethal. Immunocytochemische Analysen zeigen, dass in dieser Mutante das native TRPL sich ebenso verhält wie das TRPL-eGFP. Alle sechs Mutanten tragen rezessive Mutationen und drei davon sind homozygot lethal.

2 Einleitung

Die Aktivität von Signalkaskaden kann durch Modulation der Mengen an regeltechnischen Proteinen in spezialisierten Kompartimenten tiefgreifend beeinflusst werden. Die Konzentrationen solcher Proteine können durch Änderungen der Proteinsynthese oder -degradation verändert werden. Ein schnellerer Mechanismus um die Mengen an Signalproteinen zu regulieren, ist die Wanderung von Proteinen als Antwort auf Stimulation durch den Agonisten. Dynamische Verschiebungen von Signalmolekülen erlauben dem Neuron, die Proteinzusammensetzung in den Kompartimenten der Signaltransduktion anzupassen, um die Empfindlichkeit und Dauer der Lichtantwort zu optimieren. Dies ist notwendig, da die Lichtbedingungen der Umgebung sich im normalen diurnalen Rhythmus drastisch verändern. Langzeitlichtadaptation, sowohl von Vertebraten als auch von Invertebraten Photorezeptoren, geht einher mit einer massiven Wanderung von Signalproteinen zwischen dem zellulären Kompartiment, in dem die Signaltransduktion lokalisiert ist, und dem Zellkörper [5], [46], [48].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellsystem verwendet. Sie ist ein ideales Untersuchungsobjekt um den Mechanismus der Translokation von Signalproteinen, speziell des Ionenkanals TRPL, aufzuklären, da die visuelle Signalkaskade sehr gut untersucht ist und bereits unzählige, gut charakterisierte Mutanten zur Verfügung stehen. Darüber hinaus bietet die *Drosophila*-Genetik leistungsstarke Instrumente, die es erlauben, diesen Mechanismus *in vivo* bestens charakterisieren zu können. *Drosophila melanogaster* wurde erstmals 1830 von J. H. Meigen beschrieben. *Drosophila* ist ein ca. 3mm langes, holometaboles Insekt, welches zu den am besten untersuchten Organismen der heutigen Zeit zählt. Die geringe Größe, der kurze Generationszyklus sowie die einfache Handhabung der Zucht machen diese Fliege zu einem idealen Forschungsobjekt. *Drosophila* verfügt über 4 Chromosomen im haploiden Chromosomensatz. Hierzu gehören die Geschlechtschromosomen X und Y sowie die

Autosomen 2, 3 und 4. Die Größe des Genoms beträgt ca. 165 Millionen Nukleotide und beinhaltet ungefähr 13.600 Gene [2]. Die vollständige genomische Sequenz von *Drosophila* ist seit dem Jahr 2000 bekannt [2]. Die Verfügbarkeit dieser genomischen Sequenz sowie einiger tausend Mutanten mit unterschiedlichsten Defekten machen *Drosophila* zu einem idealen Versuchstier der Genetik. Die Entschlüsselung des Genoms ist jedoch nur ein erster Schritt, um grundlegende Mechanismen in den Zellen zu verstehen. Die größte Herausforderung ist es, die Funktion individueller Gene im Kontext des gesamten Organismus zu erforschen.

2.1 Das visuelle System von *Drosophila melanogaster*

Das visuelle System von adulten *Drosophila* beinhaltet drei Gruppen sensorischer Systeme: die extraretinalen Photorezeptoren, drei Ocelli und zwei paarig angelegte Komplexaugen. Bei den extraretinalen Photorezeptoren handelt es sich um eine Gruppe von jeweils vier Rezeptorzellen, die innerhalb des hinteren Randes der Komplexaugen liegen. Sie entstehen während der Metamorphose aus dem visuellen Organ der Larve, dem Bolwig-Organ [55]. Die Ocelli sind triangular angeordnet und liegen zwischen den beiden Komplexaugen. Sie spielen ebenso wie die extraretinalen Photorezeptoren, vermutlich eine Rolle für die innere Uhr [124]. Die Komplexaugen sind das prominenteste visuelle System von *Drosophila*. Sie bestehen aus ca. 750 Einzelaugen, den sogenannten Ommatidien [43], [92], [154]. Jedes Ommatidium besteht aus 20 Zellen, darunter acht Photorezeptorzellen (R1-R8) sowie primäre und sekundäre Pigmentzellen, welche die Ommatidien optisch gegeneinander abschirmen. Apikal befindet sich der dioptrische Apparat bestehend aus Cornea und Kristallkegel. Proximal wird das Ommatidium von der Basallamina abgegrenzt, an die sich die optischen Ganglien Lamina, Medulla und Lobula anschließen. Die acht Photorezeptorzellen eines Ommatidiums sind kreisförmig um den intraommatidialen Raum angeordnet und bilden zur Mitte des Ommatidiums hin je einen Mikrovillisaum aus, das sogenannte Rhabdomer. *Drosophila* besitzt ein „offenes Rhabdom“, d.h. dass die einzelnen Rhabdomere durch eine extrazelluläre Matrix voneinander getrennt und somit nicht verschmolzen sind [134]. Die acht Rhabdomere eines Ommatidiums sind in charakteristischer Weise angeordnet: die Rhabdomere der Photorezeptorzellen R1-R6 bilden ein he-

xagonales Muster in dessen Zentrum sich die übereinander liegenden Rhabdomere der Photorezeptorzellen R7 und R8 befinden. Die peripheren Rhabdomere der Photorezeptorzellen R1-R6 erstrecken sich über die gesamte Länge des Ommatidiums (Komplexauge dargestellt in Abb. 2-1).

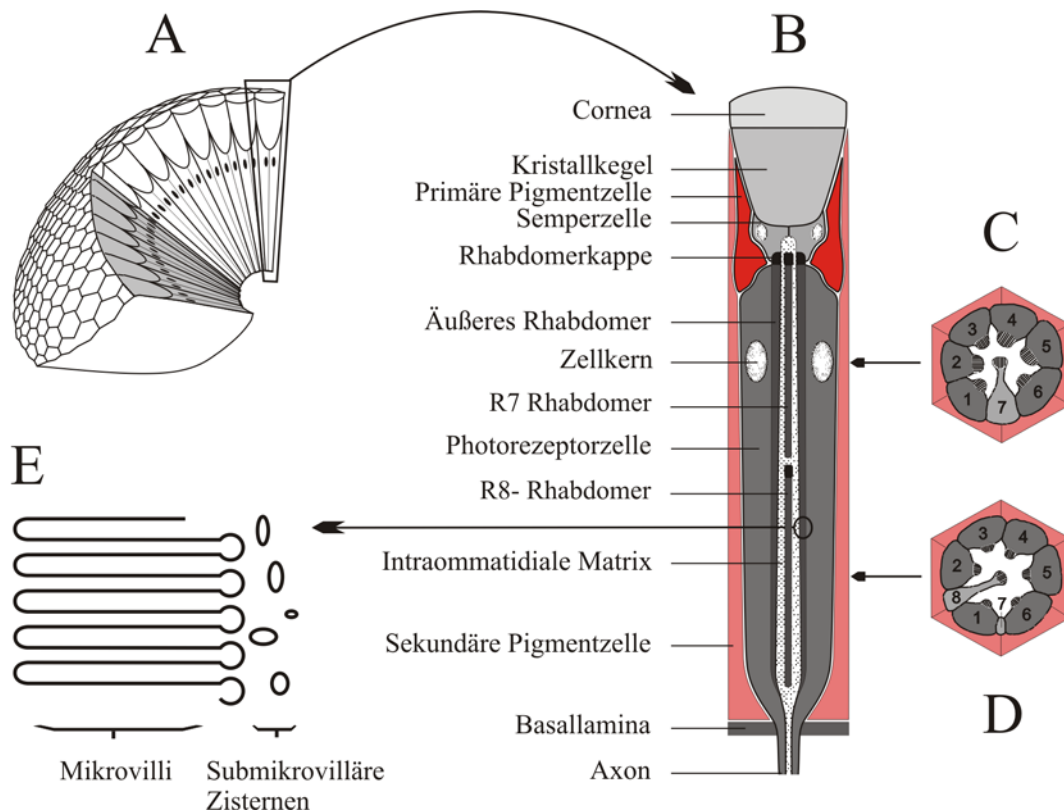


Abb. 2-1 **Aufbau des Komplexauges von *Drosophila*.** A: Übersicht über den Aufbau eines Komplexauges mit den einzelnen Ommatidien. B: Längsschnitt durch ein einzelnes Ommatidium mit seinen Bestandteilen. C und D: Querschnitte durch das Ommatidium an den durch Pfeile markierten Bereichen. E: mikrovilläre Membran der Rhabdomere.

Die Axone der Photorezeptorzellen R1-R6 projizieren von der Retinula zunächst in das erste optische Ganglion (Lamina), wo sie verschaltet werden. Von dort aus ziehen Axone weiter in das zweite optische Ganglion (Medulla). Die Axone von R7 und R8 ziehen ohne vorherige Verschaltung direkt in die Medulla. Die spezielle Anordnung der Sehzellen und die komplexe Art der neuronalen Verschaltung, durch die Signale gleich ausgerichteter Photorezeptorzellen aus benachbarten Ommatidien summiert werden, sind typisch für ein neuronales Superpositionsaug [66].

In der rhabdomerischen Membran sind der Lichtrezeptor Rhodopsin sowie die lichtabhängigen Ionenkanäle TRP („*transient receptor potential*“) [98] und TRPL („*TRP-like*“) [115] lokalisiert. Die Ionenkanäle TRP und TRPL in der rhabdomerischen Membran der Photorezeptorzellen sind verantwortlich für die Generierung der Rezeptorpotentiale. Sie gehören zur Familie der TRP-Kanäle, welche Kationenkanäle, die in den unterschiedlichsten Prozessen eine Rolle spielen (siehe Kapitel 2.3), beinhaltet [94]. Für den Ionenkanal TRPL ist beschrieben, dass er innerhalb der Photorezeptorzelle einer lichtabhängigen Translokation unterliegt [4]. TRPL wandert zwischen der rhabdomerischen Membran und einem intrazellulären Kompartiment hin und her. Diese lichtabhängige Translokation dient wahrscheinlich der Anpassung an unterschiedliche Lichtbedingungen [4].

2.2 Signaltransduktion in den Photorezeptoren von *Drosophila*

Die Phototransduktionskaskade im Komplexauge von *Drosophila* ist ein klassisches Beispiel für einen G-Protein gekoppelten Signalweg mit einer Phospholipase C β (PLC β [14]) als zentralem Effektorenzym (Abb. 2-2) [45], [89], [137]. Das multivalente PDZ-Domänen Protein INAD („*inactivation no afterpotential D*“) stellt das Gerüstprotein für die Ausbildung eines Signalkomplexes dar. In diesem Signalkomplex sind wichtige Komponenten der Phototransduktion zu einem Multiproteinkomplex assoziiert [60], wie z.B. die Phospholipase C β , der Ionenkanal TRP und die augenspezifische Proteinkinase C. Dieser Multiproteinkomplex führt zu hoher Selektivität und Geschwindigkeit der Signalübertragung [60], [65], [80], [141]. Einfallende Lichtquanten werden von Rhodopsinmolekülen absorbiert, welche die rhabdomerische Membran mit sieben Helices durchziehen [104], [116], [159]. Die Lichtabsorption führt zur Isomerisierung des an das Apoprotein Opsin gebundenen Chromophors 11-*cis*-3-Hydroxyretinal

in *all-trans*-Hydroxyretinal. Das inaktive Rhodopsin ändert dadurch seine Konformation und geht in das aktivierte Metarhodopsin über. Dadurch wird das visuelle heterotrimere Gq Protein aktiviert, welches nach Austausch von gebundenem GDP durch GTP in die α - und die $\beta\gamma$ - Untereinheiten zerfällt. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β (PLC β) [14], die daraufhin die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den sekundären Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert [54], [93], [108], [158].

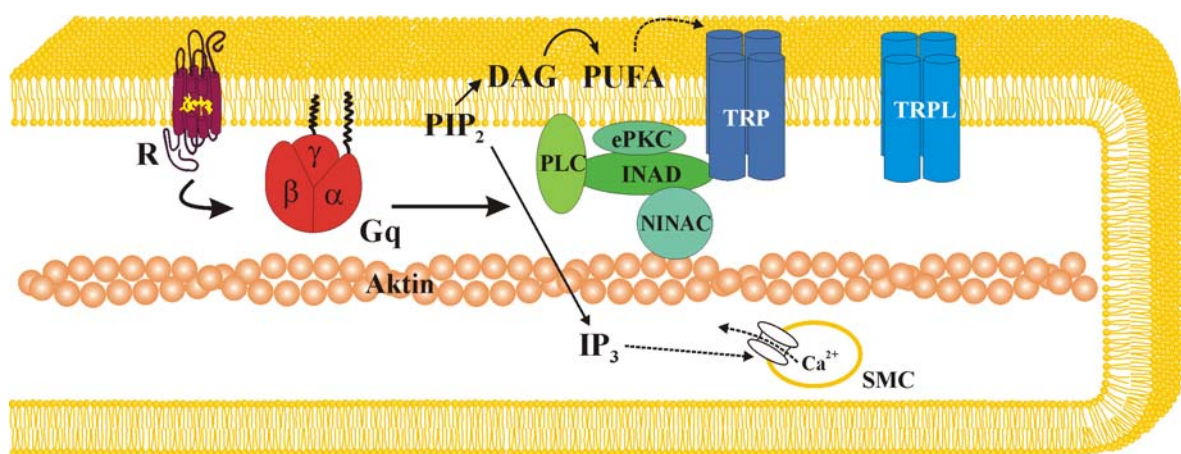


Abb. 2-2 Schema der visuellen Signaltransduktion im Komplexauge von *Drosophila*.

Dargestellt sind zentrale Komponenten der Signalkaskade in einem Mikrovillus der rhabdomerischen Membran. R: Rhodopsin, Gq: visuelles G-Protein, PLC: Phospholipase C β , ePKC: augenspezifische Proteinkinase C, INAD: Gerüstprotein, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäuren, TRP: TRP-Kanal, TRPL: TRPL-Kanal, SMC: submikrovilläre Zisternen. Erläuterungen siehe Text.

Die Kaskade führt letztlich zur Öffnung der Kationenkanäle TRP [98] und TRPL [115], und in der Folge zu einem Einstrom von Kationen in die Photorezeptorzelle und damit zu einem depolarisierenden Rezeptorpotential. In den Photorezeptoren von *Drosophila* ist der Einstrom von Ca²⁺ in die Zellen entscheidend sowohl für die Aktivierung als auch für die nachfolgende Abschwächung der Signalkaskade. Dem Ca²⁺-Einstrom entgegen wirkt eine Ausschleusung von

Ca^{2+} aus der Zelle. Die rasche Ausschleusung des Ca^{2+} während und nach der Stimulation erfolgt üblicherweise über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Bei *Drosophila* ist erst kürzlich der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher CalX beschrieben worden, welcher diese Funktion in den Photorezeptorzellen übernimmt [151].

Die Schritte nach der Aktivierung der PLC β bis hin zur Öffnung der lichtabhängigen Ionenkanäle sind bisher nur unzureichend geklärt. Ein Modell schlägt einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom als Mechanismus vor. Demnach hat die IP_3 -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (submikrovillären Zisternen) die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran der Photorezeptorzelle zur Folge. Der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum wäre in diesem Modell zur Wiederauffüllung der internen Ca^{2+} -Speicher notwendig [52], [53], [90]. Gegen die Hypothese des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms spricht allerdings der Befund, dass der IP_3 -Rezeptor für eine normale Phototransduktion entbehrlich ist [1], [120]. Der IP_3 -Rezeptor ist ein Membranprotein in intrazellulären Membranen, das für die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Ca^{2+} -Speichern gebraucht wird. Diese Ca^{2+} -Freisetzung wird durch Bindung des Agonisten IP_3 an den IP_3 -Rezeptor ausgelöst. In Mutanten, denen dieser IP_3 -Rezeptor fehlt, ist die Signalkaskade nicht wesentlich beeinflusst. Desweiteren kann durch eine Freisetzung von „caged IP_3 “ in dunkeladaptierten Photorezeptorzellen keine Lichtantwort stimuliert werden [51] und eine lichtabhängige Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern konnte bislang ebenfalls nicht eindeutig nachgewiesen werden [44], [114], [122]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die lichtabhängigen Ionenkanäle TRP und TRPL auf diesem Weg geöffnet werden. Daher gilt die vermehrte Aufmerksamkeit im Moment denjenigen Auswirkungen der PLC-Aktivität, welche sich in der Membran abspielen, nämlich der Reduktion der PIP_2 -Level und der Generierung von DAG. Es konnte gezeigt werden, dass die Ionenkanäle TRP und TRPL sowohl *in vivo* als auch nach rekombinanter Expression in *Drosophila* S2 Zellen durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachnidon-, Linol- und Linolensäure, die aus dem sekundären Botenstoff Diacylglycerol durch die DAG-Lipase generierbar sind, aktiviert werden können [24], [47]. Es gibt auch Evidenzen dafür, dass DAG selbst im rekombinanten System TRPL-Kanäle aktivieren kann [34]. Diese Hypothese der direkten Aktivierung der lichtabhängigen Ionenkanäle durch Produkte des DAG-Stoffwechsels wird dadurch gestützt, dass in *Drosophila rdgA* („retinal degeneration A“)-Mutanten die TRP-Kanäle konstitutiv aktiv sind und dass der unkontrollierte Ca^{2+} -Einstrom zur Degeneration der Photorezeptorzellen führt. Der *rdgA*-Mutante fehlt die Diacylglycerolkinase, die DAG zu Phosphatidsäure phosphoryliert und damit den ersten Schritt

zur Regeneration von PIP_2 aus DAG katalysiert. Unterbleibt dieser Schritt, so könnten DAG oder dessen Spaltprodukte für die in der *rdgA*-Mutante beobachtete dauerhafte Aktivierung der TRP-Kanäle und die damit verbundene Degeneration verantwortlich sein [121]. Diese Hypothese der direkten Aktivierung der lichtabhängigen Ionenkanäle durch Produkte des DAG-Stoffwechsels ist zur Zeit die favorisierte Hypothese.

2.3 Die Ionenkanäle der TRP-Familie

Die TRP-Familie besteht aus einer Gruppe unterschiedlicher Kationenkanäle mit strukturellen Ähnlichkeiten zum TRP-Kanal von *Drosophila* [98]. Nach diesem TRP-Kanal ist die Proteinfamilie benannt. TRP-Kanäle sind vorwiegend im peripheren und zentralen Nervensystem vorhanden und spielen eine Rolle in sensorischen Systemen [95], [96], [100], z.B. beim Sehen der Invertebraten, bei der Mechanorezeption, dem Geschmackssinn, der Temperaturrezeption oder der Detektion von Pheromonen. Aber auch in nicht-neuronalen Zellen sind sie zu finden, wo sie für die Vasorelaxation oder die Zellzyklus-Kontrolle wichtig sind. Die TRP-Familie unterscheidet sich von anderen Gruppen von Ionenkanälen darin, dass sie eine gewaltige Vielfalt an Ionenselektivitäten, Aktivierungsmechanismen und physiologischen Funktionen besitzen. Dennoch haben TRP-Kanäle strukturelle Gemeinsamkeiten, sie besitzen z.B. sechs putative Transmembrandomänen [94], [105]. Die Kanalpore befindet sich in einem stark konservierten Bereich zwischen den Transmembrandomänen vier und fünf. Die meisten TRP-Kanäle besitzen C-terminal mehrere Ankyrin Wiederholungen und einige tragen eine sogenannte „TRP-Domäne“ [94]. Ankyrin Wiederholungen sind Sequenzmotive bestehend aus 33 Aminosäuren, die spezifisch Protein-Protein Interaktionen vermitteln [133]. Ankyrin bietet zudem einen Mechanismus um Membranproteine mit dem Zytoskelett zu verbinden und spielt eine Rolle bei der Interaktion der Untereinheiten von Proteinen mit zwei oder mehr Untereinheiten [87]. Die Bedeutung der TRP-Kanäle wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in TRP-Kanälen mit einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Mucopolidose Typ 4 [143], Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie [68] und pulmonaler Hypertonie [74] einhergehen. Die räumliche Struktur der TRP-Kanäle ist noch nicht geklärt. Es gibt Evidenzen dafür, dass die Kanäle Tetramere ausbilden [4], [58], [64], was der Struktur der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle entspricht.

Im Gegensatz zu anderen Familien von Kationenkanälen werden die TRP-Kanäle aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und komplexen Regulation nach der Homologie ihrer Aminosäuresequenz und nicht nach Selektivität oder Funktion ihres Liganden eingeteilt. Die TRP-Familie wird in sieben Unterfamilien unterteilt: TRPC („canonical“), TRPV („Vanilloid“), TRPM („Melastatin“), TRPN („NOMPC“), TRPA („Ankyrin“), TRPP („Polycystein“) und TRPML („Mucolipin“) [94], [111]. Die anfangs identifizierten Mitglieder der TRP-Familie werden als die „klassischen“ oder „kanonischen“ TRPs bezeichnet und fallen in die TRPC Unterfamilie. Zu dieser Gruppe gehören auch *Drosophila* TRP und TRPL. Manche der TRPCs scheinen über kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom aktiviert zu werden, andere wiederum durch Diacylglycerol oder dessen Spaltprodukte.

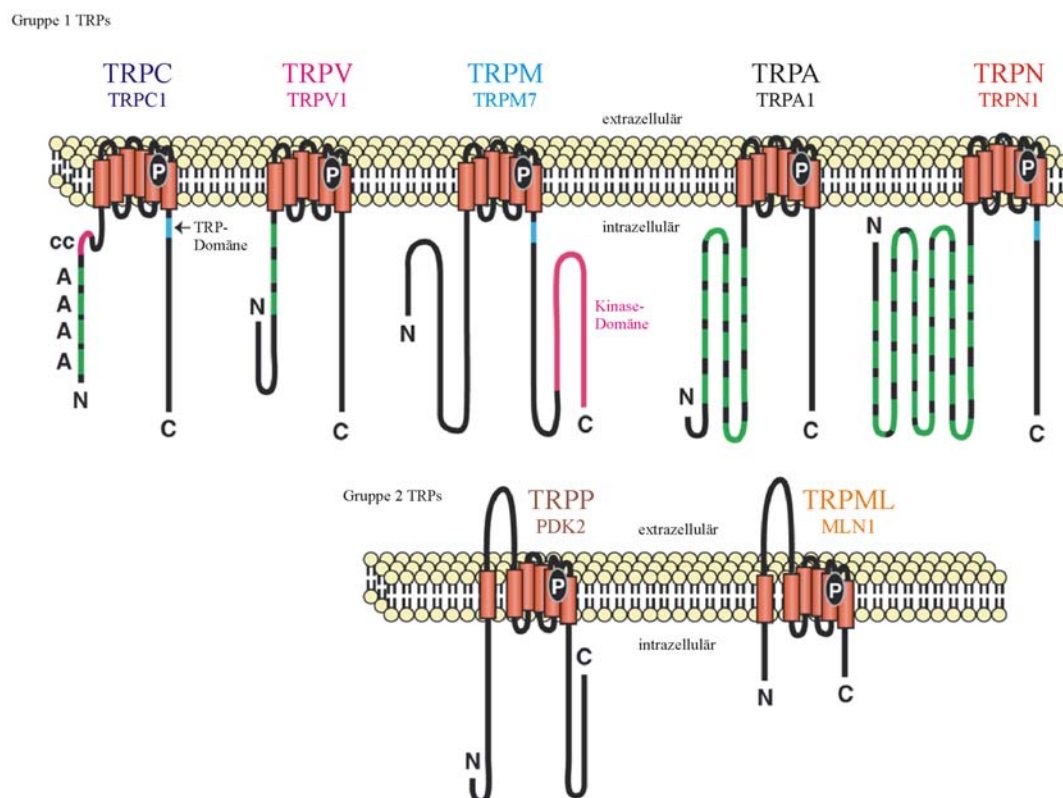


Abb. 2-3 Die sieben TRP Unterfamilien. Dargestellt sind Vertreter der fünf Gruppe 1 und zwei Gruppe 2 Unterfamilien. Mehrere Domänen sind gezeigt: A: Ankyrin Wiederholungen, cc: Coiled coil-Domäne. Verändert nach [94].

Die Namen der verbleibenden Unterfamilien basieren auf der ursprünglichen Bezeichnung der zuerst entdeckten Mitglieder jeder Unterfamilie [99]. Die Gruppe 1 TRPs (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA) besitzen eine beträchtliche Sequenzhomologie in den Transmembrandomänen. Die TRPC-, TRPM- und TRPN- (außer NOMPC) Proteine beinhalten eine 23-25 Aminosäuren lange „TRP-Domäne“ C-terminal zur sechsten Transmembrandomäne. Die beiden Gruppe 2 Unterfamilien TRPP und TRPML sind infolge niedriger Sequenzhomologie und einer großen extrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne nur entfernt verwandt mit den Gruppe 1 TRPs. Die Unterfamilien TRPP und TRPML werden aufgrund von Sequenzhomologien und vorhergesagten Topologien gemeinsam in der Gruppe 2 zusammengefasst. Sechs der Unterfamilien beinhalten Mitglieder, welche in so unterschiedlichen Organismen wie Würmern, Fliegen und Menschen konserviert sind. Im Genom von Würmern sind bis jetzt 17 TRP-Kanäle bekannt, in *Drosophila* kennt man 13 und im Menschen 28 Vertreter dieser Proteinfamilie [95].

2.3.1 Der Ionenkanal TRPL

TRPL besitzt die für TRP-Kanäle typischen Strukturmerkmale einschließlich drei Ankyrin Wiederholungen und zwei Calmodulin Bindestellen (Abb. 2-4). Bei den Ankyrin Wiederholungen handelt es sich um etwa 33 Aminosäuren lange Sequenzabschnitte, die bei Ankyrinen beschrieben wurden und dort für die Bindung an Membranproteine verantwortlich sind [9]. Sie dienen wahrscheinlich der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen [101]. Calmodulin ist ein ubiquitäres Ca^{2+} -bindendes Protein, welches die Aktivität von vielen Zielproteinen reguliert wenn es Ca^{2+} gebunden hat. Die Calmodulin Bindestellen dienen der Ca^{2+} -vermittelten Abschaltung des Kanals. Fehlt eine der Calmodulin Bindestellen, so schlägt sich dies in einer verlängerten Reizantwort nieder [131], [132].

In *Drosophila* Photorezeptoren repräsentiert TRP einen Ca^{2+} -selektiven Kanal, wohingegen *trpl* für einen unselektiven Kationenkanal mit moderater Ca^{2+} -Permeabilität kodiert [103], [123]. Die Lichtantwort fehlt gänzlich in *trp;trpl* Doppelmutanten, in welchen keiner der beiden Kanäle exprimiert wird [103], [123]. TRPL wie auch TRP sind über die gesamte Länge der Rhabdomere verteilt und befinden sich nicht nur an deren Basis, wo die internen Ca^{2+} -Speicher lokalisiert sind [25].

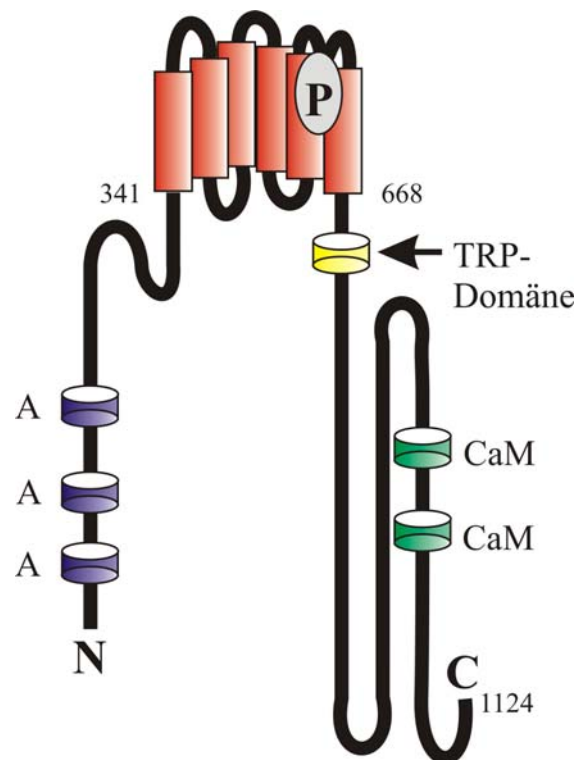


Abb. 2-4 Schema des TRPL Ionenkanals. Erläuterungen siehe Text. A: Ankyrin Wiederholung, CaM: Calmodulin Bindestelle.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *trp* und *trpl* nicht nur im visuellen System sondern auch in den Epithelzellen der Malpighi Gefäße von *Drosophila* exprimiert werden [83]. Das Malpighi Gefäß von *Drosophila* dient als genetisches Modell für Flüssigkeits-sekretierende Epithelien, in welchem zellspezifische Signalübertragungsereignisse der physiologischen Funktion zugeordnet werden können [32]. Im Gegensatz zum visuellen System wird funktionelles TRPL dort für Ca^{2+} -abhängige Signalübertragung und epithelialen Flüssigkeitstransport gebraucht.

Für TRPL ist im Gegensatz zu TRP eine lichtabhängige Translokation beschrieben [7]. Bei dunkeladaptierten Fliegen befindet sich TRPL in den Rhabdomeren, wohingegen es bei lichtadaptierten Fliegen in einem Speicherkompartiment im Zellkörper lokalisiert ist. Um welches Kompartiment es sich dabei handelt, ist bis jetzt noch nicht bekannt. In den Rhabdomeren von dunkel gehaltenen Fliegen befindet sich 20 mal mehr TRPL als in den Rhabdomeren von lichtadaptierten Fliegen. Die physiologische Konsequenz dieser lichtabhängigen Wanderung liegt wahrscheinlich in einer langfristigen Adaptation des Fliegenauges an gedämpftes Licht.

Dunkel gehaltene Fliegen zeigen eine signifikant erhöhte Sensitivität für gedämpftes Licht im Vergleich zu im Licht gehaltenen Fliegen [7]. Darüberhinaus antworten dunkeladaptierte Fliegen auf einen relativ breiten Bereich an Lichtintensitäten, wenn sie in völliger Dunkelheit oder bei schwachem Hintergrundlicht einen Lichtstimulus erhalten. Die Empfindlichkeit für kleine Änderungen in der Intensität des Lichtstimulus ist nicht sehr ausgeprägt [7]. Lichtadaptierte Fliegen besitzen einen kleineren dynamischen Bereich an Lichtintensitäten, auf die sie antworten, aber ihre Photorezeptoren reagieren empfindlicher für geringe Änderungen der Lichtintensität innerhalb dieses dynamischen Bereichs. Der Phänotyp der im Licht gehaltenen Fliegen entspricht im Wesentlichen dem moderaten Phänotyp der *trpl*³⁰²-Nullmutante [78]. Lichtabhängige Wanderung von Signalproteinen ist in *Drosophila* gut dokumentiert und beinhaltet außer TRPL noch die Wanderung der G α -Untereinheit des visuellen G-Proteins [69], des visuellen Arrestin2 [76], [77], sowie des einzigen ERM-Proteins in *Drosophila*, Dmoesin [23]. Ebenso wie TRPL wandern Gq α und Dmoesin lichtabhängig aus dem Rhabdomer heraus, wohingegen die Wanderung von Arrestin2 in der entgegengesetzten Richtung stattfindet [69]. Bei Vertebraten ist für einige TRP-Kanäle ebenfalls eine Wanderung beschrieben. So wandert beispielsweise der TRPC5 Kanal, der in Neuronen des Gehirns exprimiert wird, nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zur Plasmamembran [12].

2.4 Problemstellung

Signalwege können durch die Wanderung der Signalproteine zwischen verschiedenen Kompartimenten moduliert werden. Eine solche Wanderung ist unter anderem für den TRPL-Kanal in den Photorezeptoren von *Drosophila* beschrieben [6], [7]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus, welcher der lichtabhängigen Translokation des Ionenkanals TRPL unterliegt, näher untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten *Drosophila*-Mutanten identifiziert werden, bei denen die Translokation des TRPL gestört ist. Damit lässt sich eine Aussage treffen, welche Proteine an der Translokation des TRPL, direkt oder indirekt, beteiligt sind. Die Identifikation der betreffenden Mutanten sollte durch zwei unterschiedliche Herangehensweisen erreicht werden: i) Durch fundierte Vermutungen („*educated guess*“) wurden diverse bereits existierende *Drosophila*-Mutanten auf Defekte in der Translokation des TRPL hin untersucht. Dabei handelte es sich im Wesentlichen um Mutanten, welche die Phototransduktion sowie ver-

schiedene Transportprozesse betreffen. ii) Mittels eines Mutagenese-Screens sollten neue Mutanten hergestellt und identifiziert werden, welche ebenfalls Defekte in der Translokation des TRPL aufweisen. Zu diesem Zweck wurde zuerst der Flp/FRT Screen etabliert und entsprechend angepasst. Dies schloss unter anderem die Generierung der Ausgangsfliegen mit ein.

Die Translokation des TRPL wurde mit Hilfe von transgenen Fliegen untersucht, welche ein TRPL-eGFP Fusionsprotein exprimieren. Die eGFP-Fluoreszenz erlaubt die Visualisierung der Lokalisation des TRPL-eGFP *in vivo* durch nichtinvasive Mikroskopiertechnik. Um quantitative Aussagen über die TRPL-eGFP Translokation machen zu können, wurde eine Methode zur Quantifizierung der eGFP-Fluoreszenz erarbeitet. Die Quantifizierung erlaubt einen Vergleich der TRPL-eGFP Wanderung von unterschiedlichen Lichtqualitäten sowie verschiedener Mutanten.

3 *Material und Methoden*

3.1 **Material**

3.1.1 **Chemikalien und sonstige Materialien**

Die verwendeten Chemikalien waren von höchster erhaltlicher Reinheit („pro analysi“) und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Serva, Sigma oder Fluka bezogen. Weitere Chemikalien und sonstige Labormaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Blocking Reagenz anti-Digoxigenin/alkalische Phosphatase CDP-Star	Fa. Roche Diagnostics
Tissue Tek Einbettmedium	Fa. Sakura Finetek
Adjuvantien ABM-ZK, ABM-N	Fa. Linaris
Antibiotika: Ampicillin, Kanamycin	Fa. Sigma-Aldrich
Ni-NTA, QiaExpressionist System	Fa. Qiagen
Hybond N ⁺ -Membran Hi Trap-Säulen	Fa. GE Healthcare

PVDF-Membran	Fa. BioRad
Molekulargewichtsstandard: Precision Plus Protein Standards 10-250kDa	
Röntgenfilme X-OMAT XAR-5	Fa. Kodak
ECL Western Blotting Analysis System: Hyperfilm ECL	Fa. GE Healthcare
Peroxidase labelled anti-mouse antibody	
Peroxidase labelled anti-rabbit antibody	

3.1.1.1 Bakterien und Konstrukte

<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Fa. Qiagen
DmTRP3.1	[6]

3.1.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1x SDS-PAGE Probenpuffer	4% (w/v) SDS 65mM Tris/HCl, pH 6,8
3x SDS-PAGE Auftragepuffer	4% (w/v) SDS 65mM Tris/HCl, pH 6,8 12% (w/v) Glycerin 0,01% (w/v) Bromphenolblau 1% (v/v) β -Mercaptoethanol
4x SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
4x SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS

1x SDS-PAGE Elektrodenpuffer	25mM Tris 192mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH 8,3 (pH-Einstellung mit Tris/Glycin)
Blotpuffer	50mM Tris 0,1% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
1x PBS	17,5mM NaCl 8,41mM Na ₂ HPO ₄ 1,86mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,2
0,1M Phosphatpuffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ 0,1M NaH ₂ PO ₄ pH 7,2
TBS-T Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween	50mM Tris/HCl, pH 7,3 50mM NaCl 0,1% (w/v) Tween 20
MOPS-Puffer	20mM 3-(N-morpholino-)propansulfonsäure 8mM Na-Acetat 1mM EDTA
20x SSC	3M NaCl 300mM Na-Citrat pH 7,5
RNA-Hybridisierungslösung	40% (v/v) deionisiertes Formamid 3,5% (w/v) Blocking Reagenz 5x SSC 0,02% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Na-Laurylsarcosinat

1x Maleinsäurepuffer
 150mM NaCl
 100mM Maleinsäure
 pH 7,5

3.1.2 Antikörper

Die folgende Zusammenstellung enthält alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit für Western Blots (WB) und immunocytochemische Markierungen (IC) eingesetzt wurden.

Tabelle 3-1: Primäre Antikörper

Antikörper	erzeugt in:	Verdünnung	Referenz
α -DmTRP	Kaninchen	1:1000 (WB)	[6], diese Arbeit
α -DmTRPL	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:100 (IC)	[6]
α -GFP	Maus	1:1000 (WB) 1:100 (IC)	Fa. Roche

3.1.3 Versuchstiere

3.1.3.1 *Drosophila melanogaster*

In Tabelle 3-2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *Drosophila*-Stämme aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben wurden jeweils weißäugige Fliegen verwendet. Die Deletionsstämme, die für die Lokalisation einer Mutation durch Deletionskartierung verwendet wurden, sind in Tabelle 3-7 separat aufgeführt.

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der verwendeten *Drosophila*-Stämme.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
WT	(w) OregonR	
<i>trpl</i> ³⁰²	<i>yw; trpl</i> ³⁰²	[103]
<i>trpl</i> ³⁰² ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>yw; trpl</i> ³⁰² ; <i>trpl-eGFP</i>	[86]
<i>trpl-eGFP</i>	<i>yw; trpl-eGFP</i> oder <i>yw; ; trpl-eGFP</i>	[86]
<i>trp</i> ⁹	<i>yw; ; trp</i> ⁹	[106]
<i>trpl-eGFP; trp</i> ⁹	<i>yw; trpl-eGFP; trp</i> ⁹	diese Arbeit
<i>trpl</i> ³⁰² ; <i>trp</i> ⁹	<i>w; trpl</i> ³⁰² <i>cn bw; trp</i> ⁹	[155]
<i>trpl-eGFP; trpl302; trp</i> ⁹	<i>yw trpl-eGFP; trpl</i> ³⁰² <i>cn bw; trp</i> ⁹	diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>ninaE</i> ¹⁷	<i>yw; ninaE</i> ¹⁷	[104]
<i>ninaE</i> ¹⁷ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>yw; ninaE</i> ¹⁷ ; <i>trpl-eGFP</i>	[86]
<i>ninaE</i> ¹⁷ / <i>P</i> [<i>Rh1+3</i>]	<i>yw; ninaE</i> ¹⁷ / <i>P</i> [<i>Rh1+3</i>]	[35]
<i>ninaE</i> ¹⁷ / <i>P</i> [<i>Rh1+3</i>]; <i>trpl-eGFP</i>	<i>yw; ninaE</i> ¹⁷ / <i>P</i> [<i>Rh1+3</i>]; <i>trpl-eGFP</i>	diese Arbeit
<i>ninaB</i> ¹	<i>w; ; ninaB</i> ¹	[150]
<i>trpl-eGFP; ninaB</i> ¹	<i>w; trpl-eGFP; ninaB</i> ¹	[86]
<i>arr1</i> ¹	<i>arr1</i> ¹ <i>cn bw</i>	[33]
<i>arr1</i> ¹ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>arr1</i> ¹ <i>cn bw; trpl-eGFP</i>	[86]
<i>arr2</i> ³	<i>w; ; arr2</i> ³ <i>st</i>	[33]
<i>trpl-eGFP; arr2</i> ³	<i>w; trpl-eGFP; arr2</i> ³ <i>st</i>	diese Arbeit
<i>arr1</i> ¹ ; <i>arr2</i> ³	<i>w; arr1</i> ¹ <i>cn bw; arr2</i> ³	[33]
<i>trpl-eGFP; arr1</i> ¹ ; <i>arr2</i> ³	<i>yw, trpl-eGFP; arr1</i> ¹ <i>cn bw; arr2</i> ³	diese Arbeit
<i>Gαq</i> ¹	<i>w; Gαq</i> ¹	[130]
<i>Gαq</i> ¹ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>w; Gαq</i> ¹ ; <i>trpl-eGFP</i>	diese Arbeit
<i>Df(2R)vg135</i>	<i>Df(2R)vg135, nompA</i> ^{vg135} / <i>CyO, S* bw</i> ¹	[75]
<i>Gαq</i> ¹ / <i>Df(2R)vg135; trpl-eGFP</i>	<i>w; Gαq</i> ¹ / <i>Df(2R)vg135; trpl-eGFP</i>	diese Arbeit
<i>norpA</i> ³⁶	<i>w norpA</i> ³⁶	[14]
<i>norpA</i> ³⁶ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>w norpA</i> ³⁶ ; <i>trpl-eGFP/+</i>	[86]
<i>norpA</i> ⁴⁷	<i>norpA</i> ⁴⁷ ; <i>bw; st</i>	[110]
<i>norpA</i> ⁴⁷ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>norpA</i> ⁴⁷ ; <i>bw/trpl-eGFP; st/+</i>	diese Arbeit
<i>inaD</i> ¹	<i>yw; inaD</i> ¹ <i>cn bw</i>	[147]
<i>inaD</i> ¹ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>yw; inaD</i> ¹ <i>cn bw; trpl-eGFP</i>	[86]
<i>inaF</i> ^{P106x}	<i>w inaF</i> ^{P106x}	[79]
<i>inaF</i> ^{P106x} ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>w inaF</i> ^{P106x} ; <i>trpl-eGFP/+</i>	diese Arbeit
<i>trp</i> ^{P365}	<i>w; ; trp</i> ^{P365}	[106]
<i>trpl-eGFP; trp</i> ^{P365} / <i>+</i>	<i>w; trpl-eGFP/+; trp</i> ^{P365} / <i>+</i>	diese Arbeit
<i>shi</i> ^{ts1}	<i>w shi</i> ^{ts1}	[41]
<i>shi</i> ^{ts1} ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>w shi</i> ^{ts1} ; <i>trpl-eGFP/+</i>	[86]
<i>ninaC</i> ⁵	<i>w; ninaC</i> ⁵	[106]
<i>ninaC</i> ⁵ ; <i>trpl-eGFP</i>	<i>w; ninaC</i> ⁵ ; <i>trpl-eGFP</i>	diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
182	<i>yw; P[ry⁺, hs-neo, FRT]40A, ry⁻</i>	E. Hafen
209	<i>yw eyFlp2 glasslacZ; 2L3.1, P[w⁺]30C FRT40A/Cyo</i>	E. Hafen
218	<i>yw, eyFlp2; 475w⁺/CyO</i>	E. Hafen
RW29	<i>yw, trpl-eGFP</i>	[86]
Y41	<i>yw; Sp/CyO; MKRS/TM2y</i>	[86]
Binsinscy	<i>yw, bar/Deletion[w⁺]</i>	[16]
Gf ¹ 209 (2L)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ P[Rh1-trpl-eGFP y⁺]; 2L3.1 P[w⁺]30C FRT40A/CyO</i>	diese Arbeit
5615 (2L)	<i>yw eyFlp2 GMR-lacZ; P[neoFRT]40A</i>	Bloomington Stock Center
Gb ¹ 215 (3R)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ P[Rh1-trpl-eGFP y⁺]; ; FRT82B 3R3.7 P[w⁺]90E/MKRS</i>	diese Arbeit
214 (3R)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ; ; FRT82B</i>	E. Hafen

3.1.3.2 Kaninchen

Kaninchen beider Geschlechter (Gewicht 1,5-2kg) des Stammes „New Zealand White“ wurden von der Fa. Charles River bezogen und für die Immunisierung verwendet.

3.1.4 Soft- und Hardware, spezielle Geräte

BioCapt Geldokumentationssystem	BioCapt-Software Version 99.02s, Fa. LTF Labortechnik
Gefriermikrotom	HM 500 OM, Fa. Microm
konfokales Laserscanning Mikroskop	Leica TCS SP (Leica DMIRBE), Fa. Leica Microsystems
LSM-Software	Leica Confocal Software, Fa. Leica Microsystems
Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop	Leica DM LFS, Fa. Leica Microsystems

Digitale Kamera	Leica DC200, Fa. Leica Camera AG
Software für Kamera	Leica DC Twain, Fa. Leica Microsystems
Luxmeter	LX-107, Fa. Lutron
öffentliche Internetquellen	NCBI (National Center for Biotechnology Information): PubMed Flybase (National Institute of Health) PDB (Protein Data Bank)
Bildbearbeitung	CorelDRAW 12, CorelPHOTO-PAINT 12 Adobe Photoshop CS ImageJ 1.32j
statistische Analyse	Microcal Origin 6.0G

3.2 Methoden

3.2.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte auf einem Standard-Maismehl Nährmedium (5% (w/v) Maismehl, 3,2% (w/v) Zucker, 1,2% (w/v) Agar, 2,4% Frischhefe, 0,5% (v/v) Propionsäure, 0,0064% (w/v) 4-Hydroxybenzoemethylester, Ascorbinsäure) in speziellen Zuchtgefäßen. Die Tiere wurden bei 24°C in einem 12h hell/12h dunkel Rhythmus gehalten (diurnaler Rhythmus).

3.2.2 Belichtung der Fliegen

Fliegen in einem Alter von zwei bis vier Tagen wurden für die Belichtungen verwendet. Die Fliegen wurden in farbige Plexiglasboxen gesetzt und diese Boxen, wenn nicht anders angegeben, über Nacht unter eine Neonröhre (18W warmweiß; Fa. Lampi) im Abstand von ca. 65cm gestellt. Die Transmissionsspektren der Plexiglasboxen sind in Abb. 3-1 gezeigt.

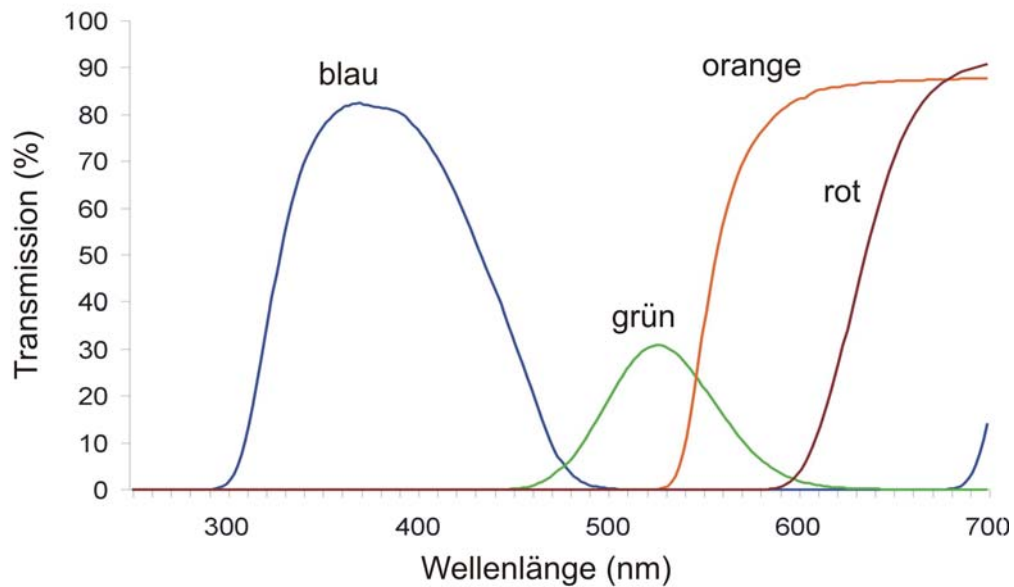


Abb. 3-1 Transmissionsspektren der Plexiglasboxen.

Die Transmissionsspektren der Plexiglasscheiben wurden im Photometer Uvikon 930 (Fa. Kontron Instruments) gemessen. Die Lichtintensitäten in den Plexiglasboxen wurden mit einem Luxmeter (LX-107; Fa. Lutron) gemessen. Desweiteren wurde die Lichtintensität unter der weißen Neonröhre im Abstand von 65cm gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle 3-3 angegeben.

Tabelle 3-3: Lichtintensitäten in den Plexiglasboxen.

Lichtqualität	Lichtintensität
rot	95Lux
orange	450Lux
grün	30Lux
blau	3Lux
weiß	700Lux

Dunkeladaptierte Fliegen wurden, wenn nicht anders angegeben, ebenfalls über Nacht in eine Dunkelbox gesetzt.

3.2.3 Präparation biologischen Materials

3.2.3.1 Präparation von Gesamtextrakten aus *Drosophila* Köpfen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden die Fliegen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben belichtet und unter einem Binokular (Stemi 2000; Fa. Zeiss) im Weißlicht (lichtadaptierte Fliegen) bzw. im Rotlicht (dunkeladaptierte Fliegen) auf Eis präpariert. Zuvor wurden die Fliegen auf Eis betäubt. Die Köpfe wurden vom Körper abgetrennt und, wenn nicht anders angegeben, der Rüssel entfernt. Die Köpfe wurden in 1x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, wobei pro Kopf 2µl Puffer eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Köpfe mit einem Mikro-Pistill homogenisiert und die Proteine 10min bei RT extrahiert. Die Homogenate wurden dann zur Abtrennung der Chitinreste 10min bei 20.817g und 4°C abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10min in der Ultrazentrifuge bei 100.000g und 4°C. Der Überstand wurde abermals abgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurden die Proben mit 1/2 Volumen 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt.

3.2.3.2 Präparation der Fliegen für Immuncytochemie

Die Fliegen wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben belichtet und anschließend präpariert. Vor der Präparation wurden die Fliegen auf Eis betäubt. Die Präparation erfolgte auf Eis unter einem Binokular (Stemi 2000, Fa. Zeiss), dunkeladaptierte Fliegen wurden unter Rotlicht präpariert. Der Kopf wurde vom Körper abgetrennt und mit einer Rasierklinge entlang der Medianebene durchgeschnitten. Diese halben Köpfe wurden dann 1h bei RT in 2% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert. Es folgten zwei Waschschrte in 0,1M Phosphatpuffer für 10min. Anschließend wurden die halbierten Köpfe mit Saccharose infiltriert um Zellbrüchen durch das spätere Einfrieren vorzubeugen. Die Präparate wurden zunächst 3x 15min in 10% Saccharose in 0,1M Phosphatpuffer bei RT inkubiert, gefolgt von 2x 15min Inkubation bei RT in 25% Saccharose in 0,1M Phosphatpuffer. Die Infiltration der Präparate in 50% Saccharose in 0,1M Phosphatpuffer erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate in gekochter Kalbsleber eingebettet, mit Tissue Tek (Fa. Sakura Finetek) bedeckt und in schmelzendem Isopentan bei ca. -160°C schockgefroren. Die Präparate wurden bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Isolierung von RNA aus *Drosophila* Köpfen

Zur Isolierung der RNA wurden die Köpfe von 100 *Drosophila* auf Eis unter dem Binokular (Stemi 2000; Fa. Zeiss) abgetrennt und je 100 Augen in 100µl Trizol-Reagenz (Fa. Gibco BRL) mit einem Mikro-Pistill homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 400µl Trizol erfolgte die Extraktion der RNA durch 10min Inkubation bei RT. Es wurden 100µl Chloroform zugegeben, dann wurde die Probe gevortext und für 5min bei RT inkubiert. Die Probe wurde bei 12.000g und 4°C für 15min zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 250µl Isopropanol ausgefällt. Dazu wurde die Probe gevortext und für 10min bei RT inkubiert. Die ausgefällte RNA wurde bei 12.000g und 4°C für 10min anzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Reaktionsgefäß kopfüber gestellt. Das Pellet wurde mit 500µl 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Die RNA wurde dann kurz angetrocknet und das Pellet durch Inkubation für 10min bei 55-60°C in 50µl *A. bidest*, 0,01% Diethylpyrocarbonat (DEPC) gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.4.2 Herstellung von Digoxigenin-markierter cRNA-Sonde

Zur Herstellung einer antisense cRNA-Sonde gegen TRPL wurde ein cDNA-Klon verwendet, welcher die gesamte kodierende Sequenz von *trpl* enthält (Klon DMTRPL K2). Die Linearisierung des Plasmids erfolgte mit XbaI welches einen 5'-Überhang erzeugt. Die *in vitro* Transkription erfolgte mit T7-Polymerase. Der Transkriptionsansatz enthielt neben 4% (v/v) der Polymerase 1µg gereinigte und linearisierte cDNA, sowie 1x Transkriptionspuffer, 30mM Dithiothreitol, 4% (v/v) RNA-guard und 10% (v/v) eines Digoxigenin-RNA-Markierungsgemisches, welches Digoxigenin-markiertes rUTP enthält. Der Transkriptionsansatz wurde 1,5h bei 37°C inkubiert und anschließend aufgereinigt. Die Sonde konnte auf einem denaturierenden Agarosegel (0,8% (w/v) Agarose, 2% (v/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer) überprüft werden.

3.2.4.3 Northern Blot

Die Auftrennung von RNA erfolgte durch Gelelektrophorese in denaturierenden Agarosegelen (0,8% (w/v) Agarose, 2% (v/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer). Die Elektrophorese wurde mit MOPS-Puffer als Elektrodenpuffer durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine RNA-Leiter der Fa. Gibco BRL. Vor der Elektrophorese wurden 5µl RNA-Lösung (1µg wenn

nicht anders angegeben) mit 1µl Ethidiumbromid (5mg/ml) und 15µl Auftragepuffer (56% (v/v) deionisiertes Formamid, 7% (v/v) Formaldehyd, 0,5% (w/v) Bromphenolblau in MOPS-Puffer) versetzt und 15min bei 65°C inkubiert. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, ließ man das Gel 15-30min bei 50V vorlaufen. Nach dem Auftragen der Proben fand der Gellauf bei 60V für ca. 2h statt. Nach der Elektrophorese wurden das Agarosegel und die Hybond N⁺-Membran (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) mindestens 10min in A. bidest gewässert und anschließend mindestens 20min in 20x SSC äquilibriert. Der Transfer der RNA auf die Hybond N⁺-Membran erfolgte mit Hilfe einer Druckblot-Apparatur (Fa. Stratagene) mit 20x SSC als Blotpuffer gemäß den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde durch UV-Belichtung (312nm, 0,5J/cm³; Fluo-Link; Fa. Hybaid) an den Filter fixiert. Zur Prähybridisierung wurde die Membran 2-3h in RNA-Hybridisierungslösung (40% (v/v) deionisiertes Formamid, 3,5% (w/v) Blocking Reagenz, 5x SSC, 0,02% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Na-Laurylsarcosinat) bei 69°C inkubiert und anschließend in RNA-Hybridisierungslösung mit Digoxigenin-markierter cRNA-Sonde über Nacht bei 69°C hybridisiert. Danach wurde die Membran zunächst zweimal 10min in 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei RT und anschließend zweimal 20min in 0,2x SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 71°C gewaschen. Die Membran wurde dann 5min in 1x Maleinsäurepuffer äquilibriert und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 30min in 1x Blocking Reagenz (Fa. Roche Diagnostics) in 1x Maleinsäurepuffer bei RT blockiert. Der immunologische Nachweis gebundener Sonde erfolgte mit dem Antikörper-Konjugat α -Digoxigenin/alkalische Phosphatase 1:20.000 in 1x Maleinsäurepuffer mit 1x Blocking Reagenz für 1h bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membran in 1x Maleinsäurepuffer mit 0,3% (v/v) Tween erfolgte die Sichtbarmachung des gebundenen Antikörper-Konjugats mit dem Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star (Fa. Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.4.4 *Rekombinante Expression in E. coli M15[pREP4]: Antigenexpression*

Proteincodierende Sequenzen wurden zur Amplifikation und Expression in Vektoren eingebunden. Die Amplifikation dieser Plasmide erfolgte durch Einbringung (Transformation) in *Escherichia coli* und Nutzung der bakteriellen Replikationsmaschinerie. Die Expression der im Expressionsvektor kodierten Sequenzen ist induzierbar basierend auf dem Lac-Operon.

Aus 20ml einer Vorkultur von M15[pREP4] mit Expressionsvektor in LB-Amp (100µg/ml)/Kan (25µg/ml) wurde eine 1l-Kultur angeimpft. Die Kultur wuchs 2h bei 37°C. Von der Kultur wurde 1ml zur Analyse als uninduzierte Kontrolle genommen, bei 20.800g für 1min pelletiert und bei -80°C gelagert. Die Proteine wurden mit 50µl 1x SDS-PAGE Probenpuffer solubiliert. In der verbliebenen Kultur wurde mit 2mM IPTG die Expression der Expressionsvektor-kodierten Sequenzen induziert (Expressionsvektor pQE40; siehe: The QIAexpressionist). Die Proteinexpression erfolgte während des weiteren Wachstums der Kultur bei 37°C für 5h. Der Kultur wurde anschließend ein weiteres Aliquot (1ml) als induzierte Kontrolle zur Analyse entnommen und wie die erste Probe prozessiert. Die Bakterien der restlichen Kultur wurden bei 4.000g für 20min pelletiert. Das Pellet ist bei -80°C lagerbar.

Zur Aufreinigung des Expressionsproduktes wurde das Bakterienpellet pro Gramm in 5ml Puffer B (8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris/HCl pH8) vollständig resuspendiert und durch 50min Rühren bei RT aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 20min bei 10.000g bei 4°C wurden 5µl Proteinüberstand bei -80°C zur Analyse gelagert (Lysat vor Aufreinigung). Der verbliebene Überstand wurde mit 2,5ml Nickel-Agarose (Ni-NTA; Fa. Qiagen) versetzt und 1h bei RT gerührt. Die Suspension wurde 15min bei 4°C und 3.000g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden erneut 5µl bei -80°C zur Analyse gelagert (Lysat nach Aufreinigung). Das Nickel-Agarose-gebundene Expressionsprodukt wurde zweimal mit je 1,5ml Puffer C (8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris/HCl pH6,3) gewaschen. Zentrifugiert wurde jeweils bei 8.000g und 4°C für 10min. Die Elution des gereinigten Expressionsproduktes erfolgte mit viermal je 600µl Puffer D (8M Harnstoff, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris/HCl pH5,0) sowie mit viermal je 600µl Puffer E (8M Harnstoff, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris/HCl pH4,5). Die Nickelagarose wurde dabei jeweils durch Zentrifugation sedimentiert (8.000g, 10min bei 4°C). Von jeder dieser Fraktionen wurden 10µl gereinigtes Protein mittels SDS-PAGE analysiert. Die gereinigte Proteinlösung ist bis zur Dialyse bei -80°C lagerbar.

Zur Immunisierung von Kaninchen (siehe Kapitel 3.2.5.6) eingesetztes Expressionsprodukt (Antigen) wurde vor der Verwendung zur Immunisierung dialysiert. Dazu wurden vorbereitete Dialyseschläuche (siehe unten) mit *A. bidest* gespült, die Proteinlösung luftblasenfrei eingefüllt und die Schläuche mit Dialyseklappen verschlossen. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei RT

unter Rühren in 4l Dialysepuffer (140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ pH 7,2). Das dialysierte Protein (für eine komplette Immunisierung wird 1mg benötigt) wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Vorbereitung der Dialyseschläuche wurde wie folgt vorgenommen:

Schläuche zuschneiden	10-20cm	
Schläuche kochen	10min	großes Volumen: 2% (w/v) NaHCO ₃ 1mM EDTA pH8,0
Schläuche spülen		A. <i>bide</i> st, steril
Schläuche kochen	10min	1mM EDTA pH8,0
Lagerung der Schläuche bei 4°C		bedeckt in EDTA-Lösung
vor Gebrauch Schläuche spülen		A. <i>bide</i> st, steril

3.2.5 Biochemische Methoden

3.2.5.1 Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts in wässrigen Lösungen erfolgte nach Smith *et al.* [138]. Im alkalischen Milieu werden Cu(II)-Ionen durch Peptidbindungen zu Cu(I)-Ionen reduziert. Die Menge an Cu(I)-Ionen ist dabei direkt proportional zur Proteinmenge. Bicinchoninsäure bildet mit Cu(I)-Ionen stabile Komplexverbindungen mit einem Absorptionsmaximum bei 562nm.

Als Nachweisreagenz wurde 1ml Bicinchoninsäurelösung (Fa. Sigma-Aldrich; Na₂CO₃, NaHCO₃, Na-Tartrat und Bicinchoninsäure in 0,2M NaOH) mit 4% (w/v) CuSO₄ (Fa. Sigma-Aldrich) pro 50µl Probenvolumen versetzt. Die Probe wurde dann mit dem Nachweisreagenz 30min bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 562nm gemessen. Anhand einer mitgeführten Eichreihe mit BSA als Standard konnte aus den gemessenen Werten die Proteinkonzentration der untersuchten Proben errechnet werden.

3.2.5.2 SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte in vertikalen Flachgelen mit einer Dicke von 0,75mm. Verwendet wurden homogen konzentrierte Trenn- und Sammelgele in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgelpuffer pH 6,8, Trenngelpuffer pH 8,8, Elektrodenpuffer pH 8,4) [73]. Die exakte Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Acrylamid	8% (w/v)	12% (w/v)	6% (w/v)
Bisacrylamid	0,08% (w/v)	0,12% (w/v)	0,06% (w/v)
Tris/HCl	0,375M pH 8,8	0,375M pH 8,8	0,125M pH 6,8
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)	0,1% (w/v)
TEMED	0,075% (v/v)	0,075% (v/v)	0,15% (v/v)

Die Einstellung der Acrylamid- und Bisacrylamid-Konzentration erfolgte aus kommerziell erhältlicher 40%-Lösung (Fa. Serva; Mischungsverhältnis 37,5:1). Die Länge des Sammelgels betrug 1cm, die Trennung erfolgte über eine Distanz von 5cm. Die Elektrophorese wurde mit einer „2050 Midget“ Elektrophorese-Einheit (Fa. Amersham Pharmacia) bei konstant 20mA pro Gel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente die Proteinleiter „Precision Plus Protein Standards“ (Fa. BioRad). Die verwendeten Puffer sind in Kapitel 3.1.1.2 aufgeführt.

3.2.5.3 Färbung der Proteine auf SDS-Gelen mit Coomassie

Um die aufgetrennten Proteine anzufärben wurden die Gele 15-30min bei RT in Coomassie-Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fa. Serva), 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Das Entfärben der Gele erfolgte in 25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds.

3.2.5.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blotapparatur (Trans Blot SD, Fa. Biorad) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran; Fa. BioRad) transferiert. Vor dem Zusammensetzen der Apparatur gemäß den Angaben des Herstellers wurden das Gel und die mit Methanol benetzte Membran mindestens 2min in Blotpuffer äquilibriert. Der Elektrotransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von $0,5-1\text{mA/cm}^2$ Membranfläche für 1h durchgeführt. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran zur Absättigung unbesetzter Bindungsstellen 1-2h in 5% Skim Milk (w/v; Fa. Fluka) in TBS-T blockiert und anschließend 3x 10min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörpern erfolgte für 15-20h in 5% Skim Milk (w/v) in TBS-T in den in Tabelle 3-1 zusammengestellten Verdünnungen. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für je-

weils 10min wurde die Membran 1-2h mit einem Protein A/alkalische Phosphatase Konjugat (1:1000 in TBS-T; Fa. Sigma) inkubiert und anschließend erneut dreimal 10min in TBS-T gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran 2min in Reaktionspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl pH9,5, 10mM MgCl₂) äquilibriert und die Nachweisreaktion mittels 300µg/ml Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) und 150µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) in Reaktionspuffer bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Waschen in A. *bideest* gestoppt und die Membran anschließend getrocknet. Zur Erhöhung der Sensitivität erfolgte der Nachweis der gebundenen Antikörper alternativ mit dem ECL-System (Fa. GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.5.5 Färbung von PVDF-Membranen mit Amidoschwarz

Um die Proteinmuster auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen wurde diese nach dem Elektrottransfer 5min in 0,1% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure gefärbt und die Hintergrundfärbung anschließend in 25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

3.2.5.6 Immunisierung von Kaninchen

Zur Produktion von polyklonalem Antiserum wurde ein Kaninchen mit rekombinant exprimiertem Antigen immunisiert. Die Immunisierung wurde nach folgendem Schema vorgenommen: das Antigen wurde in einer Konzentration von 0,25mg/ml in sterilem PBS (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, pH7,2) gelöst und für die Immunisierungen mit dem jeweiligen Adjuvans nach den Angaben des Herstellers emulgiert. Die ersten beiden Immunisierungen erfolgten mit komplettem Adjuvans (ABM-ZK) im Abstand von 14 Tagen, die letzten beiden an den Tagen 28 und 56 mit unvollständigem Adjuvans (ABM-N; beide Fa. Linaris). Pro Immunisierung wurde 1ml Antigen/Adjuvans-Emulsion seitlich am Rücken *subkutan* mit einer Kanüle 0,55x0,25mm in ca. drei Portionen injiziert. Die Testblutungen zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs wurden nach 38 bzw. 66 Tagen an der Ohrvene vorgenommen. Mittels Western Blot Analyse kann das Serum getestet werden. Am 80. Tag nach der ersten Immunisierung

wurde das Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet. Im Anschluß an die Betäubung mit Ketamin (Fa. Ceva Sante Animale) erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion. Das Antiserum wurde nach Gerinnung (15min bei 37°C) und Kontraktion des Koagulats (bei 4°C über Nacht) mittels wiederholter Zentrifugation (15min, 3.000g, 4°C) gewonnen.

3.2.5.7 Affinitätsreinigung von Antiseren

Die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern aus Antiserum erfolgte an Hi Trap Säulen (Fa. Amersham Pharmacia). Zwischen 0,5mg und 10mg Antigen wurden gegen Kopplungspuffer (0,2M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH8,3) unter Zusatz von 0,1% (w/v) Natriumlaurylsarcosinat zur Solubilisierung dialysiert. Die Kopplung des Antigens an die Säule wurde ebenso wie die Aufreinigung des Antikörpers entsprechend den Angaben des Herstellers vorgenommen.

3.2.6 Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

3.2.6.1 Anfertigung von Cryoschnitten für die Immuncytochemie

Die Cryoschnitte wurden in einem Gefriermikrotom (HM 500 OM; Fa. Microm) bei einer Objekttemperatur von -25°C und einer Boxtemperatur von -27°C angefertigt. Die Schnitte mit einer Dicke von 10µm wurden auf mit Poly-L-Lysin (Fa. Sigma Diagnostics) beschichtete Deckgläser überführt. Die Qualität der Schnitte wurde im Mikroskop (Standard 25; Fa. Zeiss) überprüft. Die Aufbewahrung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

3.2.6.2 Durchführung der Immunmarkierungen auf Cryoschnitten

Zur Detektion von Proteinen auf den Cryoschnitten mit Antikörpern wurden die Schnitte zunächst in 2% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert und anschließend zweimal 5min in 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membran und Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte 120min in PBS-T (1% (w/v) BSA, 0,3% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS) inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C in PBS-T in einer feuchten Kammer. Die verwendeten Verdünnungen sind der Tabelle 3-1 zu entnehmen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte nach dreimaligem Waschen der Schnitte in 1x PBS durch Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern in Blockierungslösung bei RT im Dunkeln für ca. 4h. Die verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 3-5 zusammengestellt.

Tabelle 3-5: Sekundäre Antikörper, Lektin und Phalloidin-Konjugat, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Antikörper	Fluorochrom	gerichtet gegen:	Verdünnung	Referenz
α -mouse-IgG	FITC	Antikörper aus Maus	1:100	Fa. Sigma
α -rabbit-IgG	Cy5	Antikörper aus Kaninchen	1:100	Fa. Dianova
Wheat germ agglutinin (WGA)	Rhodamin	Glykosilierungen der Proteine	1:100	Fa. Molecular Probes
Phalloidin	TRITC	F-Aktin	1:400	Fa. Sigma

Um die Aktinfilamente der Rhabdomere zu markieren wurde ein fluorochromgekoppeltes Phalloidin-Konjugat verwendet, welches spezifisch an F-Aktin bindet. Die Inkubation mit dem Phalloidin-Konjugat wurde gemeinsam mit den sekundären Antikörpern vorgenommen. Die verwendete Verdünnung ist der Tabelle 3-5 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte in Mowiol (25,6% (w/v) Mowiol 4.88, 2,5% (w/v) n-Propyl-Gallat, 51% (v/v) Glycin in 1x PBS) eingeschlossen.

3.2.6.3 Dokumentation von Fluoreszenzsignalen

Die Dokumentation von Fluoreszenzsignalen erfolgte durch konfokale Laserscanning Mikroskopie mit einem Mikroskop der Fa. Leica (Leica TCS SP). Diese Methode erlaubt die Darstellung dünner optischer Ebenen eines Präparates ohne Streusignale aus anderen Ebenen. Mit der verwendeten Software (Leica Confocal Software) konnten mehrere verschiedene Fluoreszenzsignale sowie ein Interferenzkontrastbild gleichzeitig aufgenommen und die Überlagerung verschiedener Kanäle dargestellt werden. Diese Überlagerungsbilder ermöglichen die Dokumentation von Kollokalisierungen.

3.2.6.4 Wasserimmersionsmikroskopie

Das eGFP ist ein hervorragend geeignetes Reportergen, um an intakten Augen von *Drosophila* die Translokation des TRPL-eGFP Fusionsproteins zu analysieren. Hierfür wurden Fliegen im Alter von zwei bis vier Tagen verwendet. Zunächst wurden die Fliegen mit Diethylether abgetötet und dann auf Eis gestellt. Zur Befestigung wurde eine Insektennadel durch den Thorax gespießt und mittels Plastilin auf einem Objektträger fixiert. Dokumentiert wurde die Epifluoreszenz unter dem Mikroskop (DM LFS; Fa. Leica) mit einem 20-fach Wasserimmersionsobjektiv in Wasserimmersion. Das Wasser neutralisiert optisch die Cornea und ermöglicht

eine höhere Auflösung. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberlampe (100W, ebq 100 dc-1; Fa. Jena GmbH). Zur Auflichtanregung wurden spezielle Filtersysteme verwendet. Der Anregungsfilter des verwendeten Filtersatzes (I3; Fa. Leica) transmittiert Licht im Wellenlängenbereich zwischen 450 und 490nm. Der dichromatische Teilerspiegel reflektiert diese kurzwellige Erregerstrahlung zum Präparat hin, ist aber transparent für das dort emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht. Er ist durchlässig für den Wellenlängenbereich über 510nm. Der Sperrfilter hält vom Präparat gestreutes Erregerlicht zurück, welches in das Objektiv eingetreten ist. Er besitzt höchste Durchlässigkeit für den Wellenlängenbereich über 515nm. Die Abb. 3-2 zeigt schematisch den Strahlengang. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels einer digitalen Kamera (DC200; Fa. Leica) dokumentiert.

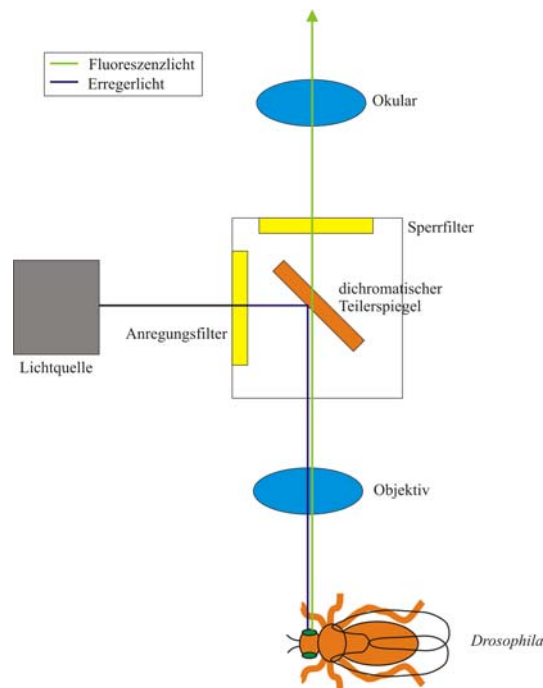


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Auflichtanregung der eGFP Fluoreszenz. Erläuterungen im Text. (Verändert nach Fa. Leica Microsystems).

3.2.6.5 Quantifizieren von Fluoreszenzsignalen

Um die relative Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren zu bestimmen, wurden Bilder aus der Wasserimmersionsmikroskopie mit dem Programm ImageJ 1.32j analysiert. Pro Bild wurde die Fluoreszenzintensität von 3 kompletten Ommatidien bestimmt. Es wurden Ommatidien ausgewählt, welche sich in der Schärfenebene nebeneinander befanden. Pro Ommatidium wurden 13 Messungen vorgenommen: Sechs Messungen innerhalb der Rhabdomere (I_r , Kreisgröße: 5×5), sechs Messungen außerhalb der Rhabdomere in den Zellkörpern (I_c , Kreisgröße: 5×5) und eine Messung im Zentrum des Ommatidiums (I_b , Kreisgröße 3×3), wo sich die Rhabdomere der R7 und R8 Zellen befinden, als Hintergrundwert. Die relative Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren (R) wurde aus diesen Messwerten nach folgender Formel berechnet:

$$R = \frac{I_r - I_b}{(I_r - I_b) + (I_c - I_b)}$$

Die erhaltenen Werte wurden normiert auf die Werte, die für dunkeladaptierte Fliegen, welche TRPL-eGFP im Wildtyp-Hintergrund exprimieren, errechnet wurden. Diese wurden auf 100% gesetzt. Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt.

3.2.6.6 Beobachtung der tiefen Pseudopupille

Das optische Phänomen der tiefen Pseudopupille liefert eine gute nichtinvasive Technik um das Fusionsprotein TRPL-eGFP mit Hilfe der eGFP-Fluoreszenz nachzuweisen. Die tiefe Pseudopupille entsteht durch die Überlagerung der virtuellen Abbildungen von Rhabdomeren benachbarter Ommatidien als direkte Folge der Superposition. In einem definierten Abstand von der Retina resultiert diese Überlagerung in einem deutlich sichtbaren trapezoidalen Muster, das genau dem rhabdomerischen Muster eines Ommatidiums entspricht.

Die tiefe Pseudopupille wurde in der vorliegenden Arbeit unter dem Mikroskop (DM LFS; Fa. Leica) beobachtet. Dazu wurden die *Drosophila* mit CO_2 betäubt. Die Belichtung erfolgte einmal mit demselben Filtersatz wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben, um die tiefe Pseudopupille in ihrer Grünfluoreszenz zu dokumentieren, und einmal mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500; Fa. Schott) von der Seite. Diese beiden Bilder wurden dann in einem Bildbearbeitungsprogramm (siehe Kapitel 3.1.4) entsprechend übereinandergelegt.

3.2.7 *Drosophila*-Genetik

3.2.7.1 *Durchführung von Kreuzungen*

In der vorliegenden Arbeit sollten Komponenten der visuellen Transduktionskaskade und des vesikulären Transports ausfindig gemacht werden, welche die lichtabhängige Wanderung von TRPL-eGFP vermitteln. Zu diesem Zweck wurde das P-Element, welches für TRPL-eGFP kodiert, in diverse Mutanten eingekreuzt. Zur besseren Handhabung wurden die Mutanten mit Hilfe von Balancer-Chromosomen homozygot gekreuzt [86]. War die Mutation auf dem zweiten oder dritten Chromosom lokalisiert, so wurde eine transgene Linie für die Kreuzung ausgewählt, bei der sich das P-Element auf dem jeweils anderen Autosom befand. Lag die betreffende Mutation allerdings auf dem X-Chromosom, so wurden Weibchen dieser Mutante mit Männchen einer transgenen Linie gekreuzt, bei welcher sich das P-Element auf einem Autosom befand. Aus der resultierenden F1-Generation wurden nur Männchen zu weiteren Experimenten verwendet, welche hemizygot für die betreffende Mutation und heterozygot für das P-Element waren. Diese Fliegen wurden je nach Bedarf immer wieder neu gekreuzt.

3.2.7.2 *Mutagenese-Screen*

Die Herstellung von Mutanten, bei denen die Wanderung des TRPL-eGFP unterbleibt, erfolgte mit Hilfe eines Mutagenese-Screens. Hierfür wurden zwei verschiedene Fliegenstämme verwendet, welche jeweils die Flipase unter dem *eyeless* enhancer exprimieren, sowie FRT-Sequenzen an derselben Stelle besitzen. Diese Stämme unterschieden sich aber auch in mehreren Punkten: i) sie besitzen unterschiedliche Augenfarben, ii) jeweils eine Linie enthält das Reportergen *trpl-eGFP*, iii) jeweils eine Linie trägt auf dem FRT-Chromosom, welches distal markiert ist, zusätzlich eine *cell lethal* Mutation und besitzt als homologes Chromosom zum FRT-Chromosom ein Balancer-Chromosom (siehe Tabelle 3-6). Findet in der F1-Generation mitotische Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen statt, geht der distal gelegene Marker (*white*-Markergen, verursacht rote Augen) verloren. Das resultiert in einer weißen Augenfarbe der homozygot rekombinanten Klone. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mutagenese-Screen für die Chromosomenarme 2L und 3R durchgeführt.

Tabelle 3-6: Zusammenstellung der Fliegenstämme, die für den Mutagenese-Screen verwendet werden. Die Herstellung der Mutanten Gf¹ 209 und Gb¹ 215 ist in Kapitel 4.9 beschrieben.

Name	Genotyp	Referenz
Gf ¹ 209 (2L)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ P[TRPL-eGFP y⁺]; 2L3.1 P[w⁺]30C FRT40A/CyO</i>	diese Arbeit
5615 (2L)	<i>yw eyFlp2 GMR-lacZ; P[neoFRT]40A</i>	Bloomington Stock Center, USA
Gb ¹ 215 (3R)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ P[TRPL-eGFP y⁺]; ; FRT82B 3R3.7 P[w⁺]90E/MKRS</i>	diese Arbeit
214 (3R)	<i>yw eyFlp2 glass-lacZ; ; FRT82B</i>	E. Hafen

Für die Mutagenese wurden weißäugige Männchen der beiden Linien 5615 beziehungsweise 214 verwendet, welche kein *trpl-eGFP* Reportertragen tragen. Diese Fliegen ließ man für 6h hungern und fütterte sie anschließend für 24h mit 25mM Ethylmethylsulfonat (EMS; Fa. Sigma) in 2% Zuckerlösung. Die mutagenisierten Männchen wurden dann zusammen mit der doppelten Anzahl an rotäugigen Weibchen der Stämme Gf¹ 209 bzw. Gb¹ 215 *en masse* in frischen, mit Hefe bestückten Gefäßen verkreuzt. Nach drei Tagen wurden die Fliegen in neue, mit Hefe bestückte Gefäße weitergesetzt und drei Tage belassen. Anschließend wurden die Fliegen entsorgt. Alle Gegenstände, die mit EMS in Berührung gekommen sind, wurden für mindestens 24h mit Thioglykolsäure dekontaminiert (1,25% (v/v) Thioglykolsäure, 4% (w/v) NaOH). Aus der resultierenden F1-Generation wurden die Männchen mit Mosaikaugen auf einen Defekt in der Wanderung des TRPL-eGFP durchgemustert. Diejenigen Männchen, die einen solchen Wanderungsdefekt aufwiesen, wurden einzeln mit Weibchen des entsprechenden Stammes rückgekreuzt (siehe Abb. 4-17). Die F2-Generation wurde nochmals auf den Wanderungsdefekt hin überprüft. Diejenigen Fliegen, welche den Wanderungsdefekt stabil aufwiesen, wurden aussortiert und es wurden stabile Linien etabliert (siehe Abb. 4-17).

Die lichtabhängige Translokation des TRPL-eGFP kann dabei anhand der grünen Fluoreszenz des eGFP relativ einfach beobachtet werden. Die Lokalisation der eGFP-Fluoreszenz zeigt an, wo sich das TRPL-eGFP Fusionsprotein befindet. Es existieren zwei verschiedene Methoden, die sich hervorragend dafür eignen, die Lokalisation des TRPL-eGFP in den intakten Augen der

Fliegen zu bestimmen: i) anhand der tiefen Pseudopupille und ii) mittels der Wasserimmersi-
onstechnik [86]. Diese beiden Methoden eine Wanderung des TRPL-eGFP zu erkennen wurden
im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das Durchmustern der Fliegen nach der Mutagenese ge-
nutzt.

3.2.7.3 Lokalisation von Mutationen mittels Deletionskartierung

Es gibt verschiedene methodische Ansätze um Gene zu lokalisieren, wie z.B. die Lokalisation
durch meiotische Rekombination über Markermutationen mit sichtbaren Phänotypen oder über
molekulare Marker wie „*single-nucleotide polymorphisms*“ (SNP's). Bei homozygot lethalen
oder rezessiven Mutationen lässt sich die Deletionskartierung zur Lokalisation von Mutationen
anwenden. Mit Hilfe von zytologisch erkennbaren Deletionen lassen sich sehr viele Gene be-
stimmten Abschnitten auf den Chromosomen zuordnen. Die Deletionen sind erkennbar durch
Bruchstellen auf dem entsprechenden Chromosomenarm und werden durch Balancer-Chromo-
somen stabilisiert. Diese verhindern die Rekombination in der meiotischen Prophase. Die Ba-
lancer-Chromsomen tragen außerdem dominante Markergene, damit sie phänotypisch sichtbar
sind. Die Methode der Deletionskartierung wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Mutante
NM(2L)4.52 angewandt, welche eine rezessive Mutation trägt und homozygot lethal ist.

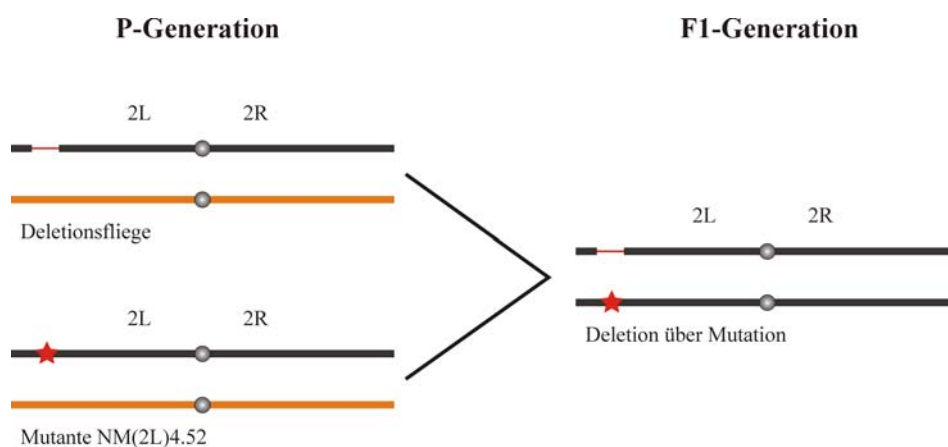


Abb. 3-3 **Deletionskartierung der Mutante NM(2L)4.52.** Für die Kartierung der Mutation mit Hilfe von Deletionsstämmen werden Männchen der Deletionsstämmen mit heterozygoten, unbefruchteten Weibchen der Mutante NM(2L)4.52 gekreuzt. Die F1-Generation wird auf das Vorhandensein von Fliegen des Typs Deletion über

Mutation untersucht. Diese Fliegen werden auf den Wanderungsdefekt hin überprüft. Stern: induzierte Mutation, rote Linie: Deletion, orange: Balancer-Chromosomen.

Die für die Deletionskartierung verwendeten Fliegenstämme wurden vom Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University, USA) bezogen. Männchen der Deletionsstämme wurden im Alter von 3-5 Tagen mit heterozygoten, unbefruchteten Weibchen der Mutante NM(2L)4.52 gekreuzt (siehe Abb. 3-3).

In Tabelle 3-7 sind alle verwendeten Deletionsstämme zusammengefasst. Da nicht zwingend davon ausgegangen werden kann, dass die Mutation, welche für den Wanderungsdefekt verantwortlich ist, auch die Lethalität auslöst, wurde die F1-Generation nicht nur auf Lethalität untersucht, sondern auch auf die Ausprägung der TRPL-eGFP Wanderung. Kommt in der F1-Generation die Mutation über der betreffenden Deletion zu liegen, so ist keine Wanderung des TRPL-eGFP zu beobachten. Löst die Mutation, welche für den Wanderungsdefekt verantwortlich ist, auch die Lethalität aus, so sind Fliegen, die die Deletion über der Mutation tragen, nicht vorhanden, sondern nur Fliegen, welche eines der entsprechenden Balancer-Chromosomen (Abb. 3-3, orange dargestellt) tragen. Liegt die Deletion an einer anderen Stelle, so findet eine Wanderung des TRPL-eGFP statt. Die F1-Generation wurden daraufhin durchsucht, ob Fliegen mit der Deletion über der Mutation vorhanden sind und diese wurden dann nach Belichtung bzw. Dunkeladaptation (siehe Kapitel 3.2.2) auf den Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP überprüft.

Tabelle 3-7: Zusammenfassung aller verwendeten Deletionsstämme (Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University, USA). Die mit * gekennzeichneten Stämme wurden von der Firma Exelixis Inc. zur Verfügung gestellt.

Stammnummer	Kurzbezeichnung der Deletion	Bruchstellen, Insertionen (In) und Duplikationen (Dp)	Balancer-Chromosom
90	Df(2L)C144	22F3-4;23C3-5	In(2LR)Gla
140	Df(2L)Trf-C6R31	28DE;28DE	CyO
167	Df(2L)TW161	38A6-B1;40A4-B1	CyO
179	Df(2L)TE29Aa-11	28E4-7;29B2-C1	CyO
420	Df(2L)TW137	36C2-4;37B9-C1	Dp(2;2)M(2)m[+]
490	Df(2L)E110	25F3-26A1;26D3-11	CyO
567	Df(2L)pr-A16	37B2-12;38D2-5	CyO
693	Df(2L)sc19-8	24C2-8;25C8-9	Dp(2;1)B19
781	Df(2L)cl-h3	25D2-4;26B2-5	SM6b
1045	Df(2L)Mdh	30D-30F;31F	Dp(2;2)Mdh3
1491	Df(2L)r10	35D1;36A6-7	CyO
1567	Df(2L)JS17	23C1-2;23E1-2	CyO
2414	Df(2L)spd[j2]	27C1-2;28A	CyO
2583	Df(2L)cact-255rv64	35F-36A;36D	CyO
2892	Df(2L)N22-14	29C1-2;30C8-9	CyO
3079	Df(2L)Prl	32F1-3;33F1-2	CyO
3084	Df(2L)ast2	21D1-2;22B2-3	SM1
3133	Df(2L)dp-79b	22A2-3;22D5-E1	In(2LR)bw[V1]
3138	Df(2L)b87e25	34B12-C1;35B10-C1	CyO
3366	Df(2L)J2	31B;32A	SM1
3588	Df(2L)TE35BC-24	35B4-6;35F1-7	CyO
3638	Df(2L)net-PMF	21A1;21B7-8	SM6a
3813	Df(2L)sc19-4	25A5;25E5	In(2L)Cy[L]t[R] In(2R)Cy
4956	Df(2L)XE-3801	27E2;28D1	CyO
4959	Df(2L)C'	h35;h38L	CyO
5330	Df(2L)ed1	24A2;24D4	CyO
5420	Df(2L)Dwee1-W05	27C2-3;27C4-5	CyO
5869	Df(2L)FCK-20	32D1;32F1-3	CyO
6283	Df(2L)BSC4	21B7-C1;21C2-3	SM5
6299	Df(2L)BSC5	26B1-2;26D1-2	SM6a
6338	Df(2L)BSC6	26D3-E1;26F4-7	SM6a

Stammnummer	Kurzbezeichnung der Deletion	Bruchstellen, Insertionen (In) und Duplikationen (Dp)	Balancer-Chromosom
6374	Df(2L)BSC7	26D10-E1;27C1	CyO
6478	Df(2L)BSC17	30C3-5;30F1	SM6a
6507	Df(2L)drm-P2	23F3-4;24A1-2	SM6b
6608	Df(2L)BSC16	21C3-4;21C6-8	SM6a
6648	Df(2L)dpp[d14]	22E4-F2;22F3-23A1	In(2LR)Gla
6875	Df(2L)BSC28	23C5-D1;23E2	SM6a
6965	Df(2L)BSC31	23E5;23F4-5	CyO
6999	Df(2L)BSC30	34A3;34B7-9	SM6a
7142	Df(2L)BSC32	32A1-2;32C5-D1	SM6a
7143	Df(2L)BSC36	32D1;32D4-E1	SM6a
7144	Df(2L)BSC37	22D2-3;22F1-2	CyO
7147	Df(2L)BSC41	28A4-B1;28D3-9	CyO
7497*	Df(2L)Exel6011	25C8;25D5	CyO
7531*	Df(2L)Exel6049	40A5;40D3	CyO
8469	Df(2L)BSC50	30F4-5;31B1-4	SM6a
8490	Df(2L)BSC53	29A2-B1;29D2-E1	SM6a
8674	Df(2L)BSC109	25C4;25C8	CyO

3.2.8 Elektrophysiologie

Elektroretinogramme wurden durchgeführt wie von Peretz *et al.* beschrieben [113]. ERG Ableitungen wurden aufgezeichnet unter der Verwendung eines *Axon analog to digital* Konverters gesteuert vom Programm pClamp 8. Diese Messungen wurden von der Arbeitsgruppe von Baruch Minke an der Hebrew University in Jerusalem, Israel, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Erzeugung und Aufreinigung von Antiserum gegen *Drosophila*-TRP

Die Erkennung von *Drosophila*-Proteinen auf Western Blots und in Immunocytochemischen Analysen erfordert Antikörper, welche die betreffenden Proteine spezifisch erkennen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei primäre Antikörper verwendet: α -GFP, α -TRP und α -TRPL. Der Antikörper gegen GFP ist nicht *Drosophila*-spezifisch und ist kommerziell erhältlich (Fa. Roche). Die Antikörper gegen DmTRP und DmTRPL wurden am Institut für Zell- und Neurobiologie entwickelt und selbst hergestellt [6]. Der Antikörper gegen DmTRP wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachproduziert, wohingegen α -DmTRPL noch in ausreichenden Mengen vorhanden war.

Zur Erzeugung eines α -DmTRP Immunsersums wurde ein zur Expression kloniertes *Drosophila melanogaster* TRP-Antigen Konstrukt (DmTRP3.1, [6]) heterolog in *E. coli* M15p[REP4] exprimiert. Das Antigen umfasst den C-Terminus des TRP (Aminosäuren 906-1275) mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,6kDa, der an Dehydrofolatreduktase (26kDa) und Hexahistidin fusioniert ist. Das gereinigte und dialysierte Antigen (siehe Kapitel 3.2.4.4) wurde zur Immunisierung von Kaninchen zur Produktion polyklonaler Antikörper verwendet.

In der Abb. 4-1 ist der Nachweis von TRP mit Serum der Endblutung bzw. dem affinitätsgereinigten Antikörper (siehe Kapitel 3.2.5.7) gezeigt. Die Spezifität wird mit Hilfe von Wildtypfliegen und der *trpl*³⁰²; *trp*⁹ Doppelmutante als Negativkontrolle überprüft. Sowohl das Serum als auch der affinitätsgereinigte Antikörper weisen eine hohe Spezifität für das TRP-Protein auf.

Eine deutliche Bande, welche dem TRP entspricht, ist bei einem Molekulargewicht von knapp 150kDa zu sehen. Das errechnete Molekulargewicht von TRP beträgt 143kDa. Diese Bande ist nur bei den Wildtyp-Fliegen vorhanden (Spuren 4, 6) und nicht bei der Negativkontrolle (Spuren 3, 5). Beim Serum ist zusätzlich eine sehr schwache, unspezifische Bande bei ca. 60kDa vorhanden, die nach der Aufreinigung verschwunden ist. Durch die Aufreinigung konnte der Antikörper etwas aufkonzentriert werden, weshalb das Signal des aufgereinigten Antikörpers (Spur 6) etwas stärker ist als das des Serums (Spur 4).

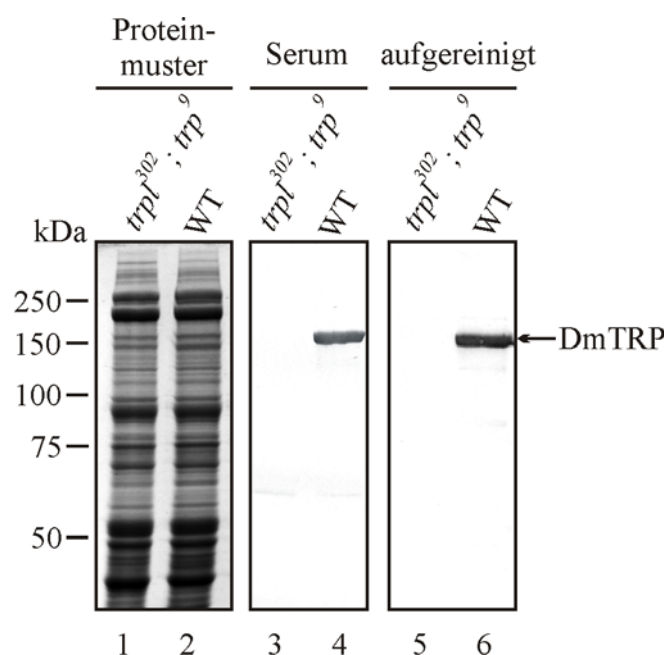


Abb. 4-1 Charakterisierung des Antikörpers α -DmTRP. Die Spezifität der Detektion von TRP durch α -DmTRP wurde durch Western Blot Analysen überprüft. Die Proteine aus je 3 *Drosophila* Köpfen wurden pro Spur geladen und mit einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mittels NBT/BCIP. Auf den Spuren 1 und 2 sind die mit Coomassie gefärbten Proteinextrakte gezeigt, auf den Spuren 3 und 4 wird das Serum der Endblutung (Verd. 1:1000) und auf den Spuren 5 und 6 der affinitätsgereinigte Antikörper (Verd. 1:1000) zur Detektion verwendet.

4.2 Spezifität der Antikörper α -DmTRPL und α -GFP

Der α -TRPL Antikörper ist gegen ein kurzes Peptid (Aminosäuren 1083-1097) im C-Terminus des Proteins gerichtet. Daher stellte sich die Frage, ob mit diesem Antikörper auch das Fusionsprotein TRPL-eGFP detektiert werden kann, da sich das eGFP-Anhängsel am C-Terminus des TRPL befindet. Diese Frage sollte mittels Western Blot geklärt werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob das Fusionsprotein TRPL-eGFP mit dem kommerziell erhältlichen, monoklonalen α -GFP Antikörper (Fa. Roche) detektiert werden kann.

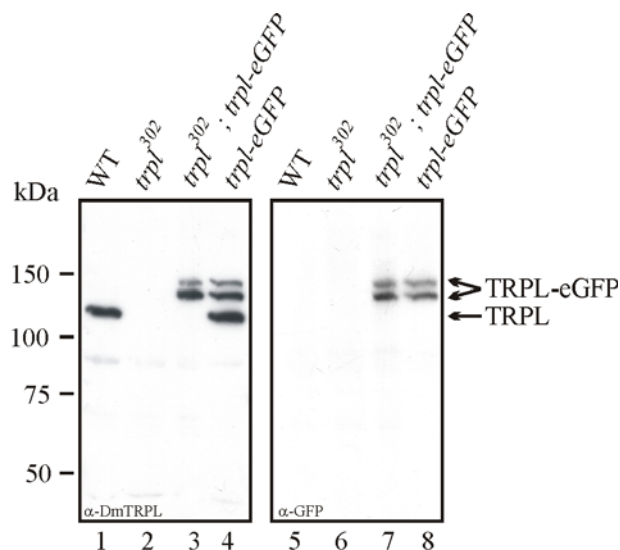


Abb. 4-2 Charakterisierung der Antikörper α -DmTRPL und α -GFP. Die Spezifität der Detektion von nativem TRPL und TRPL-eGFP durch α -DmTRPL sowie von TRPL-eGFP durch α -GFP wurde durch Western Blot Analysen überprüft. Die Proteine aus je 3 *Drosophila* Köpfen wurden pro Spur geladen und mit einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-System. Es handelt sich hier um einen Blot, bei dem die Antikörper nach der Detektion gemäß den Angaben des Herstellers entfernt wurden und der Blot mit dem anderen Antikörper erneut inkubiert wurde.

Der Blot, der mit Antikörpern gegen DmTRPL (Spuren 1-4) und GFP (Spuren 5-8) inkubiert wurde, ist in Abb. 4-2 gezeigt. In der Spur 1 ist der Wildtyp aufgetragen und hier ist eine Bande zu sehen, welche dem nativem TRPL (Molekulargewicht: 128kDa) entspricht. Bei der TRPL-Nullmutante (Spur 2) ist keine Bande zu sehen. In den Spuren 3 und 4 sind Proteinextrakte von

Fliegen aufgetragen, welche TRPL-eGFP in der TRPL-Nullmutante bzw. im Wildtyp-Hintergrund exprimieren. Hier sind (zusätzlich) zwei Proteinbanden bei ca. 145kDa und 135kDa vorhanden, welche dem TRPL-eGFP entsprechen. Diese beiden Banden werden auch von α -GFP detektiert (Spuren 7 und 8). Die untere dieser beiden Banden entspricht wahrscheinlich einem Abbauprodukt des TRPL-eGFP. Auf dem Blot, der mit α -TRPL inkubiert wurde, sind außerdem drei schwache unspezifische Banden bei ca. 85kDa, 70kDa und 35kDa zu erkennen. Sie treten auch bei der TRPL-Nullmutante (Spur 2) auf. Der α -GFP Antikörper detektiert keine unspezifischen Banden.

4.3 Expression von TRPL-eGFP in transgenen *Drosophila*

Um die Translokation des TRPL-eGFP Fusionsproteins *in vivo* verfolgen zu können, wurden in einer vorangegangenen Arbeit transgene Fliegen hergestellt, die TRPL-eGFP exprimieren [86]. Das *trpl-eGFP* Transgen wurde in den Fliegen unter der Kontrolle eines Rhodopsin1- (Rh1) Promotorfragments exprimiert (Basenpaare -833 bis +67, [91]). Rh1 ist das Protein, welches in den Photorezeptorzellen mit Abstand in der größten Menge vorhanden ist. Der Rh1-Promotor ist um ein Vielfaches stärker als der TRPL-Promotor und daher sollte das *trpl-eGFP* Transgen stark überexprimiert werden. Um dies zu überprüfen wurde die Expression des Transgens auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht.

4.3.1 Abschätzung der mRNA-Menge an *trpl-eGFP* in transgenen Fliegen

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wieviel *trpl-eGFP* mRNA im Vergleich zu *trpl* mRNA in transgenen Fliegen vorhanden ist, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *Drosophila*-Köpfen isoliert und auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf eine Membran geblottet und die Membran mit einer Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde gegen *trpl* inkubiert. Der Nachweis des gebundenen α -Digoxigenin/alkalische Phosphatase Antikörperkonjugats erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star (Fa. Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers. Die Abb. 4-3 zeigt den Northern Blot.

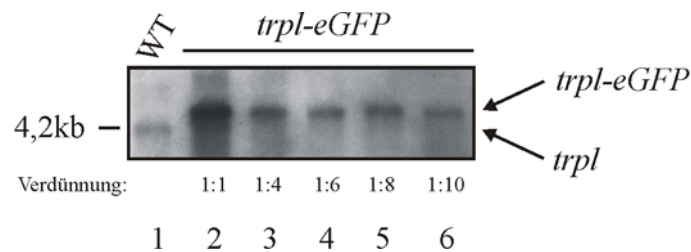


Abb. 4-3 **Abschätzung des mRNA-Gehalts von *trpl-eGFP* im Vergleich zu *trpl* mittels Northern Blot.** Die Gesamt-RNA von *Drosophila*-Köpfen wurde isoliert und auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt. Auf den Spuren 1 und 2 sind jeweils 1µg der Gesamt-RNA aufgetragen, auf den Spuren 3-6 die Verdünnungen der Gesamt-RNA wie angegeben. Die cRNA Sonde wurde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten gebundenen Sonde erfolgte mit anti-Digoxigenin/alkalische Phosphatase-Konjugat und CDP-Star nach den Anweisungen des Herstellers.

Die erste Spur der Abb. 4-3 zeigt die RNA aus Wildtyp-Fliegen. Das Signal entspricht der Menge an nativer *trpl* mRNA. In den Spuren zwei bis sechs ist die RNA aus transgenen Fliegen, die *trpl-eGFP* im Wildtyp-Hintergrund exprimieren, in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. In der zweiten Spur ist dieselbe RNA-Menge wie in der ersten Spur, in Spur 3 ein Viertel, in Spur 4 ein Sechstel, in Spur 5 ein Achtel und in Spur 6 ein Zehntel der RNA-Menge von Spur 1 aufgetragen. Da die mRNA-Mengen in der ersten und der letzten Spur sich in etwa entsprechen lässt sich sagen, dass die Menge an *trpl-eGFP* mRNA in transgenen Fliegen ungefähr der zehnfachen Menge an *trpl* mRNA in Wildtyp-Fliegen entspricht.

4.3.2 Abschätzung der Proteinmenge an TRPL-eGFP in transgenen Fliegen

Da Genregulation sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene vorliegt, korreliert die vorhandene mRNA-Menge nicht zwingend mit der entsprechenden Proteinmenge. Das Wissen, wieviel mRNA vorhanden ist, erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf die Proteinmenge. Daher galt es zu klären, welche Proteinmengen an TRPL-eGFP in den transgenen Fliegen im Vergleich zu nativem TRPL tatsächlich vorhanden sind. Dies geschah mit Hilfe von Western Blot Analysen. Dazu wurden Proteinextrakte von *Drosophila*-Köpfen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Der Nachweis der gebundenen Primärantikörper erfolgte mit dem

ECL-System gemäß den Angaben des Herstellers. Die Abb. 4-4 zeigt den Western Blot, der mit Antikörpern gegen DmTRPL (Spuren 1-4) und DmTRP (Spuren 5-8) inkubiert wurde. Der Blot, der mit α -TRP inkubiert wurde zeigt, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

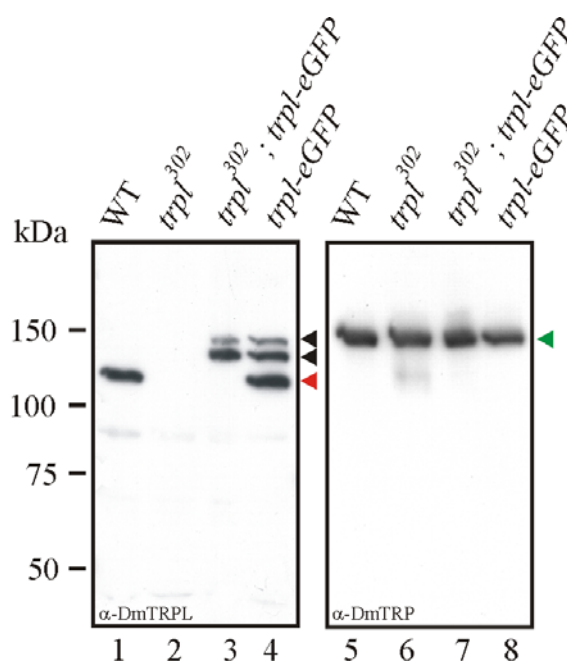


Abb. 4-4 **Abschätzung der Proteinmengen an TRPL, TRPL-eGFP und TRP in verschiedenen Mutanten.** Die Proteine aus je 3 *Drosophila* Köpfen wurden pro Spur geladen und mit einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-System. Es handelt sich hier um einen Blot, bei dem der Antikörper nach der Detektion gemäß den Angaben des Herstellers entfernt wurden und der Blot mit dem anderen Antikörper erneut inkubiert wurde. Schwarze Pfeilspitze: DmTRPL-eGFP, rote Pfeilspitze: DmTRPL, grüne Pfeilspitze: DmTRP. Der Blot entspricht dem Blot in der Abb. 4-2.

Anhand der Stärke der Signale der Spur 4, welche (von unten) dem nativen TRPL, einem Abbauprodukt des TRPL-eGFP und dem TRPL-eGFP entsprechen, lässt sich am besten eine Aussage über die Mengenverhältnisse von TRPL und TRPL-eGFP in den Fliegen treffen. Die Signale, die das TRPL-eGFP selbst bzw. dessen Abbauprodukt repräsentieren, entsprechen zu-

sammengenommen in etwa der Stärke des Signals des nativen TRPL. Damit lässt sich sagen, dass die Proteinmenge an TRPL-eGFP in den transgenen Fliegen in etwa der Proteinmenge an nativem TRPL entspricht und folglich das TRPL-eGFP auf Proteinebene in den Fliegen nicht überexprimiert wird. Die Proteinmengen sind somit nicht proportional zu den mRNA-Mengen.

4.4 Funktionalität von TRPL-eGFP

Um festzustellen, ob das eGFP-Anhängsel mit der Bildung funktioneller TRPL-Kanäle interferiert, wurden Fliegen generiert, welche TRPL-eGFP im Hintergrund der *trpl*³⁰²; *trp*⁹ Doppelmutante exprimieren. Diese Mutante besitzt keine funktionellen Kanäle in den Photorezeptoren und weist keine Lichtantwort auf [103], [131]. Daher würden Lichtantworten in Fliegen, welche TRPL-eGFP in diesem genetischen Hintergrund exprimieren, allein aus der Bildung funktioneller TRPL-eGFP Kanäle resultieren. Die Eigenschaften der TRPL-eGFP Kanäle wurden *in vivo* durch die Ableitung von Elektoretinogrammen (ERG) untersucht. Die ERG Ableitungen der TRPL-eGFP exprimierenden Mutanten ergeben Lichtantworten, die innerhalb von 5s auf das Niveau der Basislinie zurückfallen (siehe Abb. 4-5 C). Ein zweiter Lichtpuls nach 10s bewirkt eine erneute transiente Lichtantwort. Die transienten Lichtantworten der TRPL-eGFP exprimierenden Fliegen sind denen von *trp*-Mutanten, welche native TRPL Kanäle exprimieren, sehr ähnlich (siehe Abb. 4-5 B). Die Lichtantworten sowohl der TRPL-eGFP exprimierenden Fliegen als auch der *trp*-Mutanten unterscheiden sich stark von den Lichtantworten der Wildtyp-Fliegen (siehe Abb. 4-5 A). Wildtyp-Fliegen zeigen eine anhaltende Antwort während der Belichtung. Die Antworten auf die beiden aufeinanderfolgenden Lichtpulse sind identisch. Dies ist sowohl bei der *trp*-Mutante als auch bei den TRPL-eGFP exprimierenden Fliegen nicht der Fall. In diesen beiden Mutanten sind die Antworten auf den zweiten Lichtpuls jeweils deutlich schwächer als die Antworten auf den ersten Lichtpuls. Die Antwort der TRPL-eGFP exprimierenden Fliegen auf den zweiten Lichtpuls ist dabei signifikant stärker als die entsprechenden Antworten der *trp*-Mutante. Dies deutet darauf hin, dass sich die *trp*-Mutante langsamer von der lichtinduzierten Aktivierung erholt als die TRPL-eGFP exprimierende Fliege und aus diesem Grund die Antwort auf einen erneuten Lichtpuls schwächer ausfällt.

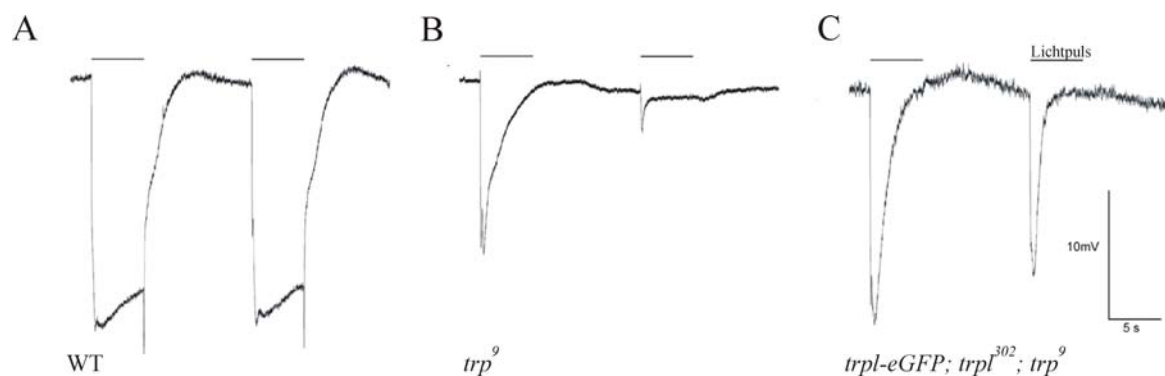


Abb. 4-5 Elektroretinogramm (ERG) Messungen von transgenen Fliegen, welche das TRPL-eGFP Fusionsprotein exprimieren. A: ERG Ableitungen von Wildtyp (WT) Fliegen als Antwort auf zwei orange Lichtpulse (dargestellt als Striche über den Ableitungen). B: ERG Ableitungen von der *trp*⁹-Nullmutante mit demselben transienten Phänotyp. C: ERG Ableitungen von transgenen Fliegen als Antwort auf dieselben Lichtpulse. Ein transientes Rezeptorpotential, typisch für *trp*-Mutanten, wird beobachtet. Eine ungewöhnlich starke Lichtantwort auf den zweiten Lichtstimulus nach 10s Dunkelheit ist vorhanden. Die ERG-Ableitungen wurden von der Arbeitsgruppe von B. Minke (Hebrew University Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt.

4.5 Lichtabhängige Wanderung von TRPL-eGFP

Wie bereits in der vorangegangenen Arbeit [86] gezeigt werden konnte, wandert das TRPL-eGFP Fusionsprotein ebenso wie natives TRPL lichtabhängig zwischen den Rhabdomeren und einem intrazellulären Kompartiment hin- und her. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um die Wanderung des Ionenkanals anhand des Fusionsproteins *in vivo* untersuchen zu können.

In der Abb. 4-6 ist die Lokalisation des TRPL-eGFP zu den angegebenen Zeitpunkten nachdem die Fliegen von der Dunkelheit ins Licht gesetzt wurden (A) oder *vice versa* (B) dargestellt. In dunkeladaptierten Fliegen ist das TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert und wird auf Belichtung hin internalisiert (A). In lichtadaptierten Fliegen befindet sich das TRPL-eGFP in einem Speicherkompartiment im Zellkörper und wird im Verlauf der Dunkeladaptation wieder in die rhabdomerischen Membranen eingeschleust (B). Die Abb. 4-6 veranschaulicht die Wande-

rung des TRPL-eGFP und erlaubt einen ersten Eindruck über den Zeitrahmen, in dem sich die Translokation abspielt. Um quantitative Aussagen über den Zeitverlauf und die Kinetik der Wanderung machen zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt (siehe Kapitel 3.2.6.5).

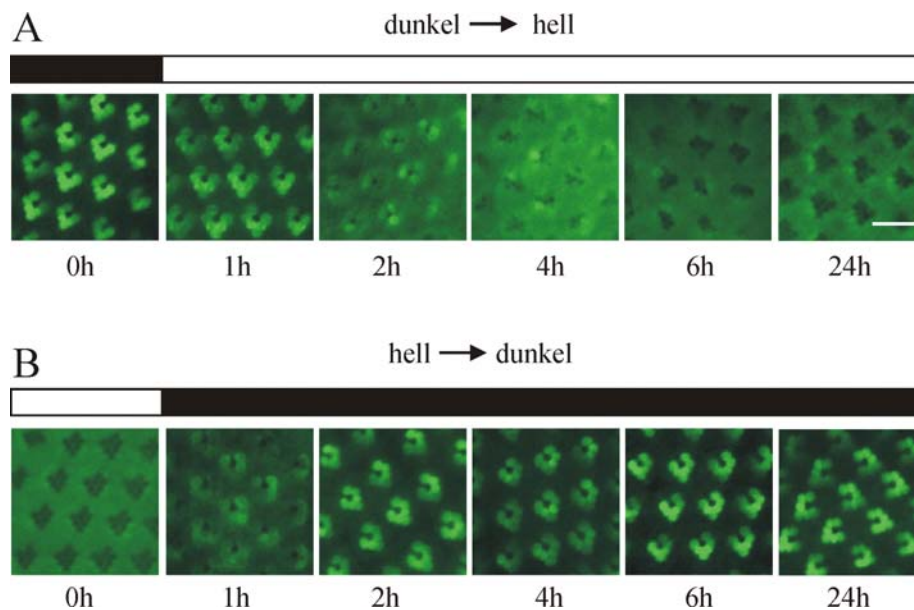


Abb. 4-6 Lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP Fusionsproteins. Gezeigt sind repräsentative Wasserimmersionsbilder der intakten Augen von *trpl-eGFP*-exprimierenden Fliegen, die die Lokalisation des TRPL-eGFP zu unterschiedlichen Zeiten der Belichtung (A) bzw. Dunkeladaptation (B) zeigen. Eichstrich 15 μ m.

4.6 Kinetik der TRPL-eGFP Wanderung

Um die Kinetik der TRPL-eGFP Wanderung zu ermitteln, wurde die Intensität der eGFP-Fluoreszenz innerhalb und außerhalb der Rhabdomere in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Dazu wurden Fluoreszenzaufnahmen der eGFP-Fluoreszenz in intakten Augen mit der Wasserimmersionstechnik gemacht und ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.6.5). Die erhaltenen Zeitverläufe für die Internalisierung des TRPL-eGFP (Abb. 4-7 A) bzw. dessen Einschleusung in die rhabdomerischen Membranen (Abb. 4-7 B) ergeben, dass beide Prozesse im Bereich von Stunden liegen.

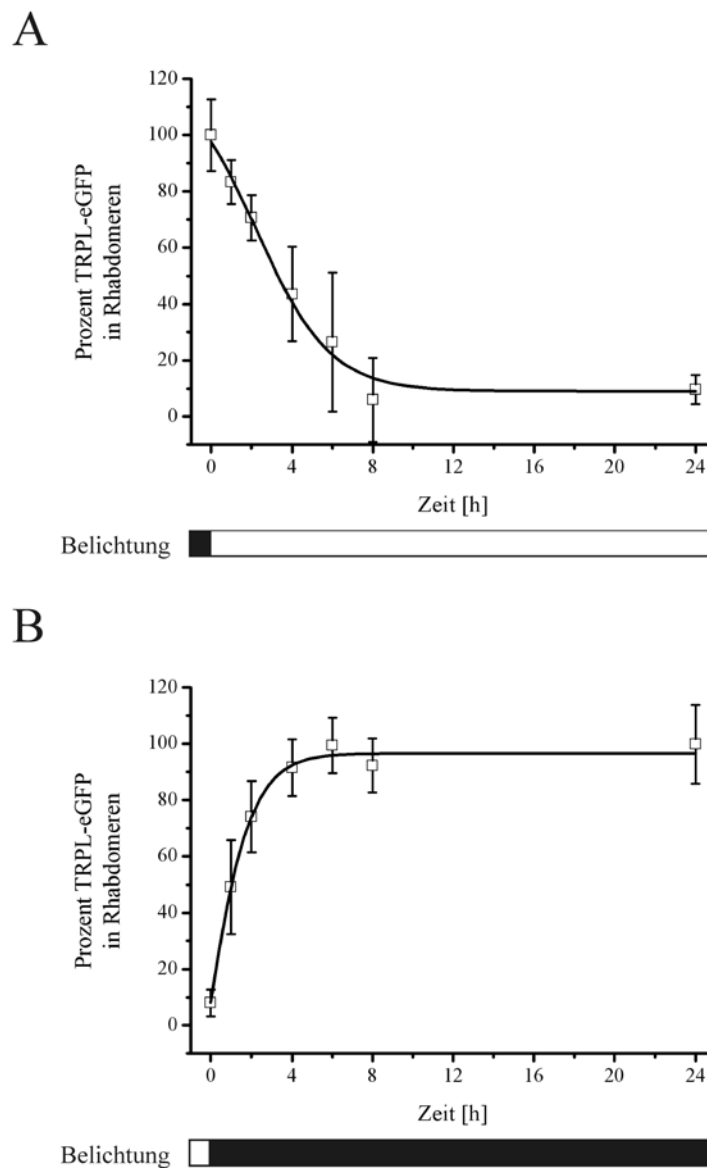


Abb. 4-7 Kinetik der Wanderung von TRPL-eGFP. Zu den angegebenen Zeitpunkten werden Bilder der intakten Augen von *trpl-eGFP*-exprimierenden Fliegen mit der Wasserimmersionstechnik aufgenommen. Ausgehend von diesen Bildern wird der Prozentsatz an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren (bezogen auf den Wert für dunkel gehaltene Fliegen [=100%]) zu unterschiedlichen Zeiten, nachdem die Fliegen von der Dunkelheit ins Licht gesetzt wurden (A) oder *vice versa* (B), errechnet. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens fünf unabhängigen Messungen.

Da sich nicht genau bestimmen lässt, wann genau die Kurve die Sättigung erreicht, wird in Analogie zur Enzymkinetik der Zeitpunkt der halbmaximalen Sättigung als Halbwertszeit angegeben. Die Internalisierung des TRPL-eGFP dauert mit einer Halbwertszeit von ca. 3,25h etwas länger als die Wanderung ins Rhabdomer, welche eine Halbwertszeit von ca. 1h besitzt. Diese längere Zeitdauer ist auch anhand der Kurvenverläufe zu erkennen, da die Kurve der Internalisierung des TRPL-eGFP (Abb. 4-7 A) flacher ist als die Kurve der Wanderung des TRPL-eGFP in die Rhabdomere (Abb. 4-7 B). Der Gehalt an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren fällt von 100% in dunkeladaptierten Fliegen nach Belichtung bis auf ca. 15% nach 8h ab.

4.7 Einfluss von Schlüsselkomponenten der Phototransduktionskaskade auf die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass TRPL-eGFP in *Drosophila* Photorezeptoren funktionelle Ionenkanäle bildet und wie natives TRPL einer lichtabhängigen Wanderung unterliegt. Ist die Fliege dunkeladaptiert, so ist TRPL-eGFP in den rhabdomerischen Membranen lokalisiert. Werden die Fliegen belichtet, so befindet sich der Großteil des TRPL-eGFP in einem Speicherkompartiment im Zellkörper [7], [86]. Um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der dieser Proteintranslokation zugrunde liegt, wurde im Folgenden untersucht, welche Genmutationen die Wanderung beeinflussen. Da die TRPL-eGFP Wanderung lichtabhängig ist, ist es naheliegend, eine Notwendigkeit der an der Phototransduktionskaskade beteiligten Proteine für die Wanderung zu vermuten. Verschiedene Komponenten der Phototransduktionskaskade wurden im Folgenden auf ihren Einfluss hin untersucht. Dabei wurde das *trpl-eGFP* in die betreffenden Mutanten eingekreuzt und anschließend die Lokalisation des TRPL-eGFP anhand der eGFP-Fluoreszenz in dunkel- und orangeflichtadaptierten (im Folgenden kurz als „lichtadaptiert“ bezeichnet) Fliegen bestimmt.

4.7.1 Die lichtabhängige Wanderung von TRPL-eGFP ist abhängig von funktionalem Rhodopsin

Die Aktivierung des Lichtrezeptors Rhodopsin ist der einleitende Schritt der Phototransduktionskaskade. Beim Bestreben herauszufinden, auf welche Weise das Lichtsignal zur Internalisierung des TRPL-eGFP Kanals führen könnte, wurde zunächst untersucht, ob Rhodopsin für die Internalisierung notwendig ist und falls ja, ob die Wanderung des TRPL-eGFP proportional zur Menge an aktiviertem Rhodopsin ist.

Die Abb. 4-8 (C, D) zeigt, dass die Wanderung des TRPL-eGFP in der *ninaE*¹⁷-Mutante, welche kein funktionelles Rhodopsin besitzt [104], [159], gestört ist. Es findet keine Internalisierung auf Belichtung hin statt und das TRPL-eGFP ist sowohl in dunkel- als auch in lichtadaptierten Fliegen stets in den Rhabdomeren lokalisiert [86]. Für dieses Experiment wurden frisch geschlüpfte Fliegen verwendet, da die Rhabdomere sehr schnell degenerieren, wenn kein Rhodopsin vorhanden ist. Dieses Experiment zeigt, dass Rhodopsin für die lichtinduzierte Internalisierung des TRPL-eGFP notwendig ist. Allerdings ist die Anwesenheit von Rhodopsin notwendig für die korrekte Ausbildung der rhabdomerischen Membranen während der Entwicklung der Photorezeptoren [71]. Die Abwesenheit des Rhodopsins in der *ninaE*-Mutante könnte die Wanderung des TRPL-eGFP direkt in seiner Funktion als Lichtrezeptor oder indirekt durch die Degeneration der Photorezeptoren unterbinden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können wurde eine Mutante analysiert, welche ein UV-sensitives Rhodopsin 3 (Rh3) ektopisch in den äußeren Photorezeptorzellen der *ninaE*-Mutante exprimiert [35]. Die Anwesenheit des Rh3 in den Photorezeptorzellen R1-6 rettet den morphologischen Defekt der Rhabdomere, kann aber von langwelligem Licht nicht aktiviert werden [35]. Belichtung mit orangenem Licht resultiert daher in diesen Fliegen nicht in einer Internalisierung des TRPL-eGFP, es bleibt in den Rhabdomeren (Abb. 4-8 E, F). Nach Belichtung dieser Rh3-exprimierenden Fliegen mit UV-Licht wird TRPL-eGFP zumindest teilweise internalisiert (Abb. 4-8 G). Im Gegensatz dazu wird im Wildtyp durch Belichtung mit Orangelicht eine vollständige Internalisierung des TRPL-eGFP ausgelöst (Abb. 4-8 A, B). Daraus resultiert, dass Rhodopsin wohl in seiner Funktion als Lichtrezeptor an der Wanderung des TRPL-eGFP beteiligt ist.

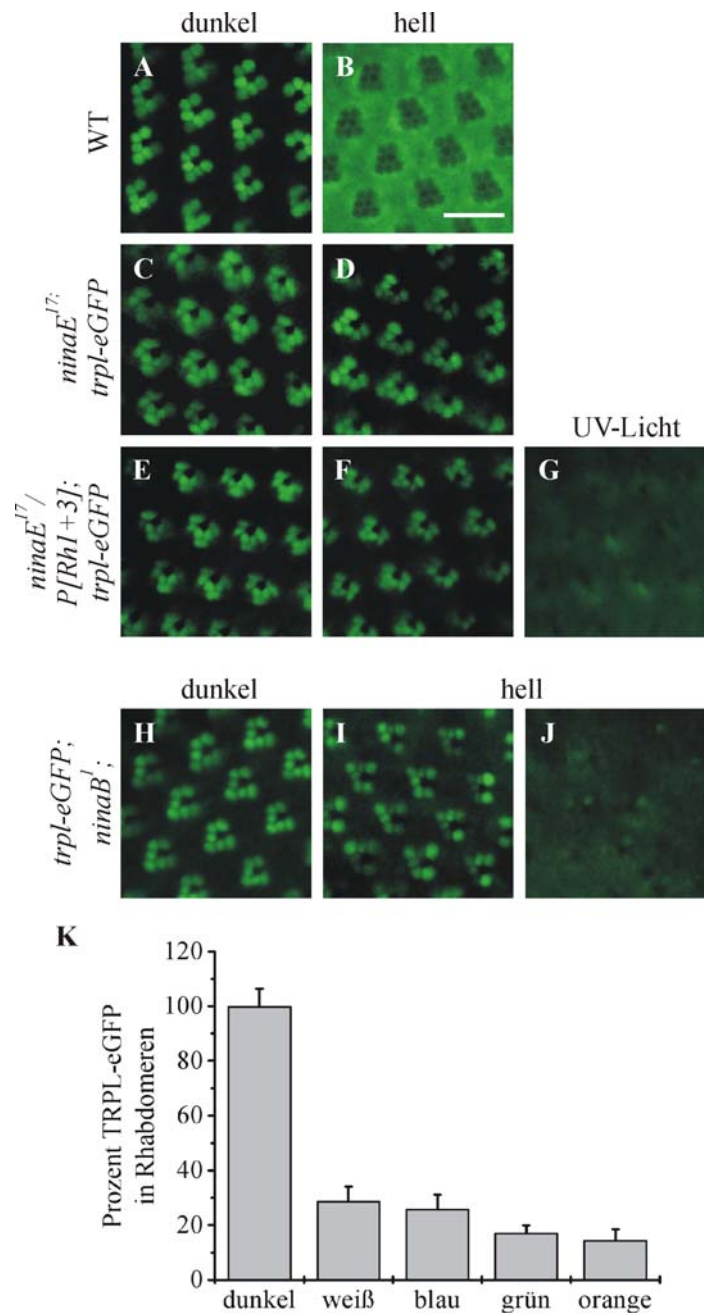


Abb. 4-8 Funktionales Rhodopsin ist essentiell für die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP. Fliegen, welche TRPL-eGFP im Wildtyp-Hintergrund exprimieren (A, B), sowie die Mutanten *yw; ninaE¹⁷; trpl-eGFP* (C, D), *yw; ninaE¹⁷/P[Rh1+3]; trpl-eGFP* (E, F) und *w; trpl-eGFP; ninaB¹* (H-J) werden über Nacht im Dunkeln oder im Orangelicht gehalten. Die *ninaE*-Mutante wird zusätzlich über Nacht im UV-Licht gehalten (G). Repräsentative Bilder der eGFP-Fluoreszenz in intakten Augen sind gezeigt. Bei lichtadaptierten *ninaB*-Mutanten sind

zwei Bilder gezeigt, um die Bandbreite der Internalisierung von TRPL-eGFP aufzuzeigen. Eichstrich 15 μ m. Dunkeladaptierte Fliegen werden über Nacht in weißes, blaues, grünes oder oranges Licht transferiert. Der Prozentsatz an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren wird ermittelt (K). Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten sind gezeigt.

Die Mutante *ninaB*¹ ist nicht in der Lage, den retinalen Chromophor aus Carotinoiden zu bilden, da ihr das entsprechende Enzym zur Spaltung der Carotinoide, die Dioxygenase, fehlt. Sie zeigt eine dramatisch reduzierte Menge an Opsin auf Western Blots [150]. Bei dunkeladaptierten Fliegen ist TRPL-eGFP stets in den Rhabdomeren lokalisiert (Abb. 4-8 H). Allerdings sind variable Phänotypen was die Internalisierung des TRPL-eGFP betrifft zu beobachten (Abb. 4-8 I, J). In einigen Individuen führt Belichtung zu beinahe vollständiger Internalisierung des TRPL-eGFP, wohingegen in anderen Individuen praktisch keine Internalisierung stattfindet. Der Grund für die Variabilität könnten individuell unterschiedlichen Rhodopsinmengen in den einzelnen Fliegen, die aus Carotinoid-unabhängigen Retinalquellen stammen, sein.

Aktiviertes Rhodopsin (im Metarhodopsin-Zustand) wird aus der rhabdomerischen Membran in einem Prozess, welcher die Bildung von Arrestin2 (Arr2)-Metarhodopsin Komplexen und die Bindung an Clathrin-umhüllte Vesikel erfordert, entfernt [3], [33], [67]. Dieser Prozess wird möglicherweise durch Arrestin1 vermittelt [128]. Ein möglicher Mechanismus der Internalisierung des TRPL-eGFP bestünde im Transport zusammen mit aktiviertem Rhodopsin in denselben endozytotischen Vesikeln. Wenn dies der Fall wäre, sollte die Effizienz der Internalisierung von TRPL-eGFP proportional zur Menge an aktiviertem Rhodopsin, welches bei Belichtung entsteht, sein. Die Absorptionseigenschaften von Rhodopsin und Metarhodopsin sind der Gestalt, dass Belichtung mit orangenem Licht einen geringen Anteil (<2%) an Metarhodopsin produziert, wohingegen Belichtung mit grünem oder blauem Licht ungefähr 50% bzw. 70% des Rhodopsins in Metarhodopsin umwandelt [8]. Um herauszufinden, ob die Effizienz der Internalisierung von TRPL-eGFP mit der Menge an Metarhodopsin korreliert, wurden TRPL-eGFP exprimierende Fliegen über Nacht mit orangenem, grünem und blauem Licht belichtet. Wasserimmersionsbilder dieser Fliegen wurden gemacht und hinsichtlich der Lokalisation des TRPL-eGFP ausgewertet (Abb. 4-8 K). Jede dieser Lichtbedingungen resultiert in einer signifikanten Internalisierung des TRPL-eGFP. Dennoch wird die größte Effizienz was die Internalisierung des TRPL-eGFP betrifft durch Belichtung mit orangenem Licht erreicht. Dies spricht eher ge-

gen eine Korrelation zwischen der Internalisierung von TRPL-eGFP und der Internalisierung von Rhodopsin. Diese Effizienz ist der Grund, weshalb bei allen Experimenten in dieser Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, orangenes Licht zur Induktion der Internalisierung des TRPL-eGFP verwendet wird.

4.7.2 Die Rolle der Arrestine bei der lichtabhängigen Wanderung des TRPL-eGFP

In den Photorezeptorzellen von *Drosophila* sind zwei Arrestine, Arrestin1 (Arr1) und Arrestin2 (Arr2), vorhanden. Arr2 spielt eine Rolle bei der Rhodopsin-Inaktivierung [33] und soll die Internalisierung von aktivierten Rhodopsinmolekülen vermitteln [3], [67]. Arrestine sind nicht nur in die Internalisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, sondern auch in die Internalisierung von Frizzled- und TGF- β -Rezeptoren verwickelt [21], [22]. Arr1 ist in den Photorezeptorzellen zu einem wesentlich geringeren Anteil als Arr2 vorhanden und kürzlich konnte gezeigt werden, dass Arr1 die lichtabhängige Endozytose von Rhodopsin vermitteln soll und so der Degeneration der Photorezeptoren entgegenwirken könnte [128]. Es wird postuliert, dass Arr1 und Arr2 unterschiedliche Funktionen haben und Arr2 lediglich für die Rhodopsin-Inaktivierung verantwortlich ist und die Internalisierung der Arr2/Rhodopsin-Komplexe von Arrestin1 vermittelt wird [128]. Der Inaktivierungsdefekt der *arr2*-Mutante wird in der *arr1; arr2*-Doppelmutante verstärkt [33].

Die Untersuchung der TRPL-eGFP Wanderung in der *arr1*-Nullmutante erbringt keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Photorezeptoren (Abb. 4-9 A, B, G) und nur eine moderate Beeinträchtigung der TRPL-eGFP Wanderung kann in der *arr2*-Nullmutante beobachtet werden (Abb. 4-9 C, D, G). Allerdings ist die Internalisierung von TRPL-eGFP in der *arr1; arr2*-Doppelmutante stark inhibiert (Abb. 4-9 E, F, G), in welcher TRPL-eGFP sowohl in dunkel- als auch in lichtadaptierten Fliegen stets in den Rhabdomeren lokalisiert ist. Die Anwesenheit von entweder Arr1 oder Arr2 ist also zumindest für eine partielle Wanderung des TRPL-eGFP ausreichend, wohingegen das Fehlen beider Arrestine eine Wanderung des TRPL-eGFP verhindert. Ob die Wanderung von TRPL-eGFP direkt durch ein Arrestin vermittelt wird oder ob die Funktion des Arrestins für die TRPL-eGFP Wanderung indirekt benötigt wird, z.B. durch die Rolle der Arrestine bei der Termination der Lichtantwort, muss noch ermittelt werden.

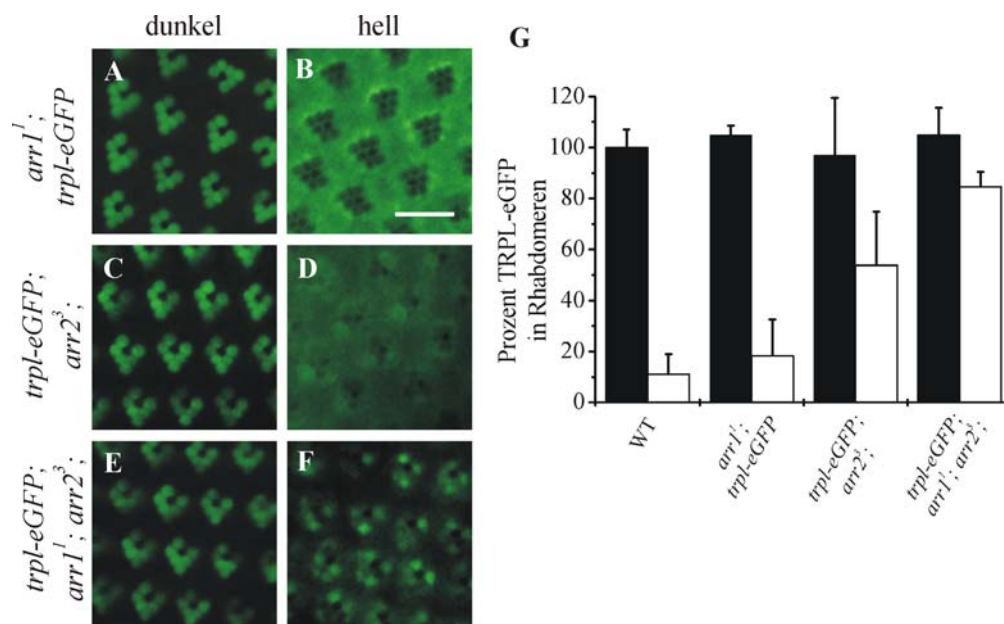


Abb. 4-9 Die Rolle der Arrestine für die Wanderung von TRPL-eGFP. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen der folgenden Arrestin-Mutanten, welche über Nacht im Dunkeln oder im Orangelicht gehalten wurden, sind dargestellt: *arr1¹ cn bw; trpl-eGFP* (A, B), *w; trpl-eGFP; arr2³ st* (C, D), *yw trpl-eGFP; arr1¹ cn bw; arr2³* (E, F). Eichstrich 15µm. Der prozentuale Gehalt an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- (schwarze Balken) und orange-lichtadaptierten Fliegen (weiße Balken) wird quantifiziert (G). Zum Vergleich ist zusätzlich der Wildtyp (aus Abb. 4-8 K) gezeigt. Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten sind gezeigt.

4.7.3 Einfluss der α -Untereinheit des visuellen G-Proteins auf die lichtabhängige Translokation des TRPL-eGFP

Die α -Untereinheit des visuellen G-Proteins ist der Signalvermittler zwischen Rhodopsin und PLC β [7]. Um eine mögliche Erfordernis des heterotrimeren visuellen G-Proteins für die Wanderung des TRPL-eGFP auszutesten, wurde eine hypomorphe Mutante der $G\alpha$ -Untereinheit, *G α ¹*, verwendet. Sie produziert nur ca. 1% der Wildtyp-Menge an $G\alpha$ und zeigt einen dramatischen Verlust (ca. 1000-fach) der Lichtsensitivität [130].

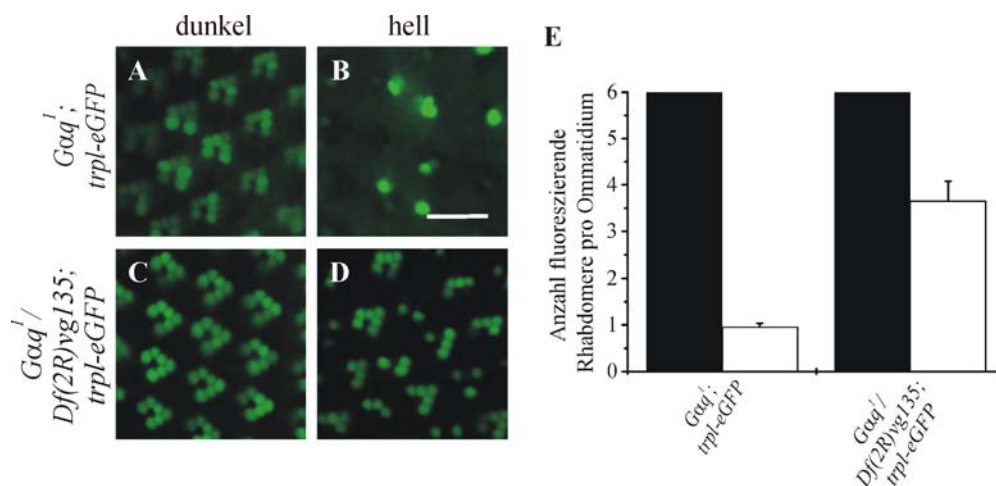


Abb. 4-10 Einfluss von $G\alpha q$ auf die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen der Mutanten $w; G\alpha q^1; trpl-eGFP$ (A, B) und $w; G\alpha q^1/Df(2R)vg135; trpl-eGFP/+$ (C, D), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15 μm . Die Rhabdomere pro Ommatidium von dunkel- (schwarze Balken) und orangeflichadaptierten Fliegen (weiße Balken), die eGFP-Fluoreszenz aufwiesen, wurden ausgezählt (E). Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 23 Ommatidien sind für lichtadaptierte Fliegen gezeigt.

In dieser Mutante wandert das TRPL-eGFP in den meisten Photorezeptorzellen (typischerweise fünf der sechs R1-6 Zellen) in den Zellkörper, wenn die Fliegen lichtadaptiert sind (Abb. 4-10 A, B). Die Quantifizierung erbrachte, dass die Ommatidien im Mittel $0,95 \pm 0,09$ Photorezeptorzellen beinhalten in welchen TRPL-eGFP komplett im Rhabdomer bleibt (Abb. 4-10 E). In dunkeladaptierten Fliegen ist TRPL-eGFP immer in allen 6 Rhabdomeren eines Ommatidiums lokalisiert. Allerdings variiert die Fluoreszenzintensität der Rhabdomere, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Mengen an TRPL-eGFP in verschiedenen Photorezeptorzellen exprimiert werden. Auf dieselbe Art und Weise könnte die Menge an $G\alpha q$ in den einzelnen Photorezeptorzellen der $G\alpha q^1$ -Mutante variieren und so in manchen Zellen unter einen bestimmten Wert fallen, der für die Wanderung des TRPL-eGFP benötigt wird, wohingegen die meisten Zellen noch genügend G-Protein besitzen um die Wanderung des TRPL-eGFP effizient auszulösen. Um diese Hypothese zu testen wurden Fliegen generiert, welche das mutierte $G\alpha q$ -Allel über einer Deletion tragen ($G\alpha q^1/Df(2R)vg135$). Diese Mutante zeigt eine signifikante Reduktion

der Lichtsensitivität im Vergleich zur homozygoten *Gαq*-Mutante [130], was nahelegt, dass die Photorezeptoren dieser Fliege sehr geringe Mengen an *Gαq* exprimieren. In der Mutante *Gαq¹/Df(2R)vg135* ist die Wanderung von TRPL-eGFP in mehr Photorezeptorzellen als in der *Gαq*-Mutante, nämlich im Mittel in $3,65 \pm 0,43$ Photorezeptorzellen pro Ommatidium, inhibiert (Abb. 4-10 C-E). Dies weist darauf hin, dass eine weitere Reduktion der *Gαq*-Menge die Anzahl der Zellen erhöht, in welchen keine Wanderung des TRPL-eGFP mehr stattfindet.

4.7.4 Phospholipase Cβ

Der nächste Schritt in der Phototransduktionskaskade ist die Aktivierung der *norpA*-kodierte Phospholipase Cβ, welche durch die α-Untereinheit des visuellen G-Proteins aktiviert wird. In der Mutante *norpA³⁶*, die fast eine komplette Nullmutante für PLCβ ist, kann keine lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP in den Zellkörper beobachtet werden (Abb. 4-11 A, B).

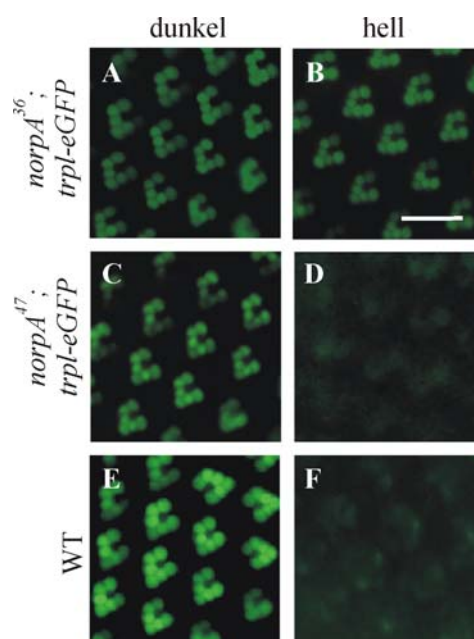


Abb. 4-11 Einfluss der PLCβ auf die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen von rotäugigen Fliegen, die TRPL-eGFP im Wildtyp-Hintergrund exprimieren, sowie in den Augen der Mutanten *w norpA³⁶; trpl-eGFP/+* (A, B) und *norpA⁴⁷; bw/trpl-eGFP; st/+* (rot-

äugige Mutante, C, D), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15µm. Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten sind gezeigt.

In einer anderen *norpA*-Mutante, *norpA*⁴⁷, welche ca. 20% der Menge an PLC des Wildtyps produziert und durch eine Lichtantwort normaler Amplitude aber mit langsamerer Termination charakterisiert ist [27], [110], kann eine Wanderung des TRPL-eGFP vom Rhabdomer zum Zellkörper nach Belichtung beobachtet werden (Abb. 4-11 C, D). Die Lokalisation des TRPL-eGFP in der lichtadaptierten Fliege scheint in diesem Fall nicht dem Wildtyp zu entsprechen. Alle anderen Mutanten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind weißäugig und dementsprechend auch die als Wildtyp bezeichneten Fliegen. Die Mutante *norpA*⁴⁷ bildet eine Ausnahme, sie hat rote Augen, die vom Vorhandensein von Pigmenten herrühren. Die roten Pigmente schirmen das Auge ab und erlauben lediglich einen Blick auf die senkrecht nach oben zeigenden Rhabdomere, nicht aber in die Zellkörper der entsprechenden Photorezeptorzellen. Sie entspricht in der Lokalisation des TRPL-eGFP den rotäugigen Wildtyp-Fliegen (Abb. 4-11 E, F). Aufgrund der roten Augenfarbe konnte bei der *norpA*⁴⁷-Mutante keine quantitative Auswertung durchgeführt werden. Die Tatsache, dass die Internalisierung des TRPL-eGFP in der Mutante *norpA*³⁶ nicht stattfindet, in der Mutante *norpA*⁴⁷ mit ihrem höheren Gehalt an PLC β aber durchaus, weist darauf hin, dass, ähnlich wie beim G-Protein, eine deutliche Reduktion der PLC benötigt wird, um die Wanderung von TRPL-eGFP zu blockieren.

4.7.5 Der Ionenkanal TRP ist essentiell für die Translokation des TRPL-eGFP: Proteine, die die Funktion von TRP beeinflussen

In den Photorezeptoren von *Drosophila* werden zwei Kationenkanäle exprimiert, TRP und TRPL. Diese Kanäle werden durch die visuelle Transduktionskaskade geöffnet und sind verantwortlich für die Generierung des Rezeptorpotentials. Der Hauptanteil liegt dabei auf dem TRP-Kanal. Um zu überprüfen, ob die Wanderung des TRPL-eGFP durch den zweiten Kanal TRP beeinflusst wird, wurde die Wanderung in der TRP-Nullmutante *trp*⁹ analysiert. Die Abwesenheit von TRP in dieser Mutante resultiert in einem kompletten Verlust der Wanderung von TRPL-eGFP vom Rhabdomer in den Zellkörper (Abb. 4-12 A, B). TRPL-eGFP ist sowohl in dunkel- als auch in lichtadaptierten Fliegen immer in den Rhabdomeren lokalisiert. Die quantitative Auswertung bestätigt dies. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Menge an

TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- und lichtadaptierten Fliegen (Abb. 4-12 I). Im Vergleich zum Wildtyp beträgt der Anteil an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren der *trp*⁹-Mutante bei beiden Lichtbedingungen jeweils ca. 100% und entspricht damit dem dunkeladaptierten Wildtyp.

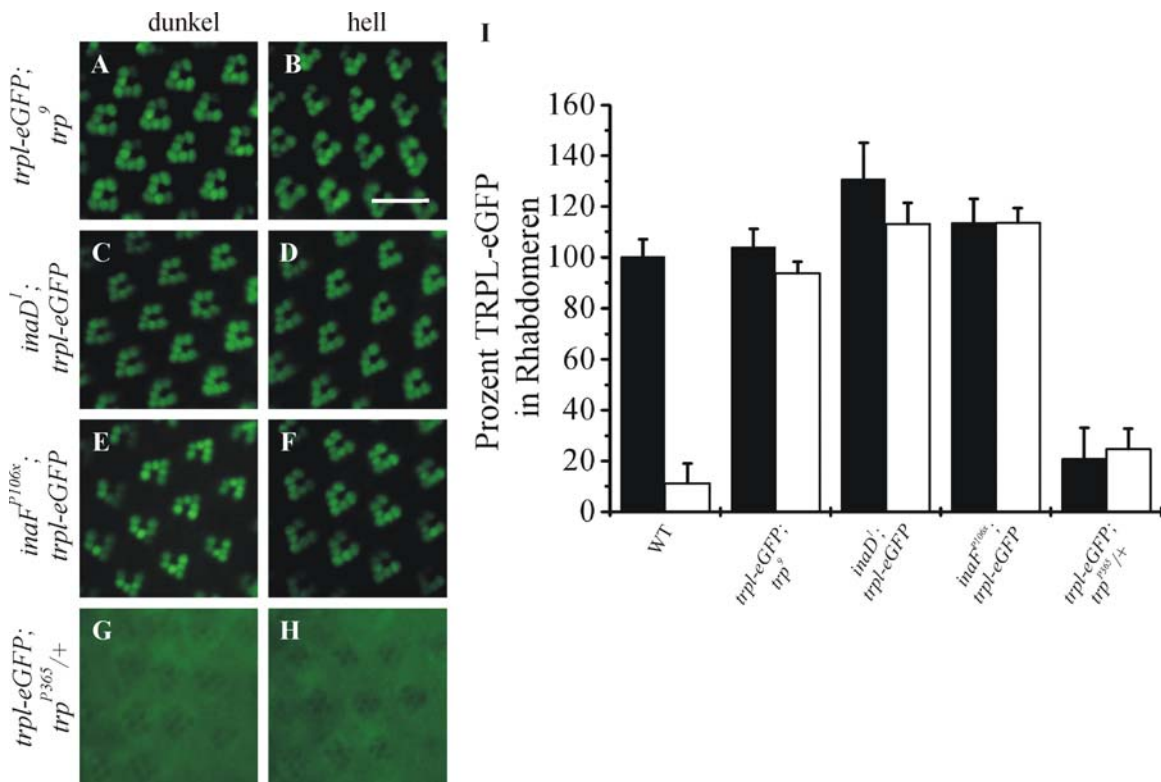


Abb. 4-12 Einfluss von TRP und Proteinen, die die Funktion von TRP beeinflussen auf die lichtabhängige Wanderung des TRPL-eGFP. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen der Mutanten *yw; trpl-eGFP; trp*⁹ (A, B), *yw; inaD*¹ *cn bw; trpl-eGFP* (C, D), *w inaF*^{P106x}; *trpl-eGFP/+* (E, F), *w; trpl-eGFP/+; trp*^{P365/+} (G, H), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15µm. Der prozentuale Gehalt an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- (schwarze Balken) und orangelichtadaptierten Fliegen (weiße Balken) wird quantifiziert (I). Zum Vergleich ist zusätzlich der Wildtyp (aus Abb. 4-8 K) gezeigt. Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten sind gezeigt.

INAD ist ein Protein mit fünf PDZ-Domänen, das als Gerüstprotein für die Ausbildung des Signalkomplexes fungiert [60] [148]. Fehlt das INAD wie in der Mutante *inaD¹*, so wird der Ionenkanal TRP zwar nach seiner Synthese von INAD unabhängig in die Rhabdomere transportiert, wird aber dann nicht von INAD im Rhabdomer verankert [148]. Das hat zur Folge, dass das TRP außerhalb der Rhabdomere degradiert wird [147]. Für die Experimente wurden Fliegen in einem Alter von zwei bis vier Tagen verwendet. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *inaD¹*-Mutante in diesem Alter durchaus noch nachweisbare Mengen an TRP besitzt, allerdings ist es nur an der Basis der Rhabdomere bzw. außerhalb der Rhabdomere in deren unmittelbarer Nähe lokalisiert [86]. In der Mutante *inaD¹* kann eine Inhibierung der Internalisierung von TRPL-eGFP beobachtet werden (Abb. 4-12 C, D). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion des TRP als Kationenkanal notwendig für die TRPL-eGFP Wanderung sein könnte und nicht nur dessen bloße Anwesenheit. INAD ist nicht nur essentiell für eine anhaltende Lokalisation von TRP in den Rhabdomeren, sondern auch von der PLC. Folglich beeinflusst die Abwesenheit von INAD zwei Proteine, welche essentiell für die Wanderung des TRPL-eGFP sind und daher ist es nicht verwunderlich, dass seine Abwesenheit die Wanderung inhibiert. Auch in dieser Mutante besteht kein signifikanter Unterschied in der Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- und lichtadaptierten Fliegen (Abb. 4-12 I). Im Vergleich zum Wildtyp bewegt sich der Anteil an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren der *inaD¹*-Mutante bei beiden Lichtbedingungen jeweils um 120%.

INAF ist ein im Auge stark angereichertes Protein, welches für die Funktion des TRP-Kanals benötigt wird [79]. Eine Nullmutation im *inaF*-Gen reduziert signifikant die Menge an TRP und beeinträchtigt darüberhinaus spezifisch die Funktion des TRP-Kanals, so dass dessen Aktivität fast ausgeschaltet ist. Die Abb. 4-12 E, F zeigt, dass die TRPL-eGFP Wanderung in dieser Mutante ebenfalls nicht mehr stattfindet. Dies bestätigt, dass die Funktion des TRP für die Wanderung von TRPL-eGFP benötigt wird. Ein signifikanter Unterschied in der Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- und lichtadaptierten Fliegen besteht in dieser Mutante ebenfalls nicht und ähnlich wie bei der *inaD*-Mutante liegt auch hier der Anteil an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren bei beiden Lichtbedingungen im Vergleich zum Wildtyp bei ca. 120% (Abb. 4-12 I).

Weitere Unterstützung für die Hypothese, dass die Funktion des TRP für die Wanderung des TRPL-eGFP benötigt wird, kommt von Untersuchungen der Mutante *trp^{P365}*, die konstitutiv aktive TRP-Kanäle exprimiert [156]. Die Kanäle sind unabhängig von den Lichtbedingungen der Umgebung ständig geöffnet und so strömt ununterbrochen Ca^{2+} in die Photorezeptorzellen ein. Die Photorezeptoren der *trp^{P365}*-Mutante zeigen eine schnelle und schwerwiegende Degeneration in homozygoten Fliegen, welche auf den unkontrollierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zurückzuführen ist [151], [156]. Heterozygote Mutanten, welche in Dunkelheit gehalten werden, behalten intakte Photorezeptoren für bis zu vier Tage nach dem Schlüpfen. Die Lokalisation des TRPL-eGFP wurde daher im heterozygoten *trp^{P365/+}*-Hintergrund untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass TRPL-eGFP sowohl in licht- als auch in dunkeladaptierten Fliegen stets außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper lokalisiert ist (Abb. 4-12 G, H). Es besteht auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied in der Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- und lichtadaptierten Fliegen, allerdings entspricht hier der Anteil an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren bei beiden Lichtbedingungen mit ca. 20% dem lichtadaptierten Wildtyp (Abb. 4-12 I). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch eine lichtunabhängige Aktivierung von TRP zu einer Lokalisation des TRPL-eGFP im Zellkörper führt.

4.8 Mögliche zellbiologische Transportmechanismen

Um einen Einblick in den zellbiologischen Mechanismus, welcher der Wanderung von TRPL unterliegen könnte, zu bekommen, wird die Wanderung des TRPL-eGFP in zwei Mutanten, die Transportmechanismen betreffen, und zwar in der *shi*-Mutante und der *ninaC*-Mutante untersucht. *Shi* kodiert für ein Dynamin, welches für das Abschnüren von Vesikeln von der Membran verantwortlich ist. Die temperatursensitive Mutante *shi^{ts1}* ist nicht in der Lage, synaptische Vesikel zu recyceln, wenn sie bei der restriktiven Temperatur von mindestens 29°C gehalten wird. Die Fliegen werden bei dieser Temperatur paralysiert. Wird diese Mutante bei einer Temperatur von 18°C gehalten, so entspricht sie dem Wildtyp und dient als interne Kontrolle. Bei dieser Temperatur findet eine dem Wildtyp entsprechende Wanderung des TRPL-eGFP statt (Abb. 4-13 A, B). Die Wanderung von TRPL-eGFP wird in der *shi^{ts1}*-Mutante auch bei der restriktiven Temperatur von 30°C nicht beeinflusst (Abb. 4-13 C, D), was darauf hinweist, dass der Internalisierungsmechanismus von TRPL-eGFP Dynamin-unabhängig ist. Da das TRPL-eGFP in dieser Mutante unabhängig von der Temperatur wandert besteht hier wie beim Wildtyp ein

signifikanter Unterschied in der Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren von dunkel- und lichtadaptierten Fliegen (Abb. 4-13 G). Die Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren in dunkeladaptierten Fliegen liegt jeweils bei etwa 100% und entspricht dem dunkeladaptierten Wildtyp, in lichtadaptierten Fliegen befindet sich jeweils ca. 15% des TRPL-eGFP in den Rhabdomeren, was dem lichtadaptierten Wildtyp entspricht.

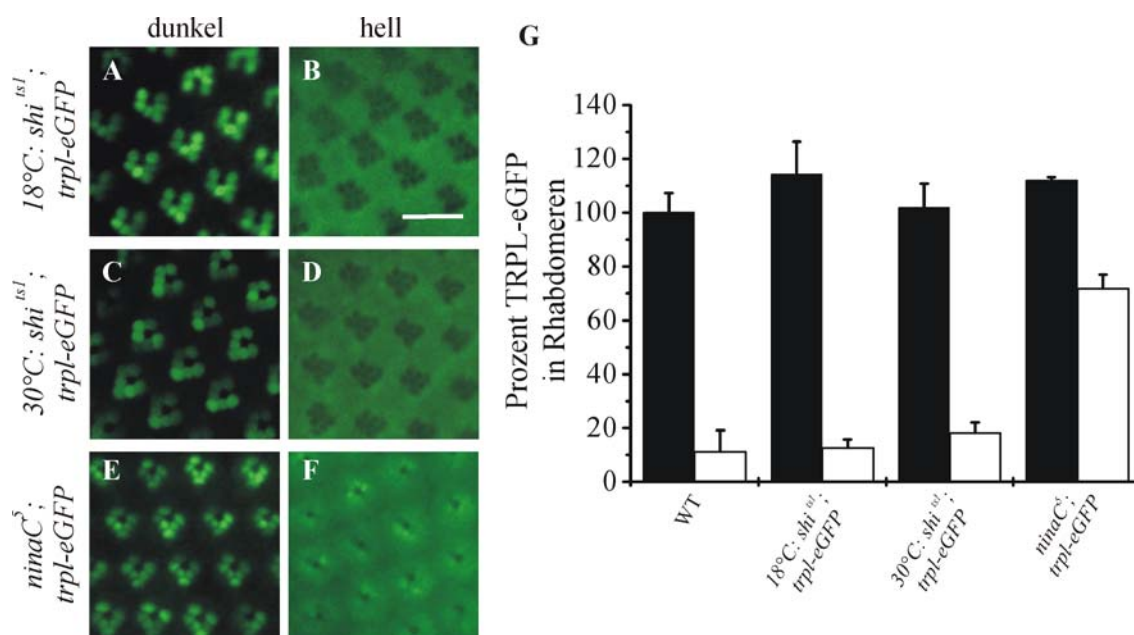


Abb. 4-13 Die TRPL-eGFP Wanderung ist Dynamin-unabhängig und wird vom unkonventionellen Myosin III, NINAC, beeinflusst. Die temperatursensitive Mutante *w shi^{ts1}; trpl-eGFP/+* (A, B) wird bei 29°C dunkel- bzw. orangelichtadaptiert. Die Lokalisation des TRPL-eGFP entspricht der im Wildtyp. In der Myosin III-Mutante *w; ninaC⁵; trpl-eGFP* (C, D) ist die Internalisierung des TRPL-eGFP, nicht aber der Transport vom Zellkörper zu den Rhabdomeren teilweise gestört. Eichstrich 15µm. Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 5 Experimenten sind gezeigt.

Das *ninaC*-Gen in *Drosophila* kodiert für zwei photorezeptorspezifische Proteine (p132 und p174), die beide aus einer N-terminalen Proteinkinasedomäne und einer Domäne mit Homologie zur Köpfchenregion der schweren Myosinkette bestehen [97]. Diese unterscheiden sich in der Länge des C-Terminus. NINAC wird daher als unkonventionelles Myosin bezeichnet. Obwohl die Funktionen vieler Proteinkinasen und Myosine beschrieben sind, ist die physiologi-

sche Rolle von NINAC noch nicht eindeutig geklärt. Der Myosindomäne wird eine Funktion in der Phototransduktion und im Erhalt der Rhabdomerstruktur zugeschrieben [119]. Die *ninaC⁵*-Mutante ist eine Nullmutante für das unkonventionelle Myosin III. In dunkeladaptierten Fliegen dieser Mutante ist das TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert. Belichtung dieser Mutante mit orangem Licht resultiert lediglich in partieller Internalisierung des Ionenkanals (Abb. 4-13 E, F). Diese partielle Internalisierung spiegelt sich auch in der quantitativen Auswertung wider (Abb. 4-13 G). Die Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lichtadaptierter Fliegen liegt bei etwa 70% und liegt damit zwischen den Werten des Wildtyps, die für dunkel- und lichtadaptierte Fliegen errechnet wurden. Die Menge an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen entspricht mit ca. 100% dem dunkeladaptierten Wildtyp. Obwohl der prozentuale Gehalt an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lichtadaptierter Fliegen in dieser Mutante nicht auf dasselbe Niveau wie im Wildtyp absinkt, besteht doch ein signifikanter Unterschied zwischen dunkel- und lichtadaptierten Fliegen. Es wird also durchaus ein gewisser Teil des TRPL-eGFP internalisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass NINAC nicht für die Einschleusung von TRPL-eGFP in die rhabdomerische Membran benötigt wird. Diese Mutation beeinflusst jedoch in gewisser Weise die Internalisierung des TRPL-eGFP. Da Myosin III nur zum Plus-Ende der Aktinfilamente hin transportiert und dieses zur Spitze der Mikrovilli hin orientiert ist [76], sollte ein direkter Effekt dieser Mutation auf den Transport des TRPL-eGFP eigentlich die Einschleusung in die Membran beeinflussen und nicht die Internalisierung.

4.9 Mutagenese-Screen

Zur Identifizierung neuer Proteine, die für die Translokation von TRPL-eGFP eine Rolle spielen, wurde ein genetischer Screen durchgeführt, wobei *trpl-eGFP* als Reporter gen genutzt wird. Dabei wurden die Fliegen mit dem chemischen Mutagen EMS (Ethylmethylsulfonat) gefüttert, welches durch Methylierung der DNA Punktmutationen erzeugt. Entstehen hierbei *missense* oder *nonsense* Mutationen so kann dies die Genfunktion zerstören. Die Häufigkeit mit der ein Gen mutiert werden kann hängt von der Größe der kodierenden Regionen und der Anzahl der darin enthaltenen kritischen Aminosäuren ab [140].

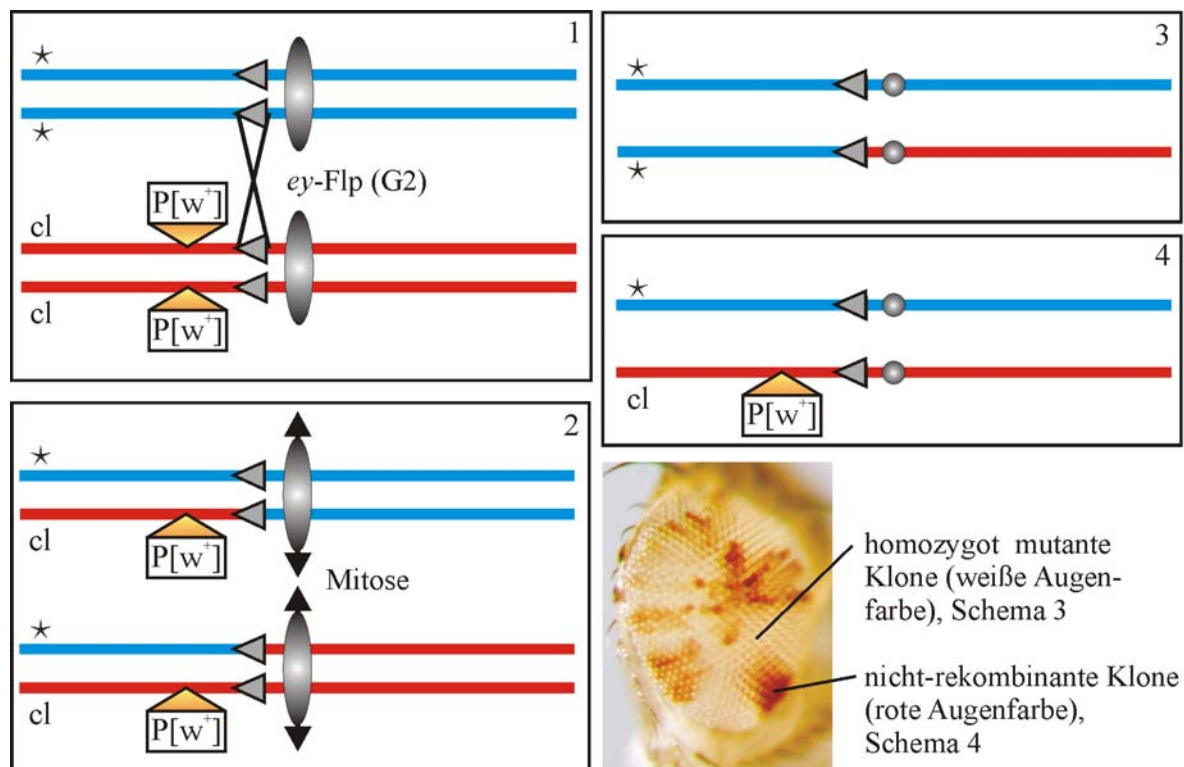


Abb. 4-14 Flp/FRT System: Induktion von Klonen im Auge mit Hilfe der *eyFlp* Technik.

Die Flp Rekombinase wird unter der Kontrolle des *eyeless* enhancers exprimiert. Durch mitotische Rekombination werden bereits in der F1-Generation homozygot mutante Klone erzeugt. Stern: induzierte Mutation, *cl*: *cell lethal*-Mutation, *P[w⁺]*: *white*-Markergen. 1: diploide Zelle vor der Rekombination, 2: diploide Zelle nach der Rekombination, 3 und 4: haploide Zellen nach der Zellteilung.

Mittels des Flp/FRT Systems (Abb. 4-14) können schon in der F1-Generation mitotische Klone erzeugt werden, die homozygot hinsichtlich des mutierten Gens in einem heterozygoten Hintergrund sind, so genannte Mosaik-Fliegen [13], [140], [144]. Die Flp Rekombinase, welche ursprünglich aus der Hefe stammt, vermittelt sehr effizient eine ortsspezifische Rekombination zwischen FRT- (*Flp recombinase target*) Sequenzen bei *Drosophila* [37], [38]. Diese Flp-vermittelte mitotische Rekombination wird genutzt, um mitotische Klone zu erzeugen. Dies verlangt die Verwendung von Fliegen mit transgenen FRT-Sequenzen an identischen Positionen der homologen Chromosomen [37].

Verfeinerte Flp/FRT Screens kombinieren gewebspezifische Expression der Rekombinase mit der Selektion für homozygot mutante Klone. Für den Screen nach Defekten in der Translokation des TRPL-eGFP wurde das System so modifiziert, dass in einem ansonsten heterozygoten Organismus homozygote Klone im Auge vorhanden sind, die anhand der Augenfarbe selektiert werden können (siehe Abb. 4-14). Die Flp Rekombinase wird dabei spezifisch in der sich entwickelnden Augenimaginalscheibe unter der Kontrolle des *eyeless* enhancers exprimiert (eyFlp Technik [102]). Das nicht-mutierte FRT-Chromosom (Abb. 4-14, rot dargestellt) ist durch ein distales *white*-Markergen ($P[w^+]$), welches eine rote Augenfarbe verursacht, markiert und enthält zusätzlich eine *cell lethal*-Mutation. Die nicht-mutanten homozygoten Klone, die zwei *cell lethal*-Allele tragen, werden durch diese rezessive *cell lethal*-Mutation auf den FRT-Chromosomen entfernt [102].

Im Gegensatz zu traditionellen Screens, welche mindestens 3 Generationen erfordern um rezessive Mutationen auf Autosomen zu identifizieren, ist mit dem Einsatz des Flp/FRT Systems die Identifikation der Mutationen schon in der F1-Generation möglich, was eine enorme Zeitersparnis darstellt. Ein weiterer großer Vorteil dieses Systems ist, dass auch homozygot lethale Mutationen erfasst werden, da lediglich Klone im Auge der Fliegen homozygot für die betreffende Mutation sind und der Rest des Tieres ist heterozygot. EMS induziert Punktmutationen häufig nur auf einem Chromosomenarm und nicht wie Röntgenstrahlung auf beiden homologen Chromosomenarmen. Daher tragen nicht alle Nachkommen in der F2-Generation die entsprechende Mutation.

4.9.1 Herstellung der für den Mutagenese-Screen benötigten Mutanten

Die Ausgangsfliegen, welche für die Mutagenese benötigt wurden, sind speziell für diesen Screen angepasst und wurden mittels Kreuzungen hergestellt. Standardmäßig werden X-chromosomale Flp-Insertionen und FRT-Sequenzen auf den Autosomen für einen derartigen Mutagenese-Screen verwendet. Diese Stämme mit Flp und FRT-Elementen auf unterschiedlichen Chromosomen sind in der Regel stabil.

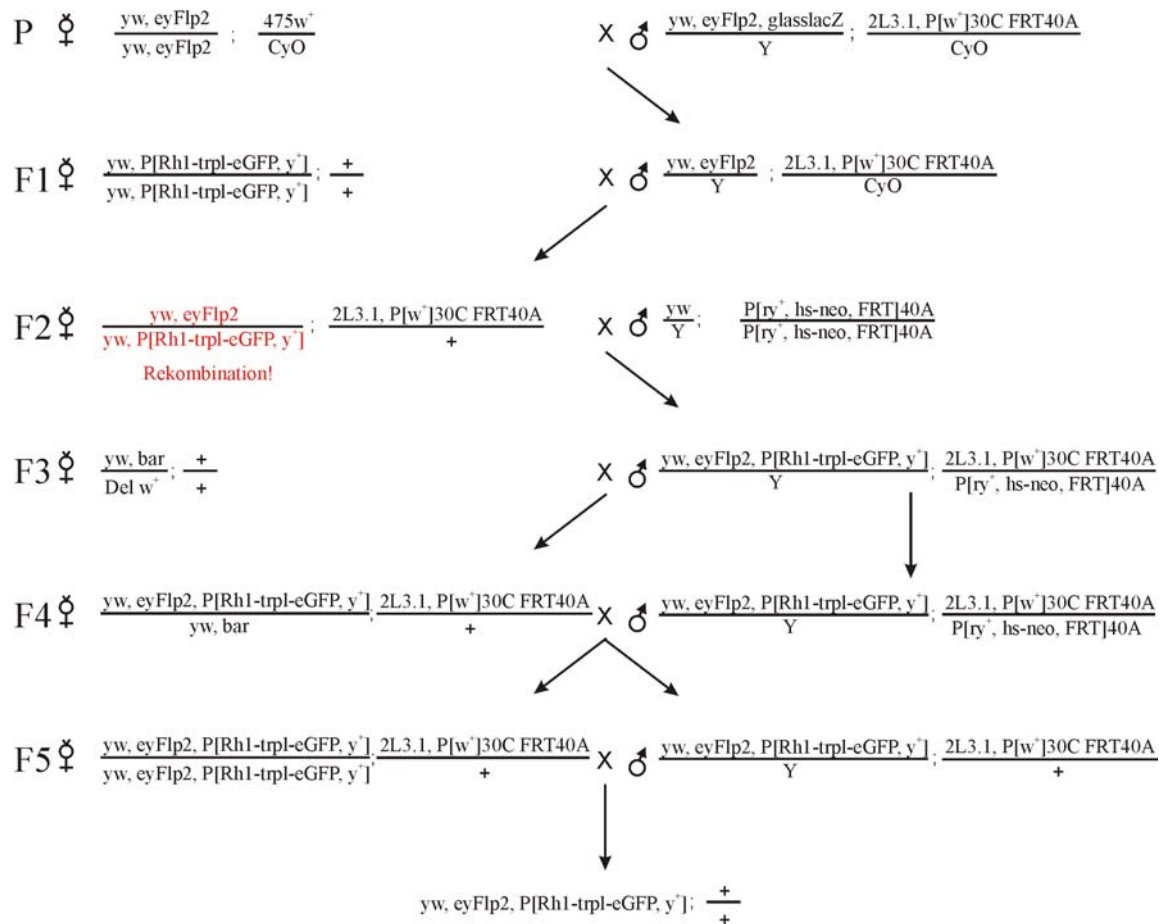


Abb. 4-15 Kreuzungsschema der Rekombination von $P[Rh1-trpl-eGFP, y^+]$ auf das X-Chromosom, auf welchem die Flipase lokalisiert ist. Verwendete Stämme sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Bei dem Screen, der in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wird ein TRPL-eGFP Reporter-genkonstrukt zur einfachen Visualisierung der Wanderung von TRPL-eGFP eingesetzt. Dieses wurde auf das X-Chromosom, auf welchem sich auch die Flipase befindet, rekombiniert (Abb. 4-15). Die rekombinierten Fliegen (Abb. 4-15, Männchen in F3) wurden anhand ihrer Mosaikaugen, die nur dann zustande kommen, wenn die Flipase vorhanden und aktiv ist, sowie anhand der eGFP-Fluoreszenz selektiert. Zur Induktion der mitotischen Rekombination mussten diese Fliegen mit FRT-Elementen an definierten Stellen ausgestattet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Screen für die Chromosomenarme 2L und 3R durchgeführt, also mussten FRT-Elemente, welche auf den entsprechenden Chromosomenarmen inserieren, aus-

gewählt werden. Die FRT-Elemente FRT40A und FRT82B wurden für den Screen der Chromosomenarme 2L bzw. 3R ausgewählt [82]. Die Abb. 4-16 zeigt beispielhaft das Kreuzungsschema für die Ausstattung des Chromosomenarmes 2L mit den entsprechenden FRT-Elementen. Für den Chromosomenarm 3R wurde entsprechend verfahren.

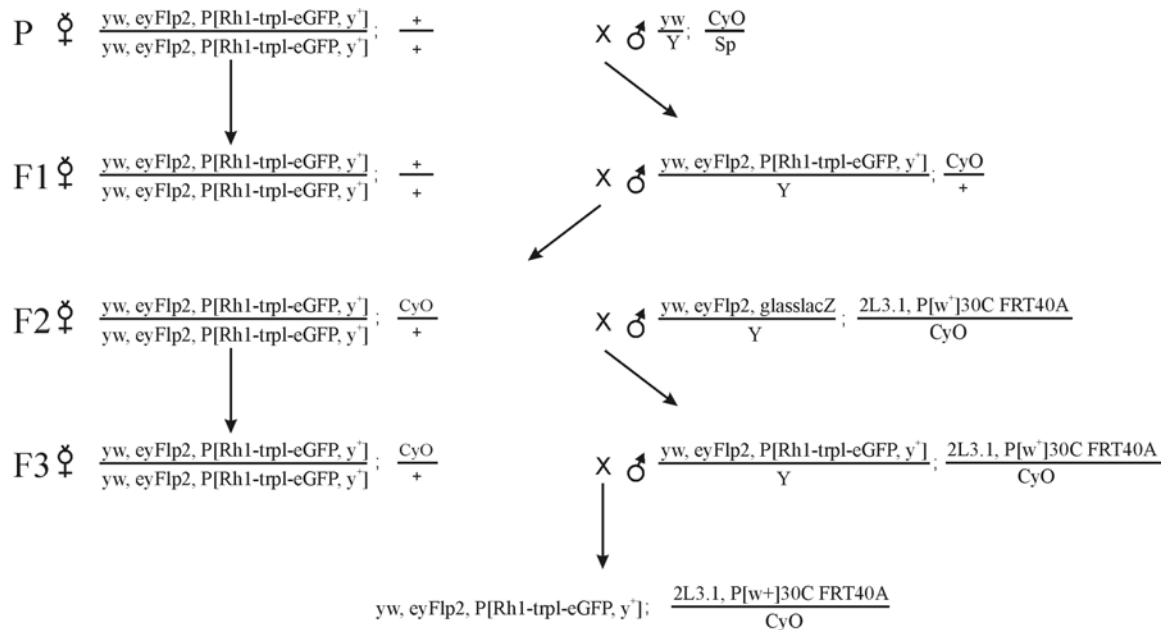


Abb. 4-16 Exemplarisches Kreuzungsschema für die Ausstattung des Chromosomenarmes 2L mit FRT-Elementen. Verwendete Stämme sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Die resultierenden Stämme wurden als Gf¹ 209 (Chromosomenarm 2L) und Gb¹ 215 (Chromosomenarm 3R) bezeichnet und sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Die Stämme 5615 und 214, deren Männchen mutagenisiert wurden, tragen nur die entsprechenden FRT-Elemente, besitzen aber weder eine eyFlp noch das TRPL-eGFP. Sie wurden vom Bloomington Stock Center (Stamm 5615) bzw. von Prof. Ernst Hafen (Universität Zürich, Stamm 214) bezogen. Vor der Durchführung der Mutagenese wurden die Stämme daraufhin getestet, ob bei entsprechender Kreuzung in der F1-Generation Fliegen mit Mosaikaugen vorhanden sind (Kreuzung entspricht dem Schema in Abb. 4-17). Dies war bei allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme der Fall.

Ein exemplarisches Bild eines solchen Mosaikauges ist in Abb. 4-14 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Anteil an homozygot mutanten Klonen (weiße Augenfarbe) deutlich höher ist als der Anteil an nicht-rekombinanten Klonen (rote Augenfarbe). Dies zeugt von einer hohen Effizienz der *eyFlp*.

4.9.2 Übersicht über den Ablauf des Mutagenese-Screens

Für jeden Chromosomenarm wurden die Fliegen in mehreren Ansätzen mutagenisiert. Pro Experiment wurden 550-1000 Männchen, welche homozygot für das FRT-Chromosom (rezessive Markierung durch *w⁻*) sind, mutagenisiert (siehe Kapitel 3.2.7.2). Üblicherweise wurden die Männchen dazu mit EMS behandelt und *en masse* mit Weibchen, die eine *eyFlp2* sowie ein FRT-Chromosom mit einem distalen *white*-Markergen tragen, gekreuzt. Das entsprechende Kreuzungsschema, exemplarisch für den Chromosomenarm 2L, ist in Abb. 4-17 dargestellt.

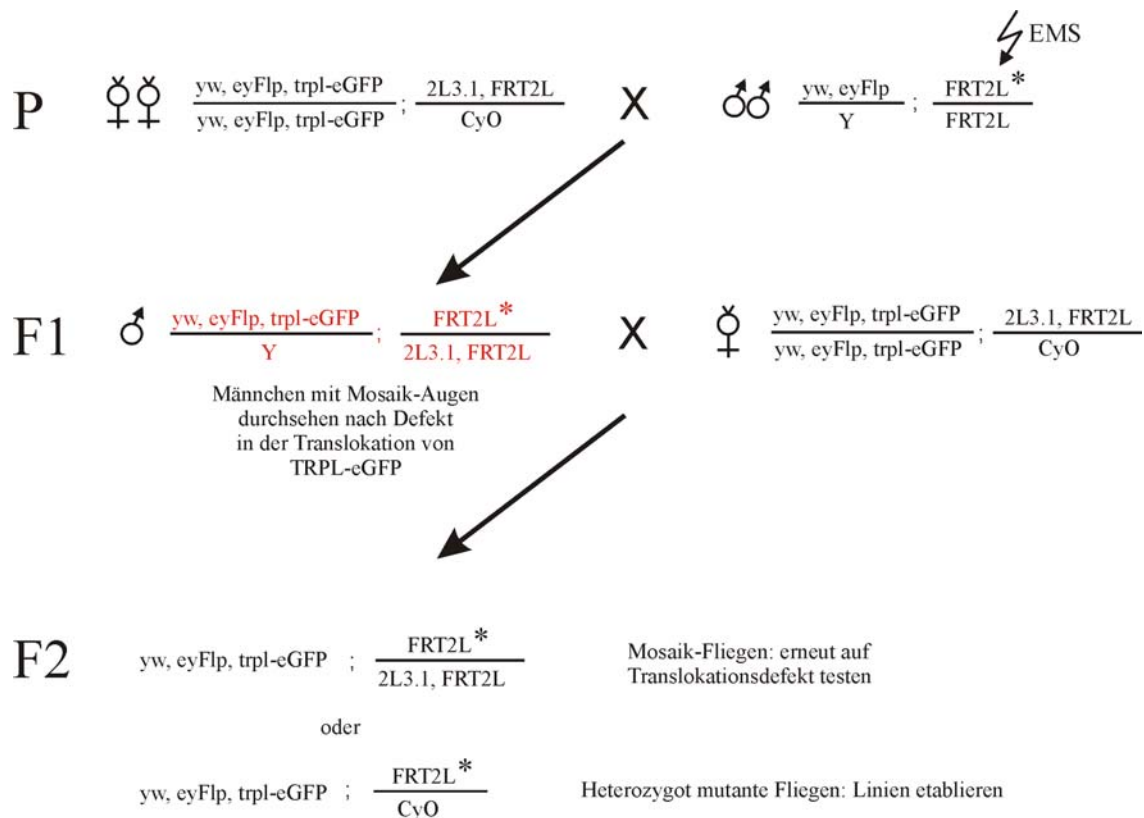


Abb. 4-17 Exemplarisches Kreuzungsschema für den Screen des Chromosomenarms 2L. Männchen, die ein rezessiv markiertes FRT Chromosom und die *eyFLP* tragen werden mit EMS gefüttert und anschließend *en masse* mit Weibchen gekreuzt,

welche ebenfalls die *eyFLP* und ein FRT Element tragen, sowie das Reporter-gen *trpl-eGFP*. Die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung mit Mosaikaugen werden nach einem Defekt in der Wanderung des TRPL-eGFP durchgemustert. Die Männchen der F1-Generation mit interessantem Phänotyp werden mit den entsprechenden Weibchen rückgekreuzt. Die Mosaikfliegen der F2-Generation werden erneut durchgemustert und es werden stabile Linien etabliert.

Entsprechend wurde auch mit dem Chromosomenarm 3R verfahren. Die Flipase ist während der Augenentwicklung unter der Kontrolle des *eyeless* enhancers aktiv und vermittelt spezifisch und hocheffizient die mitotische Rekombination zwischen den FRT-Elementen im sich entwickelnden Komplexauge. Die entsprechenden adulten Fliegen der F1-Generation besitzen daher Zellklone im somatischen Augengewebe, die homozygot für den mutagenisierten FRT-Chromosomenarm sind (Abb. 4-14 Schema 3). Männchen der F1-Generation wurden anhand der Pseudopupille auf einen Defekt in der TRPL-eGFP Wanderung durchsucht. War bei licht- und dunkeladaptierten Fliegen stets eine grün fluoreszierende Pseudopupille vorhanden, so wurde von einem Wanderungsdefekt ausgegangen. Es wurden nur die Männchen der F1-Generation verwendet, weil die Weibchen heterozygot für die Flipase und das *trpl-eGFP* Markergen auf dem X-Chromosom sind. Dieses essentielle X-Chromosom geht bei der folgenden Kreuzung statistisch bei 50% der Männchen und 25% der Weibchen verloren. Die Männchen der F1-Generation mit Wanderungsdefekt wurden einzeln mit den entsprechenden Weibchen rückgekreuzt und die Nachkommen wurden erneut, diesmal mit der Wasserimmersions-Technik, auf den Wanderungsdefekt hin überprüft. Dieses erneute Durchmustern ist unerlässlich, da EMS oftmals nur auf einem der beiden homologen Chromosomenarme eine Punktmutation induziert, und aus diesem Grund nicht alle Nachkommen die Mutation tragen. Die Tabelle 4-1 bietet eine Übersicht über den gesamten Screen. Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nahezu 5000 Fliegen mutagenisiert und über 5300 Männchen der F1-Generation mit Mosaikaugen wurden auf einen Defekt in der Wanderung des TRPL-eGFP durchgemustert. Von den zunächst anhand der Pseudopupille isolierten potentiellen Mutanten stellten sich 12,5% nach erneutem Durchmustern mit Hilfe der Wasserimmersionstechnik als stabile Mutanten heraus.

Tabelle 4-1: Übersicht über den Screen der Chromosomenarme 2L und 3R. Die Prozentzahlen in der letzten Spalte geben den Anteil der Mutanten an den zunächst isolierten potentiellen Mutanten an.

	Chromosomenarm 2L	Chromosomenarm 3R	Gesamt
Anz. der mutagenisierten Männchen	3470	1520	4990
Anz. der F1-Männchen mit Mosaikaugen	3288	2058	5346
Anz. der isolierten potentiellen Mutanten	37	11	48
Anz. der erneut positiv getesteten Mutanten	1 (2,7%)	5 (45,5%)	6 (12,5%)

Beim ersten Durchmustern anhand der Pseudopupille wurden auch solche Fliegen als potentielle Mutanten identifiziert, bei denen die Prognose anhand der Pseudopupille nicht eindeutig war. Sie wurden trotzdem weitergekreuzt und in der nächsten Generation mit der wesentlich genaueren Methode der Wasserimmersionsmikroskopie erneut untersucht. Hier zeigte sich dann oft, dass TRPL-eGFP doch zumindest einer teilweisen Wanderung unterlag. Es wurden allerdings nur diejenigen Stämme weiterpropagiert, welche in der Wasserimmersion eine vollständige Inhibition der TRPL-eGFP Wanderung aufwiesen. Letztlich gingen aus den beiden Screens sechs stabile Mutanten hervor, eine mit Mutation auf dem Chromosomenarm 2L und fünf mit Mutationen auf dem Chromosomenarm 3R.

4.9.3 Charakterisierung der Mutante NM(2L)4.52

Die Mutante NM(2L)4.52 ist aus dem Mutagenese-Screen hervorgegangen und trägt die Mutation auf dem Chromosomenarm 2L. Selektiert wurde die Mutante zunächst anhand der Pseudopupille. Ist die TRPL-eGFP Wanderung inhibiert, so ist bei dunkel- und lichtadaptierten Fliegen eine grün fluoreszierende Pseudopupille zu sehen. Diese kommt durch die Lokalisation des TRPL-eGFP in den Rhabdomeren zustande.

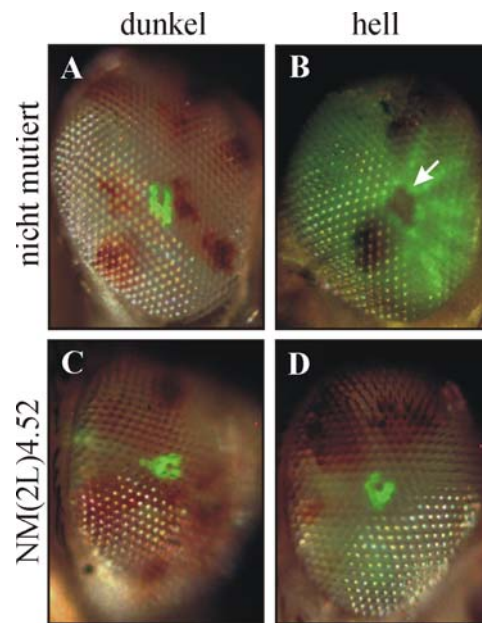


Abb. 4-18 Die Mutante NM(2L)4.52 zeigt einen TRPL-eGFP Wanderungsdefekt. Gezeigt sind die Pseudopupillen in den Mosaikaugen einer nicht mutierten Fliege (A, B) und der Mutante NM(2L)4.52 (C, D) jeweils in licht- und dunkeladaptierten Fliegen. Ist das TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert, so ist deutlich eine grün fluoreszierende Pseudopupille zu sehen. Befindet sich das TRPL-eGFP außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper, so zeigt das Auge eine diffuse grüne Fluoreszenz und eine dunkle Pseudopupille (Pfeil in B).

Die Abb. 4-18 zeigt die Pseudopupillen in den Mosaikaugen einer nicht mutierten Fliege und der Mutante NM(2L)4.52. Bei der unmutierten Fliege findet nach wie vor eine Wanderung des TRPL-eGFP statt und daher ist eine grün fluoreszierende Pseudopupille nur in dunkeladaptierten Fliegen vorhanden (Abb. 4-18 A). Bei lichtadaptierten Fliegen zeigt das Auge eine diffuse grüne Fluoreszenz und eine dunkle Pseudopupille ist zu erkennen (Pfeil in Abb. 4-18 B). Bei der Mutante NM(2L)4.52 ist sowohl bei dunkel- als auch bei lichtadaptierten Fliegen eine grün leuchtende Pseudopupille vorhanden. Die Wanderung des TRPL-eGFP findet also nicht mehr statt und TRPL-eGFP ist sowohl in dunkel- als auch in lichtadaptierten Fliegen in den Rhabdomeren lokalisiert.

Der Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP in dieser Mutante wurde nun genauer untersucht. Dazu wurden mittels Wasserimmersionsmikroskopie Aufnahmen der Augen mit wesentlich höherer Vergrößerung gemacht. Zudem bietet die Wasserimmersionstechnik den Vorteil der optischen Neutralisation der Cornea. Diese Aufnahmen wurden von Mosaikaugen und von den Augen heterozygoter Fliegen gemacht. Homozygote Fliegen treten bei dieser Mutante nicht auf, daher liegt es Nahe, dass durch die Mutagenese eine homozygot lethale Mutation eingeführt wurde.

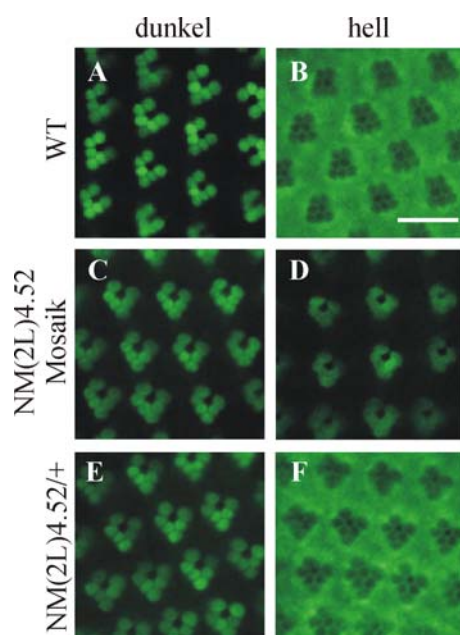


Abb. 4-19 Die Mutante NM(2L)4.52 zeigt eine Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung in Mosaikaugen, nicht jedoch in den Augen heterozygoter Individuen. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen von Wildtyp-Fliegen (A, B) und der Mutante NM(2L)4.52 (Mosaikaugen: C, D, Augen heterozygoter Individuen: E, F), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15 μ m.

Die Abb. 4-19 zeigt die Wasserimmersionsbilder von Wildtyp-Fliegen (A, B) und der Mutante NM(2L)4.52 in den homozygoten Bereichen der Mosaikaugen (C, D) und in heterozygoten Fliegen (E, F). Der Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP, auf den mittels Pseudopupille selektiert worden war, kann mit dieser Methode bestätigt werden. In den homozygoten Bereichen der Mosaikaugen ist das TRPL-eGFP bei dunkel- und lichtadaptierten Fliegen stets in den Rhabdomeren lokalisiert. Die heterozygoten Fliegen entsprechen, was die Wanderung des TRPL-eGFP

betrifft, dem Wildtyp. Es findet eine Wanderung des TRPL-eGFP statt und daher ist in dunkeladaptierten Fliegen TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert und bei lichtadaptierten Fliegen befindet sich das TRPL-eGFP im Zellkörper und die Rhabdomere erscheinen dunkel. Daraus lässt sich schließen, dass die induzierte Mutation rezessiv ist und der Phänotyp daher nur in homozygoten Individuen ausgeprägt ist. Die Tatsache, dass die induzierte Mutation in dieser Mutante rezessiv ist, ermöglicht die Kartierung der Mutation mittels Fliegen, welche Deletionen an definierten Stellen aufweisen (siehe Kapitel 4.9.3.1).

Die Tatsache, dass die Wanderung des TRPL-eGFP in der Mutante NM(2L)4.52 inhibiert ist bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch die Wanderung des nativen TRPL inhibiert ist. Um zu überprüfen, ob die Wanderung des nativen TRPL von dieser Mutation ebenfalls beeinflusst wird, wurden immunocytochemische Analysen durchgeführt. Dabei kann in Querschnitten durch die Augen der betreffenden Fliegen die Lokalisation von TRPL-eGFP und nativem TRPL gleichzeitig untersucht werden. In der Abb. 4-20 ist die Immunocytochemie von unmutierten Fliegen (A-D) und der Mutante NM(2L)4.52 (E-H) dargestellt. Die Rhabdomere sind mit FITC-gekoppeltem Phalloidin in rot markiert, der Nachweis des nativen TRPL ist in blau dargestellt und die eGFP-Fluoreszenz erscheint grün. In der unteren Hälfte der Abbildung (C, D, G, H) ist die Markierung der Rhabdomere weggelassen. Bei dunkeladaptierten unmutierten Fliegen ist zu sehen, dass TRPL-eGFP und natives TRPL in den Rhabdomeren lokalisiert sind. Die Kolokalisation ist nicht vollständig, das TRPL-eGFP (grün) füllt den ganzen Raum der Rhabdomere aus während das native TRPL (blau) eher am äußeren Rand der Rhabdomere nachgewiesen wird (Abb. 4-20 A, C). Dieses Phänomen tritt ab und zu auf und es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Artefakt [7]. Je nach Fixierungsgrad der Präparate ist der TRPL Antikörper besser oder schlechter in der Lage, in die dicht gepackten Membranstapel der Rhabdomere einzudringen. Kann der Antikörper nicht so gut ins Innere der Rhabdomere vordringen, so kommt dieser Effekt zustande. Bei lichtadaptierten unmutierten Fliegen befinden sich sowohl TRPL-eGFP als auch natives TRPL außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper (Abb. 4-20 B, D). Die Kolokalisation ist auch hier nicht ganz vollständig.

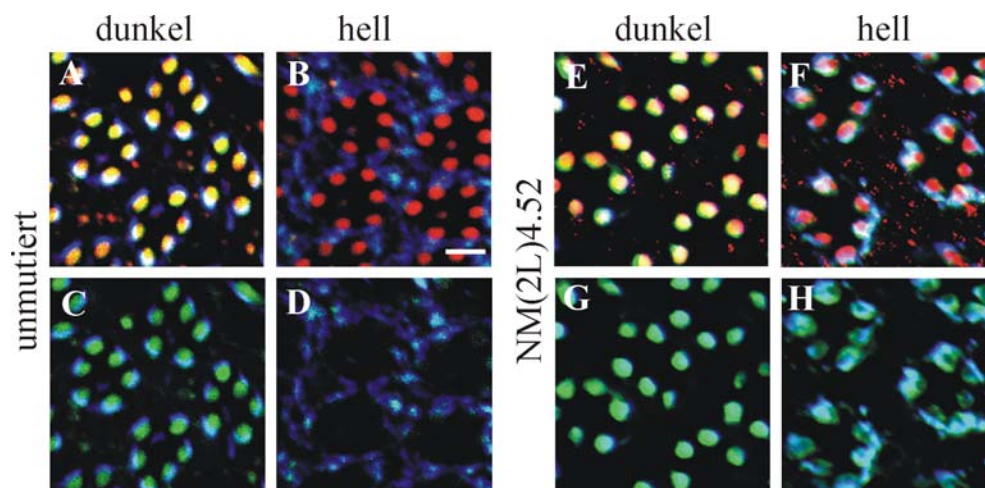


Abb. 4-20 Lokalisation von nativem TRPL und TRPL-eGFP in den Mosaikaugen von dunkel- und lichtadaptierten unmutierten Fliegen und der Mutante NM(2L)4.52. Querschnitte durch die Augen der unmutierten Fliegen (A-D) und der Mutante NM(2L)4.52 (E-H) wurden markiert mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (rot) und α -TRPL Antikörpern (blau). Die eGFP-Fluoreszenz ist in grün gezeigt. Zusätzlich wurde das TRPL-eGFP mit GFP Antikörpern (ebenfalls grün) markiert. In A, B, E, F ist die Überlagerung aller drei Kanäle dargestellt, in C, D, G, H ist das rote Signal, das dem Phalloidin entspricht, weggelassen. Eichstrich 8 μ m.

Bei der Mutante NM(2L)4.52 sind in dunkeladaptierten Fliegen ebenfalls sowohl TRPL-eGFP als auch natives TRPL in den Rhabdomeren lokalisiert (Abb. 4-20 E, G). In lichtadaptierten Fliegen dieser Mutante sind TRPL-eGFP und natives TRPL zwar eher in den Rhabdomeren lokalisiert als außerhalb (teilweise Kolokalisation mit der roten Phalloidinfärbung), allerdings entspricht dies nicht exakt der Lokalisation in dunkeladaptierten Fliegen. Die Lokalisation sowohl von TRPL-eGFP als auch von nativem TRPL ist zum äußeren Rand der Rhabdomere und teilweise auch in die „stalk“-Membran, eine apikale Membransubdomäne [112], hinein verschoben. In der Mutante NM(2L)4.52 verhält sich also das native TRPL ebenso wie das TRPL-eGFP. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation die Wanderung beider Proteine beeinflusst und dies wahrscheinlich über denselben Mechanismus. Dennoch besteht ein geringer Unterschied

zwischen dunkel- (E, G) und lichtadaptierten Fliegen (F, H) in dieser Mutante. Das könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise die Wanderung sowohl des TRPL-eGFP als auch des nativen TRPL in dieser Mutante nicht vollständig inhibiert, aber zumindest zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Internalisierung gestört sein könnte.

4.9.3.1 *Deletionskartierung*

Die Methode der Deletionskartierung eignet sich für Kartierung der Mutation in der Mutante NM(2L)4.52, da die Mutation rezessiv ist. Liegt die induzierte Mutation über der Deletion, so ist keine Wanderung des TRPL-eGFP in den Fliegen der F1-Generation zu beobachten. Ist die Mutation lethal, so sind die Fliegen des Typs Deletion über Mutation ebenfalls lethal. In diesem Fall sind nur Fliegen, welche eines der entsprechenden Balancer-Chromosomen tragen in der F1-Generation vorhanden (siehe Kapitel 3.2.7.3). Zudem ist die Mutante homozygot lethal. Die Lethalität muß aber nicht unbedingt von derselben Mutation ausgelöst werden, die auch für den Wanderungsdefekt verantwortlich ist. Es ist möglich, dass bei der Mutagenese mehrere Mutationen an verschiedenen Stellen des Chromosomenarms 2L induziert worden sind. Dies muss bei der Durchführung der Deletionskartierung berücksichtigt werden.

Die Deletionskartierung wurde mit dem Deletionskit für den Chromosomenarm 2L (Stand: März 2005) vom Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, USA) durchgeführt. Die Mutante NM(2L)4.52 wurde mit allen Linien des Deletionskits 2L gekreuzt und die Fliegen der F1-Generation wurden auf das Vorhandensein des Typs Deletion über Mutation bzw. auf den Wanderungsdefekt hin überprüft. In der Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der Deletionskartierung der Mutante NM(2L)4.52 mit dem Deletionskit 2L zusammengestellt. Diese sechs Defizienzen erscheinen relevant für die Lokalisation der Mutationen. Da mehrere sich nicht überlappende Defizienzen für die Lokalisation in Frage kommen könnten, legt dies nahe, dass bei der Mutagenese mehrere Mutationen eingeführt wurden. Bei vier der Defizienzen war der Typ Deletion über Mutation lethal und somit nicht mehr vorhanden. Sie entsprechen den Loci auf dem Chromosomenarm 2L, die für die Lage der Lethalitäts-auslösenden Mutationen in Frage kommen. Bei zwei der Defizienzen war der Typ Deletion über Mutation vorhanden, sie zeigten aber in den Weibchen (rotäugig) der F1-Generation keine Wanderung des TRPL-

eGFP. In den Männchen (weißäugig) der F1-Generation hingegen fand eine Wanderung des TRPL-eGFP statt. Diese beiden Defizienzen entsprechen den Loci auf dem Chromosomenarm 2L, die für die Lage der Mutationen in Frage kommen, die den Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP auslösen.

Tabelle 4-2: Defizienzen, welche für die Lokalisation der Mutationen der Mutante NM(2L)4.52 in Frage kamen.

Defizienz (Stocknummer)	Zytogenetische Bruchpunkte	Deletion über Mutation in der F1-Generation
Df(2L)sc19-8 (693)	24C2-8;25C8-9	lethal
Df(2L)spd ^{j2} (2414)	27C1-2;28A	lethal
Df(2L)cact-255rv64 (2583)	35F-36A;36D	lethal
Df(2L)net-PMF (3638)	21A1;21B7-8	keine Wanderung bei Weibchen
Df(2L)XE-3801 (4956)	27E2;28D1	keine Wanderung bei Weibchen
Df(2L)FCK-20 (5869)	32D1;32F1-3	lethal

Um sicherzugehen, dass die entsprechenden Phänotypen tatsächlich durch die jeweilige Mutation ausgelöst wurden, wurden diese sechs Deletionsstämme mit den entsprechenden unmutierten Fliegen gekreuzt. Die unmutierten Fliegen zeigen eine TRPL-eGFP Wanderung die dem Wildtyp entspricht (Abb. 4-21 A, B). Hierbei stellte sich heraus, dass die beiden Defizienzen, bei denen der Typ Deletion über Mutation zwar vorhanden war, aber in den Weibchen (rotäugig) der F1-Generation keine Wanderung des TRPL-eGFP beobachtet werden konnte, für die Lokalisation der Mutation deshalb nicht in Frage kommen, weil derselbe Phänotyp jeweils auch in der F1-Generation der Kreuzung dieser Defizienzen mit unmutierten Fliegen auftrat (Abb. 4-21). Das TRPL-eGFP ist sowohl in dunkel- als auch in lichtadaptierten Fliegen in den Rhabdomeren lokalisiert. Ein geringfügiger Unterschied zwischen dunkel- und lichtadaptierten Fliegen war allerdings zu beobachten. Es scheint, als ob in den lichtadaptierten Fliegen zwar ein Großteil des TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert ist, aber möglicherweise etwas weniger als in den dunkeladaptierten Fliegen. Dies war aber sowohl bei den Kreuzungen der Deletionsflie-

gen mit den Mutanten als auch bei den Kreuzungen mit den unmutierten Fliegen der Fall. Die Männchen (weißäugig) der F1-Generation aus den Kreuzungen von unmutierten Fliegen mit diesen beiden Defizienzen zeigten allesamt eine Wanderung des TRPL-eGFP (Abb. 1 im Anhang).

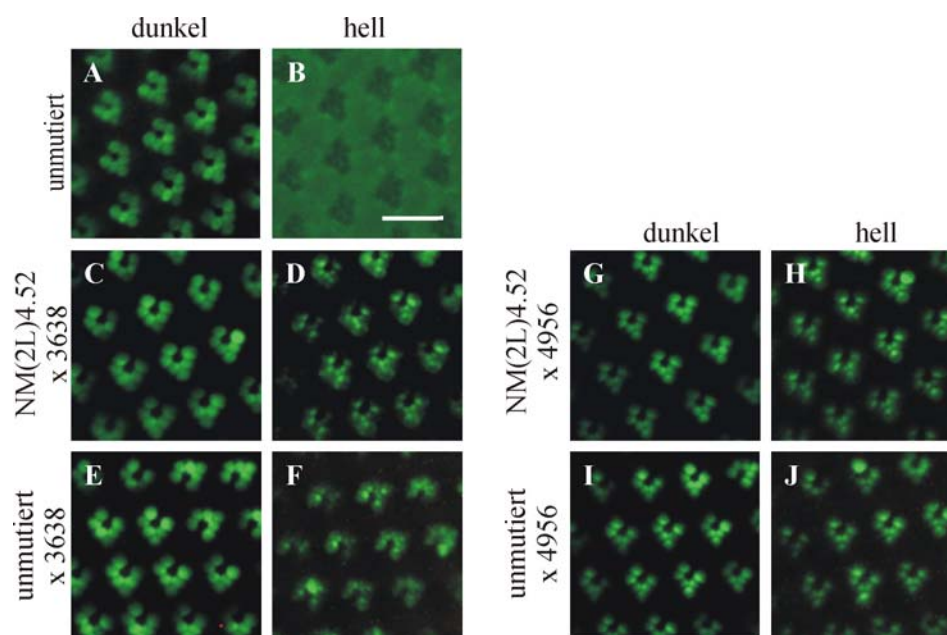


Abb. 4-21 Die Defizienzen der Stämme 3638 und 4956 sind irrelevant für die Lokalisation der Mutation(en) der Mutante NM(2L)4.52. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen von unmutierten Fliegen (A, B) und von (rotäugigen) Weibchen der F1-Generation (C-J), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Die Weibchen der F1-Generation aus der Kreuzung der beiden Defizienzen sowohl mit der Mutante NM(2L)4.52 als auch mit unmutierten Fliegen zeigen einen Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP. Eichstrich 15µm.

Auch die Kreuzungen der vier anderen interessanten Deletionsstämme wurden mit unmutierten Fliegen durchgeführt. Bei Kreuzung dieser Deletionsstämme mit unmutierten Fliegen war der Typ Deletion über Mutation bei allen vier Stämmen (693, 2414, 2583 und 5869) vorhanden und damit nicht lethal. Diese Deletionsstämme sind daher essentiell für die Lokalisation der Mutationen, welche Lethalität und möglicherweise auch den Translokationsdefekt auslösen. Es ist durchaus denkbar, dass die Lethalität und der Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP durch ein-

und dieselbe Mutation ausgelöst werden. Da diese Deletionen sich nicht überschneiden, ist es wahrscheinlich, dass im Rahmen der Mutagenese in die Mutante NM(2L)4.52 mindestens vier lethale Mutationen eingeführt wurden. Natürlich kommen auch diejenigen Bereiche des Chromosomenarms 2L, die durch den Deletionskit nicht abgedeckt sind, für die Lokalisation der Mutationen in Frage. Der Kit deckt laut Angaben des Bloomington Stock Centers mindestens 94,8% des Chromosomenarms 2L ab. Folgende Bereiche sind nicht durch den Kit abgedeckt:

45F2-6; 46A
 50E4
 52F10-53A1; 53D9-E1
 54B7-10; 54B17-C4
 54C1-4; 54C8-D1
 54E5-7
 56D6-10; 56D7-E3
 60B3-8; 60C5-6

4.9.4 Charakterisierung der Mutanten mit Mutation auf dem Chromosomenarm 3R

Aus der Mutagenese des Chromosomenarms 3R gingen fünf Mutanten hervor mit einem Defekt in der Wanderung des TRPL-eGFP. Diese Mutanten wurden zunächst anhand der Pseudopupille selektiert. In der Abb. 4-22 sind die Pseudopupillen der fünf Mutanten (C-L) und einer nicht mutierten Fliege (A, B) gezeigt.

In der nicht mutierten Fliege ist die Wanderung des TRPL-eGFP deutlich anhand der Pseudopupille zu erkennen, wohingegen in allen fünf Mutanten TRPL-eGFP unabhängig von den Lichtbedingungen immer in den Rhabdomeren lokalisiert ist. Die Pseudopupille zeigt unabhängig von den Lichtbedingungen eGFP-Fluoreszenz. Die Mutante NM(3R)5.8 zeigt einen „rauhe Augen“-Phänotyp („*rough eyes*“, Abb. 4-22 E). Dieser Phänotyp basiert vermutlich auf einem Defekt in der Augenentwicklung, der zu einer Störung der dem Auge zugrunde liegenden zellulären Architektur führt [129]. Der Phänotyp ist in einzelnen Individuen unterschiedlich stark ausgeprägt.

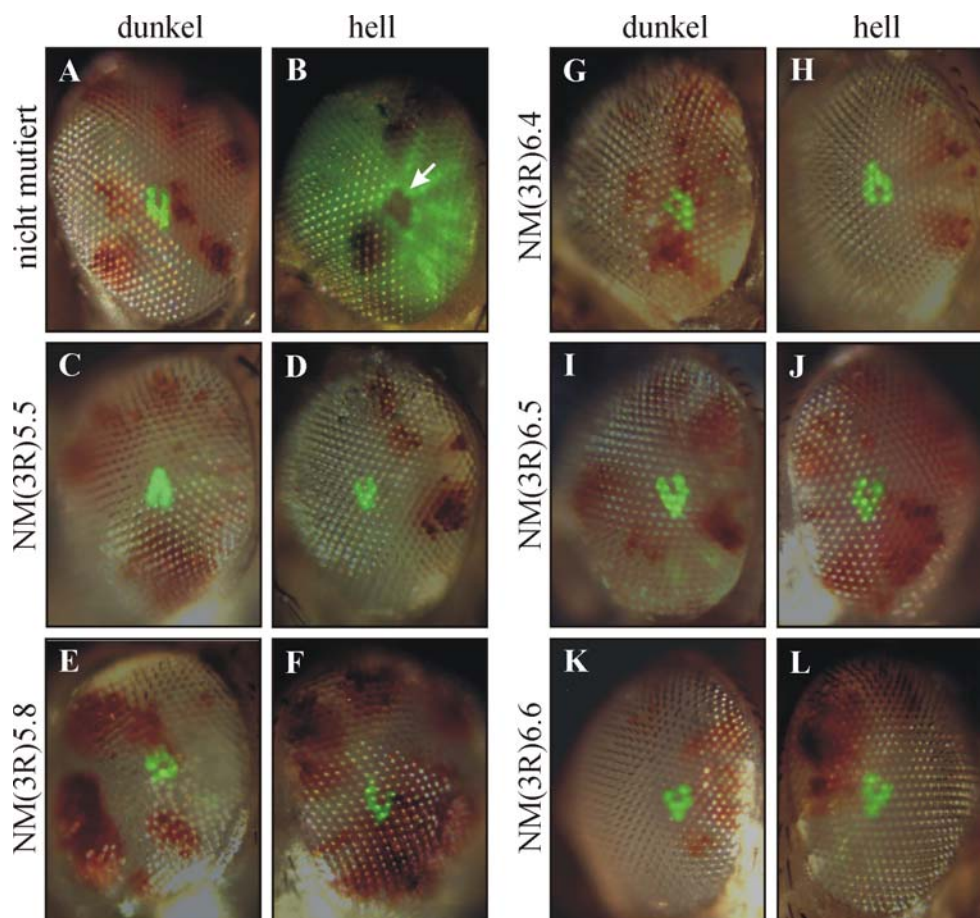


Abb. 4-22 Die fünf Mutanten auf dem Chromosomenarm 3R zeigen einen Defekt der Wanderung von TRPL-eGFP. Gezeigt sind die Pseudopupillen in den Augen einer nicht mutierten Mosaikfliege (A, B) und in den Mosaikaugen der Mutanten NM(3R)5.5 (C, D), NM(3R)5.8 (E, F), NM(3R)6.4 (G, H), NM(3R)6.5 (I, J) und NM(3R)6.6 (K, L) in dunkel- und lichtadaptierten Fliegen. Bei einer Lokalisation des TRPL-eGFP in den Rhabdomeren ist eine grün fluoreszierende Pseudopupille zu beobachten. Die Pseudopupille erscheint dunkel (Pfeil in B) wenn sich das TRPL-eGFP außerhalb der Rhabdomere befindet.

Auch in diesen Mutanten wurde der Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP mittels Wasserimmersionsmikroskopie genauer untersucht. Die Mutanten NM(3R)5.5 und NM(3R)5.8 sind homozygot lethal, die restlichen Mutanten NM(3R)6.4, NM(3R)6.5 und NM(3R)6.6 sind homozygot lebensfähig. In der Abb. 4-23 ist die eGFP-Fluoreszenz in den Augen von Mosaikfliegen und heterozygoten Individuen der Mutanten NM(3R)5.5 (A-D) und NM(3R)5.8 (E-H) gezeigt. In den Mosaikaugen findet keine Wanderung des TRPL-eGFP mehr statt, es ist sowohl in dunkel-

als auch in lichtadaptierten Fliegen immer in den Rhabdomeren vorhanden (Abb. 4-23 A, B, E, F). Deutlich ist der rauhe Augen-Phänotyp in den Mosaikaugen der Mutane NM(3R)5.8 zu erkennen (Abb. 4-23 E, F). Die Rhabdomere bilden kein einheitliches Muster mehr, sondern sind je nach Ausprägung des Phänotyps mehr oder weniger unregelmäßig angeordnet. Bei den heterozygoten Fliegen dieser beiden Mutanten wandert das TRPL-eGFP entsprechend dem Wildtyp, die induzierten Mutationen sind also rezessiv (Abb. 4-23 C, D, G, H). Auch bei diesen Fliegen ist es möglich, dass es sich bei der Mutation, die den Wanderungsdefekt auslöst und derjenigen, die die Lethalität verursacht, um verschiedene Mutationen handelt.

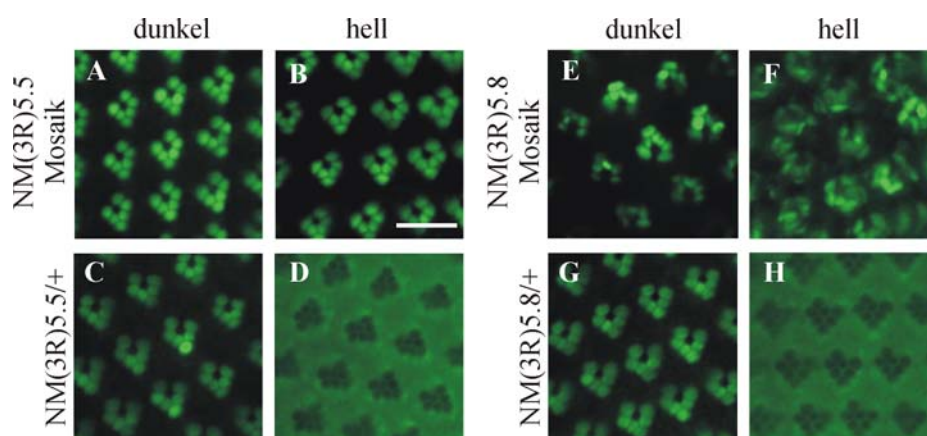


Abb. 4-23 Die Mutanten NM(3R)5.5 und NM(3R)5.8 zeigen eine Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung in Mosaikaugen, nicht jedoch in den Augen heterozygoter Individuen. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen der Mutanten NM(3R)5.5 (Mosaikaugen: A, B, Augen heterozygoter Individuen: C, D) und NM(3R)5.8 (Mosaikaugen: E, F, Augen heterozygoter Individuen: G, H), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15 μ m.

Die Mutanten NM(3R)6.4, NM(3R)6.5 und NM(3R)6.6 sind homozygot lebensfähig. Hier wurde die Lokalisation des TRPL-eGFP auch in den Augen homozygoter Individuen untersucht. Die Abb. 4-24 zeigt die Wasserimmersionsbilder dieser drei Mutanten. In den Augen der Mosaikfliegen aller drei Mutanten findet keine Wanderung des TRPL-eGFP mehr statt. Die eGFP-Fluoreszenz ist unabhängig von den Lichtbedingungen immer in den Rhabdomeren vorhanden (Abb. 4-24 A, B, G, H, M, N). Auch in diesen Mutanten sind, wie auch in allen vorherigen, die

induzierten Mutationen rezessiv. Daher wandert in den heterozygoten Individuen dieser drei Mutanten das TRPL-eGFP dem Wildtyp entsprechend lichtabhängig zwischen dem Rhabdomer und einem intrazellulären Kompartiment. In dunkeladaptierten Fliegen ist das TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert und in lichtadaptierten Fliegen außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper (Abb. 4-24 C, D, I, J, O, P).

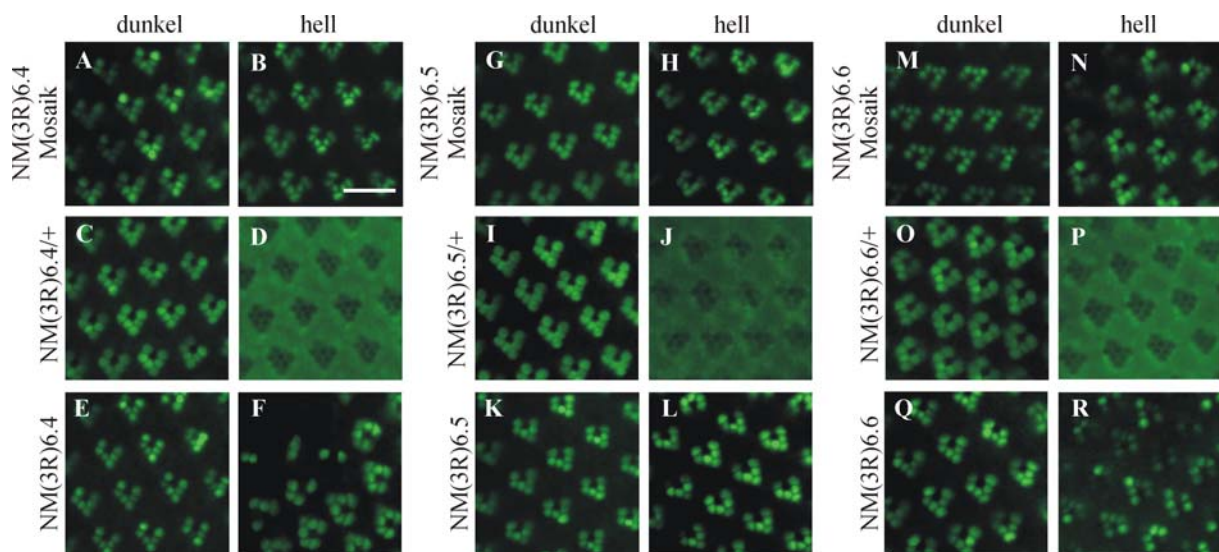


Abb. 4-24 Die Mutanten NM(3R)6.4 und NM(3R)6.5 zeigen eine Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung in Mosaikaugen und in den Augen homozygoter Fliegen, nicht jedoch in den Augen heterozygoter Individuen. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen der Mutanten NM(3R)6.4 (Mosaikaugen: A, B, Augen heterozygoter Individuen: C, D, Augen homozygoter Fliegen: E, F), NM(3R)6.5 (Mosaikaugen: G, H, Augen heterozygoter Individuen: I, J, Augen homozygoter Fliegen: K, L) und NM(3R)6.6 (Mosaikaugen: M, N, Augen heterozygoter Individuen: O, P, Augen homozygoter Fliegen: Q, R), welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Eichstrich 15µm.

In den homozygoten Fliegen sollte das TRPL-eGFP keiner Wanderung unterliegen, sondern ebenso wie in den Mosaikaugen unabhängig von den Lichtbedingungen immer in den Rhabdomeren lokalisiert sein. Dies konnte mittels der Wasserimmersionsmikroskopie für alle drei Mutanten bestätigt werden (Abb. 4-24 E, F, K, L, Q, R). Bei den Mutanten NM(3R)6.4 und NM(3R)6.6 fällt auf, dass bei den lichtadaptierten homozygoten Fliegen regional unterschiedliche Mengen an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren vorhanden sind (Abb. 4-24 F, R). Es gibt

Areale, in denen in den Rhabdomeren augenscheinlich gar kein TRPL-eGFP vorhanden ist und solche, in denen relativ geringe Mengen an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren detektiert wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die induzierten Mutationen regionale Effekte bewirken, welche an bestimmten Stellen eine Wanderung des TRPL-eGFP zulassen, im Großteil des Auges jedoch nicht. Diese regionalen Unterschiede in der Lokalisation des TRPL-eGFP wurde nur in den Augen homozygoter Fliegen beobachtet und nicht in den Mosaikaugen.

Regionale Unterschiede zwischen verschiedenen Bereichen von Komplexaugen sind nicht selten und haben ihren Ursprung meist in der Spezialisierung einzelner Bereiche der Retina. Beispiele für solche regionalen Unterschiede sind z.B. die anatomischen und physiologischen Spezialisierungen der Ommatidien in der dorsalen Randregion („*dorsal rim area*“) in den Komplexaugen vieler Insekten, die die Wahrnehmung von polarisiertem Licht erlauben [30], [72], [152], oder der sogenannte „*love spot*“, eine Region mit hoher Sehschärfe in der fronto-dorsalen Retina von männlichen Stubenfliegen [59]. Darüberhinaus gibt es Evidenzen, dass räumliche und zeitliche Auflösung der Photorezeptoren von männlichen *Calliphora vicina* in unterschiedlichen Teilen des Auges verschieden sind [17].

5 Diskussion

Die Regulierung der Anzahl der Ionenkanäle an der Zelloberfläche ist ein wichtiger Mechanismus, um die Eigenschaften von Neuronen zu modifizieren. Zum Beispiel unterliegen α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure (AMPA) Rezeptoren, welche zusammen mit Rezeptoren vom N-methyl-D-aspartat- (NMDA) Typ in den glutaminergen Synapsen im Vertebratengehirn exprimiert werden, einer aktivierungsabhängigen Wanderung zwischen der postsynaptischen Membran und einem intrazellulären Speicherkompartiment [19], [136]. Die Regulation der Anzahl an postsynaptischen AMPA Rezeptoren soll signifikant zu den physiologischen Mechanismen, welche dem Speichern von Erinnerungen in der lateralen Amygdala unterliegen, beitragen [126].

Ähnlich wie bei den AMPA und NMDA Rezeptoren der Vertebraten modifiziert die lichtabhängige Wanderung von TRPL in den Photorezeptorzellen die Zusammensetzung der Ionenkanäle in der rhabdomerischen Membran. Folglich beinhaltet die rhabdomerische Membran von dunkeladaptierten Fliegen funktionale TRP- und TRPL-Kanäle während in lichtadaptierten Fliegen nur funktionale TRP-Kanäle vorliegen, da die Anzahl der TRPL-Kanäle stark reduziert ist [7] und der Ca^{2+} -Einstrom durch die TRP-Kanäle die verbliebenen TRPL-Kanäle inaktiviert [123]. Darüberhinaus ist eine Wanderung von TRP-Kanälen bei Vertebraten für TRPV2 [15], [62] und TRPC5 [12] beschrieben. TRPV2 wandert nach Stimulation der Zellen mit dem „*insulin-like growth factor-I**“ oder mit dem Neuropeptid „*head activator*“ von einem intrazellulären Kompartiment zur Zelloberfläche. Letzterer ist kein direkter Ligand von TRPV2 aber es scheint, dass er die Rekrutierung des Ionenkanals zur Plasmamembran durch die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Signalweges veranlasst. Die Wanderung von TRPV2 kann durch Blocker der Phosphatidylinositol 3-kinase und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase inhibiert werden [15]. Auf ähnliche Art und Weise wird TRPC5 durch Stimulation der Zellen mit dem „*epider-*

mal growth factor“ und anschließender Aktivierung eines EGF-Rezeptor gekoppelten Signalwegs zur Zelloberfläche rekrutiert [12]. Daher resultiert für TRPV2 und TRPC5 eine Aktivierung entweder eines G-Protein gekoppelten oder eines EGF-Rezeptor vermittelten Signalwegs in der Wanderung dieser Ionenkanäle zur Zelloberfläche, wohingegen für *Drosophila* TRPL die Aktivierung einer G-Protein gekoppelten Phototransduktionskaskade die Wanderung von TRPL in die entgegengesetzte Richtung, von der Zelloberfläche zu einem intrazellulären Kompartiment, auslöst. Die Identifikation des auslösenden Signals, welches die spezifische Internalisierung von TRPL veranlasst, ist wichtig für das Verständnis der TRPL Wanderung.

5.1 Expression von TRPL-eGFP in transgenen *Drosophila*

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Fliegen verwendet, welche ein TRPL-eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des Rh1-Promotors exprimieren. Da der Rh1-Promotor ein „stärkerer“ Promotor ist als der TRPL-Promotor, d.h. er induziert eine stärkere Genexpression, lag die Vermutung nahe, dass das TRPL-eGFP Fusionsprotein in den transgenen Fliegen überexprimiert sein könnte. Anhand von Northern Blots und Western Blots konnte gezeigt werden, dass die *trpl-eGFP* mRNA etwa in der zehnfachen Menge der *trpl* mRNA in den transgenen Fliegen vorliegt. Die Proteinmengen an TRPL-eGFP und nativem TRPL waren aber in etwa identisch. Somit entspricht das Verhältnis TRPL-eGFP : TRPL nicht dem Mengenverhältnis von Rhodopsin zu TRPL entspricht. Die rhabdomerischen Membranen beinhalten ungefähr die zehnfache Menge an Opsin im Vergleich zu TRP [61]. Da von TRP in den Rhabdomeren ungefähr zehn Mal mehr vorhanden ist als von TRPL [109], beträgt das Verhältnis von TRPL zu Opsin ungefähr 1:100. Diese Reduzierung der TRPL-eGFP Menge auf das Niveau des TRPL legt den Schluss nahe, dass es Regulationsmechanismen geben könnte, welche während oder nach der Translation dafür sorgen, dass nicht die zehnfache Menge an TRPL-eGFP Protein im Vergleich zu nativem TRPL vorhanden ist. Ein anderer Grund für die relativ geringe Expression von TRPL-eGFP könnte mit der Verwendung von Codewörtern („*Codon Usage*“) in verschiedenen Spezies zusammenhängen [39], [135]. Bestimmte Codons des degenerierten Codes werden in einer bestimmten Spezies bevorzugt oder nur sehr selten benutzt, was letztlich die tRNA Konzentration für das entsprechende Codon innerhalb der Zellen widerspiegelt. Die „*Codon Usage*“ spielt eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen während häufig genutzte Codons die Translation be-

schleunigen können [127]. Die kodierende Sequenz des verwendeten *eGFP*-Gens beinhaltet mehr als 190 stille Basenaustausche, welche den Präferenzen der humanen aber nicht der *Drosophila* „Codon Usage“ entsprechen [42]. Die Verwendung der humanen Codons in *Drosophila* könnte die Effizienz der Translation negativ beeinflussen. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, warum die Proteinmengen nicht proportional zu den Mengen an mRNA sind. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist es von Vorteil, dass TRPL-eGFP trotz der Expression unter dem Rh1-Promotor nicht überexprimiert wird, da es so in physiologischen Mengen in den Photorezeptoren vorliegt und gleichzeitig kann die eGFP-Fluoreszenz problemlos detektiert werden.

5.2 TRPL-eGFP bildet funktionelle Kanäle

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf das TRPL-eGFP Fusionsprotein um Einblicke in den Mechanismus der Wanderung des Ionenkanals zu erlangen. Dafür ist es von elementarer Bedeutung, dass TRPL-eGFP funktionelle Kanäle bildet. Die Funktionalität der Kanäle ließe sich belegen, wenn ihre physiologischen Eigenschaften denen nativer TRPL-Kanäle entsprechen würden. Zu diesem Zweck wurden Elektoretinogramme von TRPL-eGFP-exprimierenden Fliegen, sowie von Fliegen, die nur natives TRPL exprimieren (*trp*-Mutante), abgeleitet und die Lichtantworten verglichen. Die Daten zeigen, dass die physiologischen Eigenschaften der TRPL-eGFP- und der nativen TRPL-Kanäle sehr ähnlich sind und daher nicht davon auszugehen ist, dass die Fusion des eGFP an den TRPL-Kanal die funktionellen Eigenschaften des Kanals verändert.

Der einzige auffällige Unterschied zwischen TRPL-eGFP- und TRPL-Kanälen liegt in der Antwort auf einen zweiten Lichtpuls nach 10s Dunkelheit. Die Antwort der TRPL-eGFP-exprimierenden Fliegen fällt wesentlich stärker aus, als die entsprechende Antwort der *trp*-Mutante. Dies deutet darauf hin, dass sich die *trp*-Mutante langsamer von der lichtinduzierten Aktivierung erholt. Es wurden lichtabhängig die Ionenkanäle geöffnet und dadurch sind Kationen in die Zellen eingeströmt. Dies führt zu einer Depolarisation der Membran. Nach Ende des Lichtreizes repo-

larisiert die Photorezeptorzelle und ist dann für eine gewisse Zeit refraktär, d.h. sie kann nicht sofort wieder erregt werden. Die Dauer der Refraktärzeit ist in *trp*-Mutanten deutlich erhöht und ist eines der typischen Kennzeichen des Phänotyps der *trp*-Mutante [88]. Dabei soll eine langsamere Erholung einem stärkeren *trp*-Phänotyp entsprechen.

Es gibt verschiedene Theorien darüber, warum die Photorezeptoren in der *trp*-Mutante nicht sofort wieder erregbar sind. Eine Hypothese besagt, dass die Anwesenheit von Ca^{2+} in den intrazellulären Speicherkompartimenten für die Phototransduktion absolut notwendig ist [50]. Diese Hypothese stützt sich auf die Theorie des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms zur Aktivierung der Kanäle. Der Ca^{2+} -Einstrom durch die TRP-Kanäle würde gebraucht werden, um die Speicher wieder aufzufüllen. Wenn nun die Aktivierung der Kanäle gemäß der Theorie des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms über eine Entleerung dieser Speicher erfolgen würde, so könnte sie erst wieder stattfinden, wenn die Speicher mit Ca^{2+} gefüllt sind. Eine Erholung der Photorezeptoren würde also im Füllen dieser Speicher bestehen. Diese Hypothese liefert jedoch keinen Anhaltspunkt, warum es Unterschiede zwischen TRPL und TRPL-eGFP geben sollte. Sie liefert keine Erklärung dafür, weshalb die Antwort auf einen zweiten Lichtpuls nach 10s Dunkelheit in den TRPL-eGFP-exprimierenden Fliegen wesentlich stärker ausfällt, als die entsprechende Antwort der *trp*-Mutante.

Eine zweite Hypothese besagt, dass keine Erregung stattfinden kann solange kein PIP_2 in den Photorezeptorzellen vorhanden ist [49]. PIP_2 wird bei Belichtung durch die $\text{PLC}\beta$ hydrolysiert und dieser Schritt ist notwendig für die Aktivierung der Ionenkanäle. In der *trp*-Mutante könnte deshalb kein oder zu wenig PIP_2 vorhanden sein, weil die Neusynthese von PIP_2 nicht durch einen Ca^{2+} -Einstrom durch TRP-Kanäle stimuliert werden kann. Allerdings liefert auch diese Hypothese keine Erklärung dafür, weshalb Unterschiede zwischen TRPL und TRPL-eGFP in den Antworten auf den zweiten Lichtpuls existieren.

Eine dritte Hypothese könnte möglicherweise eine Erklärung für diese Unterschiede liefern. Der transiente Phänotyp der *trp*-Mutante wird hier mit einer Regulation der TRPL-Kanäle durch Calmodulin erklärt [131]. Unter der Annahme, dass Ca^{2+} eine Rolle bei der vorzeitigen Termination der Lichtantwort in der *trp*-Mutante spielt, könnte eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Inaktivierung der TRPL-Kanäle der Grund für die transiente Lichtantwort in der *trp*-Mutante sein [131]. Dauert diese Inaktivierung des TRPL auch nach dem Ende des Lichtreizes noch an, so

kann eine erneute Aktivierung des Rezeptors nur dann stattfinden, wenn auch TRP-Kanäle vorhanden sind, welche nicht durch Ca^{2+} /Calmodulin inaktiviert werden. Dies entspricht der Situation im Wildtyp. Sind allerdings keine TRP-Kanäle vorhanden, so kann keine erneute Aktivierung stattfinden, solange die TRPL-Kanäle inaktiviert sind. Dies entspricht der Situation in der *trp*-Mutante und in den TRPL-eGFP-exprimierenden Fliegen. Eine Erholung der Rezeptoren die für eine erneute Erregung notwendig ist, würde nach dieser Hypothese darin bestehen, dass die TRPL-Kanäle nicht mehr durch Ca^{2+} /Calmodulin inaktiviert werden. Bei dieser Hypothese spielen die TRPL-Kanäle eine maßgebliche Rolle bei der Erholung der Photorezeptoren. Der einzige Unterschied zwischen der *trp*-Mutante und den TRPL-eGFP-exprimierenden Fliegen besteht in den TRPL-Kanälen, die einmal in ihrer nativen Form vorliegen und einmal an eGFP fusioniert sind. Die Bindungsstellen für Ca^{2+} /Calmodulin befinden sich im C-terminalen Bereich des TRPL. Die Fusion von eGFP an den C-Terminus des TRPL könnte einen Einfluss auf die Inaktivierung der Kanäle durch Ca^{2+} /Calmodulin haben. Möglicherweise ist die Affinität des Ca^{2+} /Calmodulin zu nativem TRPL größer als zu TRPL-eGFP und so könnte natives TRPL für eine längere Zeit inaktiviert werden als TRPL-eGFP.

5.3 Vergleich der Kinetiken der Wanderung von TRPL-eGFP in *Drosophila* und TRPL in *Calliphora*

Die Bestimmung des Zeitverlaufes der Wanderung von TRPL-eGFP ergab, dass sowohl die Internalisierung als auch Einschleusung in die rhabdomerische Membran im Bereich von Stunden liegt, wobei die Internalisierung deutlich langsamer vonstatten geht. Für *Calliphora* TRPL sind kürzere Zeitspannen für die Wanderung beschrieben [7]. Die Halbwertszeiten für die Wanderung von TRPL-eGFP in *Drosophila* wurden in der vorliegenden Arbeit mit 3,25h für die Internalisierung und 1h für die Einschleusung des TRPL-eGFP in die rhabdomerischen Membranen bestimmt. Die Unterschiede in den Zeitverläufen für *Calliphora* TRPL und *Drosophila* TRPL-eGFP können verschiedene Ursachen haben. Zunächst ist zu beachten, dass zwei verschiedene Spezies verwendet wurden und die Wanderung der Kanalproteine artspezifische Unterschiede aufweisen könnte. Zum anderen könnte das eGFP-Anhängsel die Wanderung des Fusionsproteins (z.B. aufgrund der Größenzunahme) verzögern. Der Unterschied könnte aber auch methodischer Art sein. Die beiden Zeitverläufe wurden mit unterschiedlichen Methoden ermittelt. Für *Calliphora* TRPL wurde eine Methode angewendet, welche auf der spezifischen Aufreinigung

von rhabdomerischen Membranen beruht. Der TRPL-Gehalt in diesen Membranen kann biochemisch bestimmt werden. Bei *Drosophila* existiert diese Möglichkeit der spezifischen Aufreinigung von rhabdomerischen Membranen aufgrund ihrer geringen Größe nicht. Daher machte man sich die Fluoreszenz des TRPL-eGFP Fusionsproteins zunutze und kann anhand der Fluoreszenzintensität innerhalb und außerhalb der Rhabdomere den Gehalt an TRPL-eGFP ermitteln. Möglicherweise neigt diese optische Methode dazu, den rhabdomerischen Gehalt an TRPL-eGFP überzubewerten. Die Fluoreszenz von TRPL-eGFP Molekülen, die sich zwar außerhalb, aber sehr nah an den Rhabdomeren befinden, könnte in die Rhabdomere gelangen und dort aufgrund der Lichtleitereigenschaften der Rhabdomere eingefangen werden.

Die Tatsache, dass die beiden Prozesse, Internalisierung von TRPL-eGFP und dessen Einschleusung in die rhabdomerischen Membranen, unterschiedlich lange dauern, könnte darauf hindeuten, dass unterschiedliche Mechanismen für den Transport in die jeweilige Richtung vorliegen. Drei Typen von zytoplasmatischen Motorproteinen sind bekannt: Myosine, die entlang von Aktinfilamenten wandern, sowie Kinesine und Dyneine, die an Mikrotubuli zum Plus- bzw. Minusende hin entlangwandern [84]. Alle Motorproteine sind unidirektional und werden nach ihrer Polarität, also entsprechend der Richtung, in die sie transportieren, eingeteilt [57], [70]. Ein Transport von TRPL-eGFP in entgegengesetzte Richtungen mit Hilfe von Motorproteinen würde zwangsläufig mindestens zwei verschiedene Motorproteine mit entgegengesetzter Polarität erfordern. Welche Motorproteine dafür in Frage kämen hängt davon ab, ob der Transport entlang von Aktinfilamenten oder entlang der Mikrotubuli bewerkstelligt wird. Die Mikrovilli der Rhabdomere enthalten Aktinfilamente. Das Zytoskelett der Zelle setzt sich aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zusammen. Transportprozesse durch Motorproteine finden allerdings nur entlang von Aktinfilamenten und Mikrotubuli statt [118]. Es ist noch nicht bekannt, ob die Endozytose des TRPL bereits in den Rhabdomeren stattfindet und dann, zumindest zunächst, ein Transport durch Myosin entlang der Aktinfilamente der Rhabdomere erfolgen würde, oder ob das TRPL erst an der Basis der Rhabdomere endozytiert wird und im Zytosol der Zelle ein Transport entlang von Aktinfilamenten durch Myosin oder Mikrotubuli durch Dynein möglich wäre. Ein Transport durch das Zytosol der Zelle zu den Rhabdomeren hin wäre mit Hilfe von Myosin entlang von Aktinfilamenten oder mit Hilfe von Kinesin entlang der Mikrotubuli denkbar.

5.4 Rolle von Komponenten der Phototransduktionskaskade für die Wanderung von TRPL-eGFP

Die Translokation des TRPL-eGFP in den Photorezeptoren von *Drosophila* ist lichtabhängig. Zunächst galt es daher die Frage zu klären, ob diese Wanderung durch Komponenten der Phototransduktionskaskade in den Komplexaugen oder durch den Einfluss anderer lichtsensitiver Systeme, z.B. durch Cryptochrome, ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass in der *ninaE¹⁷*-Mutante, welche kein funktionelles Rhodopsin besitzt, die Internalisierung komplett inhibiert ist. Ein Einfluss der Degeneration der Photorezeptoren in dieser Mutante auf die Internalisierung konnte anhand der Untersuchung einer Mutante, die ein UV-sensitives Rhodopsin3 in den äußeren Photorezeptoren exprimiert, nicht bestätigt werden. Die Anwesenheit des Rhodopsins verhindert eine Degeneration und eine Internalisierung des TRPL-eGFP erfolgte erst nach Aktivierung des Rhodopsins durch UV-Belichtung. In der *ninaB¹*-Mutante, die den retinalen Chromophor nicht aus Carotinoiden bilden kann, zeigten sich variable Phänotypen, was die Translokation des TRPL-eGFP betrifft. Eine vollständige Internalisierung des TRPL-eGFP konnte jedoch nie beobachtet werden. Es ist möglich, dass individuelle *ninaB¹*-Fliegen sich im Gehalt an Rhodopsin, welches aus Carotinoid-unabhängigen Retinalquellen stammt, unterscheiden und aus diesem Grund unterschiedliche Phänotypen hinsichtlich der Translokation des TRPL-eGFP aufweisen können. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von Rhodopsin für die Internalisierung des TRPL-eGFP notwendig ist und identifizieren Rhodopsin als denjenigen Lichtsensor, welcher die Wanderung des Ionenkanals einleitet. Darüberhinaus legen die Daten den Schluss nahe, dass ständige Aktivierung eines kleinen Prozentsatzes an Rhodopsin durch Belichtung mit orangenem Licht oder durch geringe Restmengen an Rhodopsin in einigen Individuen der *ninaB¹*-Mutante ausreichend sind, um zumindest eine partielle Internalisierung des TRPL-eGFP einzuleiten.

Die beiden Arrestine, die in den Photorezeptorzellen von *Drosophila* vorhanden sind, erfüllen verschiedene Funktionen. Arrestin2, welches in den Photorezeptoren häufiger vorkommt, soll für die Inaktivierung von Rhodopsin zuständig sein und Arrestin1 soll die Internalisierung aktivierter Rhodopsinmoleküle vermitteln [128]. Die Anwesenheit von Arrestin1 verhindert durch die Eliminierung der stabilen Arrestin2/Metarhodopsin-Komplexe die Degeneration der Photo-

rezeptoren. Die Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung in der *arr2*-Mutante wird analog zum Inaktivierungsdefekt in der *arr1; arr2*-Doppelmutante verstärkt [33]. In der *arr1*-Mutante sind weder ein Inaktivierungsdefekt noch eine Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung zu beobachten.

Auch der Einfluss des visuellen G-Proteins auf die Translokation des TRPL-eGFP wurde untersucht. Nach Aktivierung des G-Proteins durch Metarhodopsin überträgt die α -Untereinheit das Signal zur Phospholipase C. Die *G α ¹*-Mutante produziert nur noch ca. 1% der Wildtyp-Menge an $G\alpha$ [130]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass geringe Mengen an $G\alpha$ ausreichen um eine vollständige Translokation von TRPL-eGFP zu bewirken. Wird jedoch ein Grenzwert in der Konzentration an $G\alpha$ unterschritten, so unterbleibt die TRPL-eGFP Wanderung vollständig. Dies könnte unter der Annahme, dass die $G\alpha$ -Menge von Zelle zu Zelle variiert erklären, warum in den meisten Photorezeptorzellen dieser Mutante eine vollständige lichtabhängige Internalisierung stattfindet, während sie in einigen Zellen vollständig unterbleibt. Diese Hypothese konnte mit Hilfe einer Mutante, die das mutierte *G α* -Allel über einer Deletion trägt, weiter erhärtet werden. In dieser Fliege, die eine noch geringere Menge an $G\alpha$ aufweist als die *G α ¹*-Mutante, unterbleibt eine Internalisierung des TRPL-eGFP in den meisten Photorezeptorzellen. Es gibt aber auch in dieser Mutante Photorezeptoren, in denen TRPL vollständig internalisiert wird. Die Menge an $G\alpha$ in den Photorezeptorzellen scheint also mit der Internalisierung des TRPL-eGFP zu korrelieren. Allerdings genügt nicht einmal diese drastische Erniedrigung der Menge an G-Protein um die Internalisierung des TRPL-eGFP in allen Zellen zu verhindern. Höchstwahrscheinlich ist eine komplette Eliminierung von Gq notwendig, um die Internalisierung von TRPL-eGFP komplett zu blockieren. Analog dazu konnte auch für die Phospholipase gezeigt werden, dass nur eine starke Reduktion der Proteinmenge die Wanderung des TRPL-eGFP verhindern kann. Die $G\alpha$ -Menge muss allerdings sehr viel stärker reduziert sein als die Menge an Phospholipase.

Für den zweiten Ionenkanal in den Photorezeptoren von *Drosophila*, TRP, konnte anhand verschiedener Mutanten gezeigt werden, dass dessen Funktion für eine Wanderung des TRPL-eGFP benötigt wird. Sowohl in der *trp*-Mutante, als auch in denjenigen Mutanten, die die Funktion des TRP negativ beeinflussen, war keine Internalisierung des TRPL-eGFP zu beobachten.

In der Mutante *trp*^{P365}, die konstitutiv aktive TRP-Kanäle aufweist, befand sich das TRPL-eGFP ungeachtet der Lichtbedingungen immer außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper. Dies ist beim Wildtyp nur in belichteten Fliegen der Fall. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des TRP zu einer Lokalisation des TRPL-eGFP im Zellkörper führen kann.

5.4.1 Diskrepanzen bei der Internalisierung von TRPL-eGFP und TRPL

In einer früheren Studie ist gezeigt worden, dass natives TRPL in den Mutanten *norpA*³⁶ und *inaD*¹ einer lichtabhängigen Wanderung unterliegt [7]. Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Wanderung von nativem TRPL und TRPL-eGFP in *norpA*³⁶ und jungen *inaD*¹-Mutanten gibt, wurde die Lokalisation von nativem TRPL und TRPL-eGFP gleichzeitig auf Schnitten durch die Augen dieser Mutanten mittels Immunocytochemie überprüft. In lichtadaptierten *norpA*³⁶-Fliegen war TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert, wohingegen natives TRPL hauptsächlich im Zellkörper detektiert werden konnte [86]. In der lichtadaptierten *inaD*¹-Mutante konnte eine gewisse Wanderung von TRPL-eGFP beobachtet werden, während natives TRPL vollständig in den Zellkörper wanderte [86].

Diese Diskrepanz könnte durch einen höheren Schwellenwert für die TRPL-eGFP Wanderung im Vergleich zu nativem TRPL erklärt werden. Sowohl die *norpA*³⁶- als auch die *inaD*¹-Mutante zeigen eine sehr geringe Aktivierung der Phototransduktionskaskade [121], [147], was ausreichend zu sein scheint um eine Wanderung des nativen TRPL auszulösen. Folglich scheint die Wanderung von TRPL-eGFP eine etwas stärkere Aktivierung der Phototransduktionskaskade zu benötigen. Trotz dieser Diskrepanz in *norpA*- und *inaD*-Mutanten kann der eGFP-markierte TRPL-Kanal effektiv verwendet werden um den Mechanismus, welcher dieser Wanderung unterliegt, aufzuklären.

5.5 Mögliche Mechanismen der TRPL Wanderung

Die vorgenommenen Untersuchungen an den verschiedenen *Drosophila*-Mutanten dienen dem Zweck, den Wanderungsmechanismus des TRPL-Kanals aufzuklären. Dabei ist die Identifikation des auslösenden Signals, welches die spezifische Internalisierung von TRPL einleitet, wichtig für das Verständnis der TRPL-Wanderung. Ein möglicher auslösender Mechanismus könnte die lichtabhängige Aktivierung der TRPL-Kanäle selbst sein. Dies könnte zu einer Kon-

formation der Ionenkanäle führen, welche für die Internalisierung empfänglich ist. Eine andere Möglichkeit wäre die Aktivierung der TRPL-Internalisierung durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die aus dem Ca^{2+} -Einstrom durch aktivierte TRP-Kanäle resultiert. Denkbar wäre auch eine Internalisierung von TRPL gemeinsam mit Rhodopsin in einem Arr1-abhängigen Weg. Das Ergebnis, dass funktionales Rhodopsin für die Internalisierung von TRPL-eGFP benötigt wird, deckt sich mit allen drei Hypothesen. Da die Aktivierung eines geringen Anteils an Rhodopsinmolekülen durch Orangelicht in Wildtypfliegen für eine maximale Internalisierung des TRPL-eGFP ausreicht, und da die Internalisierung von TRPL-eGFP durch die geringen Restmengen an Rhodopsin in der *ninaB*-Mutante ausgelöst werden kann, erscheint es aber unwahrscheinlich, dass diese Internalisierung von TRPL-eGFP durch eine Kointernalisierung mit Rhodopsin erreicht wird.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass eine Aktivierung von Signalproteinen wie $\text{G}\alpha_q$, $\text{PLC}\beta$ und TRP, welche in der Phototransduktionskaskade dem Rhodopsin nachgeordnet agieren, essentiell für die TRPL-eGFP Wanderung sind. Trotzdem löst die Aktivierung schon eines geringen Prozentsatzes dieser Signalmoleküle eine vollständige Wanderung des TRPL-eGFP aus. Aufgrund der großen Mengen an Signalproteinen in der Photorezeptorzelle [54] und der drastischen Verstärkung der Phototransduktion, ist die Aktivierung schon eines relativ geringen Anteils der Signalmoleküle ausreichend, um nahezu gesättigte Lichtantworten durch Öffnung der TRP-Kanäle zu induzieren. In der *trp*-Nullmutante und in Mutanten, die die Funktion von TRP beeinträchtigen, wie z.B. *inaD*¹ und *inaF*^{P106x}, findet keine TRPL-eGFP Translokation statt. Daher scheint eine Aktivierung von TRPL allein nicht ausreichend und möglicherweise nicht einmal erforderlich für seine Internalisierung zu sein, vielmehr muss der zweite Ionenkanal, TRP, aktiviert werden. Die Lokalisation von TRPL-eGFP im Zellkörper ungeachtet der Lichtbedingungen in einer Mutante, die konstitutiv aktives TRP exprimiert (*trp*^{P365}), deutet darauf hin, dass die Aktivität von TRP, unabhängig von der Aktivierung der Phototransduktionskaskade und unabhängig von der Aktivierung des TRPL-Kanals, die Wanderung des TRPL-eGFP in den Zellkörper verursacht. Ein Anwachsen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch TRP-Kanäle während der Belichtung ist daher ein attraktiver Auslösemechanismus für die TRPL-Wanderung, welcher mit allen Beobachtungen im Einklang steht.

Um den Mechanismus, durch den TRPL-eGFP von den Rhabdomeren in den Zellkörper transportiert wird, weiter aufzuklären, wurde die mögliche Erfordernis von Dynamin und dem Myosin III NINAC für die TRPL-eGFP Wanderung untersucht. Dynamin ist entscheidend für die Abschnürung von Vesikeln von der Plasmamembran in mehreren endozytotischen Signalwegen [26]. Vesikuläre Internalisierungswege können allerdings auch Dynamin-unabhängig sein. Zum Beispiel sind für die Endozytose von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Dynamin-abhängige und Dynamin-unabhängige Signalwege beschrieben [107], [149], [157]. Die Internalisierung von TRPL-eGFP wird in einer temperatursensitiven *shi*-Mutante bei der restriktiven Temperatur nicht beeinflusst, was nahelegt, dass die TRPL-eGFP Wanderung Dynamin-unabhängig ist. Darüberhinaus kann ein gewisser Defekt der Internalisierung von TRPL-eGFP in einer Mutante, die kein Myosin III besitzt (*ninaC⁵*), festgestellt werden. Die Wanderung in die entgegengesetzte Richtung allerdings ist in dieser Mutante nicht beeinträchtigt. Da Myosin III nur zum Plus-Ende der Aktinfilamente hin transportiert und das Plus-Ende der Aktinfilamente zur Spitze der Mikrovilli hin orientiert ist [76], ist es nicht plausibel, dass dieses Myosin den Transport von Proteinen aus dem Rhabdomer hinaus vermittelt. Daher ist es wahrscheinlich, dass sekundäre Defekte der *ninaC*-Mutante, wie Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und retinale Degeneration, für diesen Wanderungsdefekt verantwortlich sind [56], [85].

Neben TRPL unterliegen mindestens drei weitere Proteine der Phototransduktionskaskade von *Drosophila*, Arrestin1, Arrestin2 und das visuelle $G\alpha_q$, einer lichtabhängigen Wanderung zwischen Rhabdomer und Zellkörper [18], [67], [69], [76], [77], [128]. Auch für Dmoesin wurde kürzlich eine lichtabhängige Translokation beschrieben [23]. In dunkeladaptierten Fliegen liegt das G-Protein als Heterotrimer vor, welches über Prenylreste in der rhabdomerischen Membran verankert ist. Nach Lichtabsorption aktiviert Metarhodopsin (lichtaktivierter Zustand von Rhodopsin) das G-Protein durch die Katalyse des Austausches von GDP durch GTP. Die $G\alpha$ -Untereinheit löst sich von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert seinerseits die Phospholipase $C\beta$. Die $G\alpha$ -Untereinheit wird daraufhin depalmitoyliert und wandert ins Zytosol. Die inaktivierte $G\alpha$ -Untereinheit wandert in einem $\beta\gamma$ -abhängigen Prozess wieder zum Rhabdomer wo sie erneut palmitoyliert und in der Membran verankert wird [69].

Das visuelle Arr2 ist notwendig für die Inaktivierung des Metarhodopsin. Es bindet auf Belichtung hin an aktiviertes Metarhodopsin [10] und ist daher in lichtadaptierten Fliegen mit den Rhabdomeren assoziiert. Da in dunkeladaptierten Fliegen kein Metarhodopsin vorhanden ist befindet sich das Arr2 im Zytosol und ist nicht mit den Rhabdomeren assoziiert. Arr1 ist essentiell für die lichtinduzierte Endozytose der Arr2/Metarhodopsinkomplexe und unterliegt daher auch einer Translokation. Der Mechanismus der lichtabhängigen Translokation für Arrestin wird kontrovers diskutiert. Beim Arr2 herrscht keine Einigkeit darüber, ob es durch einen Myosinmotor entlang des Aktinzytoskeletts zu den Rhabdomeren transportiert wird [76], [77] oder nicht [128]. Die Wanderung des Arr1 zu den Rhabdomeren scheint unabhängig von Myosin bewerkstelligt zu werden [128]. Es gibt Evidenzen dafür, dass die C-terminale Phosphorylierung des Rhodopsins, die für dessen lichtinduzierte Internalisierung essentiell ist [153], auch eine Rolle bei der Wanderung des Arr1 spielt [128]. Das Entfernen von Arrestin aus den rhabdomerischen Membranen bei Dunkelheit benötigt keine Elemente des Zytoskeletts und scheint daher passiv zu geschehen [76].

Auch in Vertebraten Photorezeptoren wandern Arrestin und das visuelle G-Protein Transducin zwischen dem Innen- und Außensegment in einer lichtabhängigen Art und Weise hin und her [5]. In beiden Systemen wandern Arrestin und G-Protein in entgegengesetzte Richtungen. Im Licht reichert sich Arrestin in der Photorezeptormembran an, während sich das G-Protein dort vermindert und *vice versa* im Dunkeln. Dementsprechend machen diese lichtabhängigen Wanderungen von visuellen Signalproteinen den Photorezeptor im Dunkeln empfindlicher und weniger empfindlich im Licht und vermitteln auf diese Weise eine Langzeitadaptation der visuellen Systeme von *Drosophila* und von Vertebraten [77], [139]. Ein drittes Protein, welches im visuellen System von Vertebraten wandert, ist das Ca²⁺-bindende Protein Recoverin [142]. Die Wanderung von Recoverin könnte ebenfalls zur Adaptation der Photorezeptoren beitragen. Sie reduziert die hemmende Wirkung, welche Recoverin auf die Rhodopsinkinase ausübt. Die Rhodopsinkinase ihrerseits spielt eine Rolle bei der Deaktivierung von Metarhodopsin.

Dmoesin gehört zur Familie der ERM- (Ezrin, Radixin, Moesin) Proteine, es ist das einzige Mitglied dieser Proteinfamilie in *Drosophila*. ERM-Proteine sind hoch homolog und wurden zuerst bei Wirbeltieren entdeckt. Für ERM-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie sowohl an F-Aktin, als auch an Membranproteine binden [31], [145], [146]. Auf diese Weise sind sie in der Lage, Interaktionen zwischen dem Aktin-Zytoskelett und Membranen signalabhängig zu

vermitteln [81], [117]. Dmoesin liegt in dunkeladaptierten Fliegen in der phosphorylierten Form gebunden an die Kanäle TRP und TRPL vor. Die Belichtung von dunkeladaptierten Fliegen führt dazu, dass Dmoesin dephosphoryliert wird, von den lichtsensitiven Kanälen TRP und TRPL dissoziiert und von der Membran ins Zytosol wandert [23]. Darüberhinaus ist Dmoesin notwendig für den korrekten Aufbau der Rhabdomere während der Augenentwicklung [63].

Die Wanderung von Arr1 zu den Rhabdomeren scheint unabhängig von NINAC zu sein [128], wohingegen es für das Arr2 unterschiedliche Meinungen darüber gibt, ob der Transport durch NINAC erfolgt oder nicht [76], [77], [128]. Die Wanderung von Gq α in die Rhabdomere benötigt NINAC [28], [69]. Der reziproke Transport von Arr2 oder Gq α aus den Rhabdomeren hinaus ist nicht abhängig von NINAC. Für TRPL konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Transport zu den Rhabdomeren hin unabhängig von NINAC ist. Diese offensichtlichen Unterschiede in den Transportmechanismen für TRPL und die Arrestine bzw. Gq α lassen sich damit erklären, dass TRPL im Gegensatz zu Arrestinen und G α ein integrales Membranprotein ist welches nicht in die lösliche Fraktion übergehen kann. TRPL muss demnach durch einen vesikulären Transportmechanismus in die Zelle transportiert werden, wohingegen Arrestin und G α q von einem membranassoziierten in einen löslichen Zustand überwechseln können.

5.6 Mutagenese-Screen

Der genetische Screen wurde durchgeführt, um neue Mutanten zu identifizieren, bei denen die Translokation des TRPL-eGFP inhibiert ist. Langfristig könnten so durch die Identifikation der Proteine, welche mutiert wurden, neue Einblicke in den Mechanismus dieser Wanderung gewonnen werden. Die für den Mutagenese-Screen benötigten Mutanten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt und getestet. Aus allen Kreuzungen gingen Nachkommen mit Mosaikaugen hervor. Die Effizienz der eyFlp wird deutlich anhand des großen Anteils der rekombinanten Klone (homozygot für die induzierte Mutation) in den Mosaikaugen.

Für die Chromosomenarme 2L und 3R wurden zusammen fast 5000 Fliegen mutagenisiert, aus denen schließlich sechs Mutanten hervorgegangen sind. Die Anzahl der zunächst mit Hilfe der Pseudopupille isolierten potentiellen Mutanten beläuft sich auf 48, davon entfallen 37 auf den Chromosomenarm 2L und elf auf den Chromosomenarm 3R. Obwohl die Anzahl für den Chromosomenarm 2L deutlich höher ist, wurden hier absolut wie auch prozentual weniger stabile Mutanten isoliert als für den Chromosomenarm 3R. Das liegt daran, dass aufgrund der Erfahrungen aus dem Screen von 2L, der zuerst durchgeführt wurde und eine hohe Zahl an falsch positiven Mutanten erbrachte, beim Screen von 3R wesentlich stringenter Bedingungen bei der Beurteilung der Pseudopupille angelegt wurden. Bei diesem zweiten Screen zeigten fast die Hälfte (45,5%) der zunächst isolierten potentiellen Mutanten auch in der nächsten Generation den TRPL-eGFP Wanderungsdefekt. Ein Grund für die Tatsache, dass für den Chromosomenarm 3R mehr Mutanten mit einem Defekt in der TRPL-eGFP Wanderung isoliert wurden, könnte auch darin bestehen, dass auf diesem Chromosomenarm mehr Gene liegen, deren Mutation die Translokation des TRPL-eGFP beeinflusst als auf 2L.

Die Tabelle 5-1 fasst alle sechs Mutanten zusammen, die aus den beiden Screens der Chromosomenarme 2L und 3R hervorgegangen sind. Dabei fällt zunächst auf, dass in allen Mutanten die Mutation, die den Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP auslöst, rezessiv ist. Das bedeutet, dass sich der entsprechende Phänotyp, nämlich die Inhibierung der TRPL-eGFP Wanderung nur in den Mutanten auswirkt, die zwei dieser rezessiven Allele tragen. Das ist der Fall in Mosaikfliegen, die in großen Bereichen der Augen homozygot für die betreffende Mutation sind, und, soweit vorhanden, in den homozygoten Fliegen. Die heterozygoten Fliegen zeigen alle eine dem Wildtyp entsprechende Wanderung des TRPL-eGFP. Sie tragen ein mutiertes Allel und ein Wildtyp-Allel des betreffenden Gens. Der Phänotyp ist in den heterozygoten Fliegen wahrscheinlich deshalb nicht ausgeprägt, weil Wildtyp-Allele in aller Regel dominant über mutierte Allele sind. Daher ist es rein statistisch wahrscheinlicher, durch die Mutagenese rezessive Mutationen zu induzieren als dominante. Durch mutagene Substanzen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, werden typischerweise solche Mutationen eingeführt, die die Funktion des entsprechenden Gens reduzieren oder sogar ganz ausschalten („*loss-of-function*“) [125]. Durch die Einführung einer Mutation ist die Möglichkeit, ein Gen in seiner Funktion abzuschwächen oder die Funktion komplett zu zerstören wahrscheinlich, da es für die Entstehung solcher „*missense*“- oder „*nonsense*“-Mutationen viele verschiedene Möglichkeiten gibt, wie z.B. ein verfrühtes Stop-Codon oder eine falsche Faltung des Proteins aufgrund eines

Aminosäureaustausches, was zum Verlust der Funktion führen kann. Die genaue Position spielt dabei in der Regel eher eine untergeordnete Rolle. Mutationen, welche die Genfunktion verstärken („*gain-of-function*“), sind viel seltener [125], da nur eine spezifische Mutation an der richtigen Stelle einen solchen Effekt hätte.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung aller Mutanten aus dem Mutagenese-Screen mit TRPL-eGFP Wanderungsdefekt.

Mutante	Art der Mutation	homozygot lebensfähig?	Besonderheiten
NM(2L)4.52	rezessiv	nein	-
NM(3R)5.5	rezessiv	nein	-
NM(3R)5.8	rezessiv	nein	„ <i>rough eyes</i> “
NM(3R)6.4	rezessiv	ja	regionale Effekte
NM(3R)6.5	rezessiv	ja	-
NM(3R)6.6	rezessiv	ja	regionale Effekte

Der Befund, dass die isolierten Mutationen rezessiv sind, ist im Einklang mit den Ergebnissen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit. Die Mutationen von z.B. Phototransduktionsproteinen, die die TRPL-eGFP Wanderung inhibieren sind ebenfalls meist rezessiv. Der einzige Fall einer dominanten Mutation in der vorliegenden Arbeit, die im heterozygoten Organismus die Wanderung des TRPL-eGFP beeinflusst ist die Mutante *trp*^{P365}. Diese Fliegen exprimieren einen konstitutiv aktiven TRP-Kanal der ungeachtet der Lichtbedingungen immer geöffnet ist. Diese Mutation wirkt sich auf die Translokation des TRPL-eGFP dominant-negativ aus, d.h. schon die Mutation eines Allels löst diesen Phänotyp aus. In diesem Fall ist das mutierte Allel dominant über das Wildtyp-Allel.

Die Tabelle 5-1 zeigt außerdem, dass drei der Mutanten homozygot lebensfähig sind und drei homozygot lethal. Im letzteren Fall sind wahrscheinlich Gene betroffen, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen oder in elementare Funktionen der Zellen involviert sind. Das muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass die Mutation, die lethal ist, auch den Wanderungsdefekt verursacht. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Mutagenese mehrere Punktmutationen pro Chromosomenarm eingeführt wurden. Die Konzentration, in der das Mutagen EMS hier eingesetzt wurde, beträgt 25mM. Bei dieser Konzentration beträgt die Mutationsrate für ein Gen durch-

schnittlicher Länge ungefähr eins von 1000 [40]. Allerdings variiert die Mutationsrate in der Praxis stark. Sie ist unter anderem auch abhängig davon, wie viel EMS von den einzelnen Fliegen aufgenommen wird. Die Möglichkeit, dass die Lethalität und der Wanderungsdefekt auf ein und dasselbe Gen zurückzuführen sind, besteht aber. Das könnte z.B. der Fall sein, wenn grundlegende Transportprozesse oder die Ausbildung des Zytoskeletts betroffen sind. Solche Mutationen sind oft lethal und könnten einen Transport des TRPL-eGFP entlang des Zytoskeletts verhindern. Auch bei den Mutanten, welche homozygot lebensfähig sind, könnten im Rahmen der Mutagenese mehrere Mutationen eingeführt worden sein.

Drei der Mutanten weisen spezielle Besonderheiten auf. Die Mutante NM(3R)5.8 hat einen rauhe Augen-Phänotyp („*rough eyes*“). Die Oberfläche der Augen ist rauh durch eine Desorganisation der sonst regelmäßigen Anordnung der Ommatidien. Dieser Phänotyp tritt häufig bei Mutagenese-Screens auf, denen Augenphänotypen zugrunde liegen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass im Rahmen des hier durchgeführten Screens auch Mutanten, die diesen Phänotyp aufweisen, erzeugt werden. Eine andere Besonderheit weisen die beiden Mutanten NM(3R)6.4 und NM(3R)6.6 auf. Die lichtadaptierten homozygoten Fliegen weisen Arreale auf, in denen geringere Mengen an TRPL-eGFP in den Rhabdomeren vorhanden sind, als im Rest des Auges. Das könnte zum einen daran liegen, dass in diesen Bereichen sich der Großteil des TRPL-eGFP außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper befindet. Die Wasserimmersionsbilder lassen allerdings eher den Schluss zu, dass dem nicht so ist, da die Zellkörper in diesen Bereichen nicht stärker grün fluoreszieren als in den Bereichen, in denen TRPL-eGFP in den Rhabdomeren lokalisiert ist. Eine andere Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Menge an TRPL-eGFP, die in den einzelnen Photorezeptorzellen vorhanden ist, in diesen Arrealen niedriger ist als im Rest des Auges. Die entsprechenden Mutationen könnten in diesen Bereichen des Auges die Expression des *trpl-eGFP*-Gens, oder die Menge an mRNA bzw. Protein negativ beeinflussen. Diese Unterschiede betreffen in diesem Fall nicht einzelne Photorezeptorzellen der Ommatidien wie z.B. in der *Gaq¹*-Mutante, sondern ganz bestimmte Regionen im Auge. Es ist bekannt, dass es aufgrund von Spezialisierung in den Komplexaugen verschiedener Tiere bestimmte Regionen gibt, die sich in ihrer Anatomie und/oder ihren physiologischen Eigenschaften vom Rest des Auges unterscheiden. Beispiele hierfür sind z.B. die Ommatidien der dorsalen Randregion („*dorsal rim area*“) in den Komplexaugen vieler Insekten [30], [72], [152] oder der sogenannte „*love spot*“ in der fronto-dorsalen Retina männlicher Stubenfliegen [59].

5.7 Deletionskartierung

Im Rahmen der Deletionskartierung der Mutante NM(2L)4.52 konnten bestimmte Bereiche auf dem Chromosomenarm 2L isoliert werden, die für die Lokalisation der induzierten Mutationen in Frage kommen. Vier Loci wurden anhand von Kreuzungen der Mutante mit Fliegen des Deletionskits identifiziert und die restlichen Bereiche ergeben sich aus den Teilen, die durch den Deletionskit nicht abgedeckt werden. Es handelt sich nur um gut 5% des Chromosomenarms 2L, die durch den Kit nicht abgedeckt sind.

In die Mutante NM(2L)4.52 wurden bei der Mutagenese wahrscheinlich mindestens vier lethale Mutationen eingeführt. Dies ergibt sich aus den Kreuzungen der Mutante mit den vier Deletionsstämmen 693, 2414, 2583 und 5869. Fliegen des Typs Deletion über Mutation aus allen vier Kreuzungen waren in der F1-Generation nicht vorhanden. Dies ist eine starke Evidenz dafür, dass im Bereich dieser vier Deletionen lethale Mutationen eingeführt wurden. Die Mutante selbst ist homozygot lethal und wenn die lethale Mutation im Bereich der Deletion zu liegen kommt, entspricht das dem homozygoten Phänotyp. Kommt die lethale Mutation außerhalb der Deletion zu liegen so entspricht diese Situation dem heterozygoten Phänotyp. Ein unmutiertes Allel des betroffenen Gens ist in der F1-Generation vorhanden und rettet den lethalen Phänotyp. Da die Mutation lethal ist und Fliegen des Typs Deletion über Mutation in der F1-Generation nicht vorhanden sind, kann in diesem Fall nicht überprüft werden, ob einer dieser vier Bereiche auch die Mutation enthält, die den Wanderungsdefekt des TRPL-eGFP auslöst. Wanderungsdefekt und Lethalität können durchaus von derselben Mutation ausgelöst werden. Dies könnte der Fall sein, wenn grundlegende Funktionen der Zelle, wie z.B. generelle vesikuläre Transportprozesse, durch die Mutation gestört werden.

Aus den Kreuzungen der Mutante NM(2L)4.52 mit den Deletionsstämmen 3638 und 4956 ergab sich, dass in den Weibchen (rotäugig) der F1-Generation keine Wanderung des TRPL-eGFP stattfand, in den Männchen (weißäugig) allerdings schon. Derselbe Befund zeigte sich auch in der F1-Generation aus den Kreuzungen dieser beiden Deletionsstämme mit unmutierten Fliegen. Daraus ergibt sich, dass dieser Effekt unabhängig von der durch die Mutagenese induzierten Mutationen ist. Um festzustellen, ob ein unspezifischer Defekt z.B. im Stoffwechsel der zur Mutagenese verwendeten Fliegen die Wanderung des TRPL-eGFP inhibiert, wurden die beiden Deletionsstämme mit Fliegen gekreuzt, die TRPL-eGFP im Wildtyp-Hintergrund expri-

mieren. Bei der Kreuzung des Deletionsstammes 4956 mit diesen Fliegen zeigten die Weibchen der F1-Generation ebenfalls keine Wanderung des TRPL-eGFP. Hier bei scheint es sich um einen unspezifischen Effekt zu handeln, der möglicherweise von der Fliege, die die Deletion trägt, hervorgerufen wird. Da es Unterschiede im Wanderungsdefekt zwischen Männchen und Weibchen gibt, könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich auf dem X-Chromosom der Deletionsfliegen eine bisher noch nicht beschriebene Mutation befindet, die die Wanderung des TRPL-eGFP dominant stört. Im anderen Fall der Kreuzung des Deletionsstammes 3638 mit diesen Fliegen konnte eine Translokation des TRPL-eGFP beobachtet werden. Hier kann nicht der Deletionsstamm der Auslöser des Wanderungsdefektes sein. Möglicherweise handelt es sich hier um einen unspezifischen Effekt, den die FRT-Fliegen auf die Translokation des TRPL-eGFP haben. Die FRT-Fliegen sind weniger vital als Wildtyp-Fliegen. Sie vermehren sich schlechter und sind auch empfindlicher gegenüber Veränderungen der Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit (eigene Beobachtungen). Die Ursachen dafür sind bis jetzt noch nicht bekannt, sie könnten aber in einem speziellen genetischen Hintergrund auch einen Einfluss auf die Wanderung des TRPL-eGFP haben.

Die Gene *arr1* und *ninaC* liegen auf dem Chromosomenarm 2L. Die Mutanten *arr1*¹ und *ninaC*⁵ wurden neben anderen im Rahmen dieser Arbeit auf ihren Einfluss auf die TRPL-eGFP Wanderung getestet. Das *arr1*-Gen ist bei 36E3 lokalisiert und das *ninaC*-Gen bei 27F3. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen aus der Deletionskartierung, so kann anhand dessen ausgeschlossen werden, dass eine Mutation im *arr1*-Gen für den TRPL-eGFP Wanderungsdefekt verantwortlich ist. Außerdem ist in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden, dass eine Mutation im *arr1*-Gen die Wanderung des TRPL-eGFP ohnehin nicht verhindern würde. Die Bruchpunkte der Deletion des Stammes 420 aus dem Deletionskit werden mit 36C2-4; 37B9-C1 angegeben. Damit ist der Locus, an dem sich das *arr1*-Gen befindet, von dieser Deletion abgedeckt. Da in der F1-Generation der Mutante NM(2L)4.52 mit diesem Stamm Fliegen des Typs Deletion über Mutation vorhanden waren und dieser eine Translokation des TRPL-eGFP zeigt, ist davon auszugehen, dass im Bereich dieser Deletion keine Mutation in die Mutante eingeführt wurde, die die TRPL-eGFP Wanderung negativ beeinflusst oder lethal ist. Anders verhält es sich mit dem *ninaC*-Gen. Der Locus, an dem sich dieses Gen befindet, wird vom Fliegenstamm 2414 aus dem Deletionskit abgedeckt. Die Bruchpunkte dieser Deletion werden mit 27C1-2; 28A angegeben. Aus den Ergebnissen der Deletionskartierung ergab sich, dass im Bereich der Deletion dieses Fliegenstammes mindestens eine lethale Mutation induziert wurde. Es könnten

auch mehrere Mutationen im Bereich dieser Deletion eingeführt worden sein, die nicht alle lethal sein müssen. Eine dieser Mutationen könnte im Bereich des *ninaC*-Gens liegen. Um dies zu testen, wurde die Mutante NM(2L)4.52 mit der *ninaC*⁵-Mutante gekreuzt. Wären beide Mutationen im *ninaC*-Gen lokalisiert, so sollte der Wanderungsdefekt in den Fliegen der F1-Generation nach wie vor bestehen. In diesen Fliegen wandert das TRPL-eGFP aber dem Wildtyp entsprechend, d.h. der Wanderungsdefekt wird komplementiert. Anhand dieser Komplementationsanalyse lässt sich feststellen, dass sich die Mutationen in diesen beiden Fliegen nicht auf demselben Gen befinden, und damit kann ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Mutagenese in der Mutante NM(2L)4.52 das *ninaC*-Gen mutiert wurde.

Literaturverzeichnis

- [1] Acharya JK, Jalink K, Hardy RW, Hartenstein V, Zuker CS (1997). *InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila**. *Neuron* 18, 881-887.
- [2] Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J,

- Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- [3] Alloway PG, Howard L, Dolph PJ (2000). The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. *Neuron* 28, 129-138.
- [4] Amiri H, Schultz G, Schaefer M (2003). FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* 33, 463-470.
- [5] Arshavsky VY (2003). Protein translocation in photoreceptor light adaptation: a common theme in vertebrate and invertebrate vision. *Sci STKE*, PE43.
- [6] Bähner M (2001). Ionenkanäle im mikrovillären Photorezeptor: TRP, TRPL und ihre Organisation im INAD-Signalkomplex. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- [7] Bähner M, Frechter S, Da Silva N, Minke B, Paulsen R, Huber A (2002). Light-regulated subcellular translocation of the *Drosophila* TRPL channel induces long-term adaptation and modifies the light-induced current. *Neuron* 34, 83-93.
- [8] Bähner M, Sander P, Paulsen R, Huber A (2000). The visual G protein of fly photoreceptors interacts with the PDZ domain assembled INAD signaling complex via direct binding of activated Galpha(q) to phospholipase cbeta. *J Biol Chem* 275, 2901-2904.
- [9] Bennett V (1992). Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J Biol Chem* 267, 8703-8706.

- [10] Bantrop J, Plangger A, and Paulsen R (1993). An arrestin homolog of blowfly photoreceptors stimulates visual-pigment phosphorylation by activating a membrane-associated protein kinase. *Eur J Biochem* 216, 67-72.
- [11] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- [12] Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A and Clapham D (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6, 709-720.
- [13] Blair SS (2003). Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development* 130, 5065-5072.
- [14] Bloomquist BT, Shortridge RD, Schneuwly S, Perdew M, Montell C, Steller H, Rubin G, Pak WL (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 54, 723-733.
- [15] Boels K, Glassmeier G, Herrmann D, Riedel IB, Hampe W, Kojima I, Schwarz JR, Schaller HC (2001). The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC. *J Cell Sci* 114, 3599-3606.
- [16] Bryant PJ, Zornetzer M (1973). Mosaic analysis of lethal mutations in *Drosophila*. *Genetics* 75, 623-627.
- [17] Burton BG, Tatler BW, Laughlin SB (2001). Variations in photoreceptor response dynamics across the fly retina. *J Neurophysiol* 86, 950-960.
- [18] Byk T, Bar-Yaacov M, Doza YN, Minke B, Selinger Z (1993). Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the fly photoreceptor cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1907-1911.
- [19] Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2, 315-324.

- [20] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- [21] Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobel GC (2003). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394-1397.
- [22] Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nussler R, Lefkowitz RJ (2003). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391-1394.
- [23] Chorna-Ornan I, Tzarfaty V, Ankri-Eliahoo G, Joel-Almagor T, Meyer NE, Huber A, Payre F, Minke B (2005). Light-regulated interaction of Dmoesin with TRP and TRPL channels is required for maintenance of photoreceptors. *J Cell Biol* 171, 143-152.
- [24] Chyb S, Raghu P, Hardie RC (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397, 255-259.
- [25] Clapham DE, Runnels LL, Strübing C (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2, 387-396.
- [26] Conner SD, Schmid SL (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- [27] Cook B, Bar-Yaacov M, Cohen Ben-Ami H, Goldstein RE, Paroush Z, Selinger Z, Minke B (2000). Phospholipase C and termination of G protein-mediated signalling *in vivo*. *Nature Cell Biol* 2, 296-301.
- [28] Cronin MA, Diao F, Tsunoda S (2004). Light-dependent subcellular translocation of Gq-alpha in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC. *J Cell Sci* 117, 4797-4806.
- [29] Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20, 448-455.

- [30] Dacke M, Nordström P, Scholtz CH, Warrant EJ (2002). A specialized dorsal rim area for polarized light detection in the compound eye of the scarab beetle *Pachysoma striatum*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188, 211-216.
- [31] Denker SP, Huang DC, Orłowski J, Furthmayr H, Barber DL (2000). Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell* 6, 1425-1436.
- [32] Dow JAT, Davies SA (2003). Integrative physiology, functional genomics and epithelial function in a genetic model organism. *Physiol Rev* 83, 687-729.
- [33] Dolph PJ, Ranganathan R, Colley NJ, Hardy RW, Socolich M, Zuker CS (1993). Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin *in vivo*. *Science* 260, 1910-1916.
- [34] Estacion M, Sinkins WG, Schilling WP (2001). Regulation of *Drosophila* transient receptor potential-like (TrpL) channels by phospholipase C-dependent mechanisms. *J Physiol* 530, 1-19.
- [35] Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismar D, Rubin GM, Smith DP, Socolich M, Zuker CS (1992). Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J Neurosci* 12, 3862-3868.
- [36] Gerdes HH, Kaether C (1996). Green fluorescent proteins: applications in cell biology. *FEBS Lett* 389, 44-47.
- [37] Golic K (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* 252, 958-961.
- [38] Golic KG and Lindquist S (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509.

- [39] Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A (1980). Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res* 8, r49-r62.
- [40] Greenspan RJ. Fly pushing: The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1997.
- [41] Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* 120, 107-114.
- [42] Haas J, Park EC, Seed B (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* 6, 315-324.
- [43] Hardie RC (1985). Functional organization of the fly retina. *Progress in Sensory Physiology* 5. Autrum, H., Ottoson, H.D, Perl, E.R., Schmidt R.F., Shimazu, H., and Willis, W.D. (eds.). Springer Verlag, New York, 1-79.
- [44] Hardie RC (1996). INDO-1 measurements of absolute resting and light-induced Ca^{2+} concentration in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 16, 2924-2933.
- [45] Hardie RC (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 204, 3403-3409.
- [46] Hardie R (2002). Adaptation through translocation. *Neuron* 34, 3-5.
- [47] Hardie RC (2003). Regulation of the TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* 65, 735-759.
- [48] Hardie RC (2003). Phototransduction: shedding light on translocation. *Curr Biol* 13, R775-777.

- [49] Hardie RC, Gu Y, Martin F, Sweeney ST, Raghu P (2004). *In vivo* light-induced and basal phospholipase C activity in *Drosophila* photoreceptors measured with genetically targeted phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive ion channels (Kir2.1). *J Biol Chem* 279, 47773-47782.
- [50] Hardie RC, Peretz A, Pollock JA, Minke B (1993). Ca^{2+} limits the development of the light response in *Drosophila* photoreceptors. *Proc Biol Sci* 252, 223-229.
- [51] Hardie RC, Raghu P (1998). Activation of heterologously expressed *Drosophila* TRPL channels: Ca^{2+} is not required and InsP_3 is not sufficient. *Cell Calcium* 24, 153-163.
- [52] Hardie RC, Minke B (1993). Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization. *Trends Neurosci* 16, 371-376.
- [53] Hardie RC, Minke B (1995). Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and *trp*. *Cell Calcium* 18, 256-274.
- [54] Hardie RC, Raghu P (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413, 186-193.
- [55] Helfrich-Förster C, Edwards T, Yasuyama K, Wisotzki B, Schneuwly S, Stanewsky R, Meinertzhagen IA, Hofbauer A (2002). The extraretinal eyelet of *Drosophila*: development, ultrastructure, and putative circadian function. *J Neurosci* 22, 9255-9266.
- [56] Hicks JL, Williams DS (1992). Distribution of the myosin I-like *ninaC* proteins in the *Drosophila* retina and ultrastructural analysis of mutant phenotypes. *J Cell Sci* 101, 247-254.
- [57] Hirokawa N, Noda Y, Okada Y (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 10, 60-73.
- [58] Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of hte epithelial Ca^{2+} -channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22, 776-785.

- [59] Hornstein EP, O'Carroll DC, Anderson JC, Laughlin SB (2000). Sexual dimorphism matches photoreceptor performance to behavioural requirements. *Proc Biol Sci* 267, 2111-2117.
- [60] Huber A (2001). Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur J Neurosci* 14, 769-776.
- [61] Huber A, Sander P, Gobert A, Böhner M, Hermann R, Paulsen R (1996). The transient receptor potential protein (Trp), a putative store-operated Ca²⁺ channel essential for phosphoinositide-mediated photoreception, forms a signaling complex with NorpA, InaC and InaD. *EMBO J* 15, 7036-7045
- [62] Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1, 165-170.
- [63] Karagiannis SA, Ready DF (2004). Moesin contributes an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis. *Development* 131, 725-732.
- [64] Keddi N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276, 28613-28619.
- [65] Kimple ME, Siderovski DP, Sondek J (2001). Functional relevance of the disulfide-linked complex of the M-terminal PDZ domain of InaD with NorpA. *EMBO J* 20, 4414-4422.
- [66] Kirschfeld K (1971). Uptake and processing of optic data in the complex eye of insects. *Naturwissenschaften* 58, 201-209.
- [67] Kiselev A, Socolich M, Vinos J, Hardy RW, Zuker CS, Ranganathan R (2000). A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* 28, 139-152.

- [68] Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T (2004). Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286, F599-605.
- [69] Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, Timberg R, Zars TD, Hyde DR, Minke B, Selinger Z (2003). Regulation of light-dependent Gq α translocation and morphological changes in fly photoreceptors. *EMBO J* 22, 459-468.
- [70] Krendel M, Mooseker MS (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology* 20, 239-351.
- [71] Kumar JP, Ready DF (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* 121, 4359-4370.
- [72] Labhart T, Meyer EP (1999). Detectors for polarized skylight in insects: a survey of ommatidial specializations in the dorsal rim area of the compound eye. *Microsc Res Tech* 47, 368-379.
- [73] Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [74] Landsberg JW, Yuan JX (2004). Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation. *News Physiol Sci* 19, 44-50.
- [75] Lasko PF, Pardue ML (1988). Studies of the genetic organization of the vestigial microregion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 120, 495-502.
- [76] Lee S-J, Montell C (2004). Light-dependent translocation of visual arrestin regulated by the NINAC Myosin III. *Neuron* 43, 95-103.
- [77] Lee SJ, Xu H, Kang LW, Amzel LM, Montell C (2003). Light adaptation through phosphoinositide-regulated translocation of *Drosophila* visual arrestin. *Neuron* 39, 121-132.

- [78] Leung H-T, Geng C, Pak WL (2000). Phenotypes of *trpl* mutants and interactions between the transient receptor potential (TRP) and TRP-like channels in *Drosophila*. *J Neurosci* 20, 6797-6803.
- [79] Li C, Geng C, Leung HT, Hong YS, Strong LL, Schneuwly S, Pak WL (1999). INAF, a protein required for transient receptor potential Ca(2+) channel function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13474-13479.
- [80] Li HS, Montell C (2000). TRP and the PDZ protein, InaD, form the core complex required for retention of the signalplex in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Cell Biol* 150, 1411-1422.
- [81] Louvet-Vallee S (2000). ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* 92, 305-316.
- [82] Luschnig S, Moussian B, Krauss J, Desjeux I, Perkovic J, Nüsslein-Volhard C (2004). An F1 genetic screen for maternal-effect mutations affecting embryonic pattern formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 325-342.
- [83] MacPherson MR, Pollock VP, Kean L, Southall TD, Giannakou ME, Broderick KE, Dow JAT, Hardie RC and Davies SA (2005). Transient receptor potential-like (TRPL) channels are essential for calcium signalling and fluid transport in a *Drosophila* epithelium. *Genetics* 169, 1541-1552.
- [84] Mallik R, Gross SP (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 14, 971-982.
- [85] Matsumoto H, Isono K, Pye Q, Pak WL (1987). Gene encoding cytoskeletal proteins in *Drosophila* rhabdomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 985-989.
- [86] Meyer N (2002). Untersuchungen zur lichtabhängigen Translokation eines eGFP-markierten Ionenkanals in den Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.

- [87] Michaely P, Bennett V (1993). The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J Biol Chem.* 268, 22703-22709.
- [88] Minke B (1982). Light-induced reduction in excitation efficiency in the *trp* mutant of *Drosophila*. *J Gen Physiol* 79, 361-385.
- [89] Minke B (2001). The TRP ion channel and phospholipase C-mediated signaling. *Cell Mol Neurobiol* 21, 629-643.
- [90] Minke B, Selinger Z (1996). The roles of *trp* and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 6, 459-466.
- [91] Mismar D, Rubin GM (1987). Analysis of the promoter of the *ninaE* opsin gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116, 565-578.
- [92] Montell C (1989). Molecular genetics of *Drosophila* vision. *Bioessays* 11, 43-48.
- [93] Montell C (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 231-268.
- [94] Montell C (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci STKE* 272: re3.
- [95] Montell C (2005). *Drosophila* TRP channels. *Pflugers Arch* 451, 19-28.
- [96] Montell C (2005). TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol.* 567, 45-51.
- [97] Montell C, Rubin GM (1988). The *Drosophila ninaC* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* 52, 757-772.
- [98] Montell C, and Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.

- [99] Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu M, Zhu MX (2002). A unified nomenclature of the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9, 229-231.
- [100] Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004). TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 14, 362-369.
- [101] Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13, 1435-1448.
- [102] Newsome TP, Asling B, Dickson BJ (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* 127, 851-860.
- [103] Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K, Zuker CS (1996). The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85, 651-665.
- [104] O'Tousa JE, Baehr W, Martin RL, Hirsh J, Pak WL, Applebury ML (1985). The *Drosophila ninaE* gene encodes an opsin. *Cell* 40, 839-850.
- [105] Padinjat R, Andrews S (2004). TRP channels at a glance. *J Cell Sci* 117, 5707-5709.
- [106] Pak WL (1979). Study of photoreceptor function using *Drosophila* mutants. In: Neurogenetics: genetic approaches to the nervous system. (X. Breakfield, ed.). New York: Elsevier-North Holland, 67-99.
- [107] Pals-Rylaarsdam R, Gurevich VV, Lee KB, Ptasienski JA, Benovic JL, Hosey MM (1997). Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem* 272, 23682-23689.
- [108] Paulsen R, Böhner M, Huber A, Schillo M, Schulz S, Wottrich R, Bentrup J (2001). The molecular design of a visual cascade: Molecular stages of phototransduction in *Drosophila*. In: Vision: The approach of biophysics and neurosciences (C. Musio ed.), World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 41-59.

- [109] Paulsen R, Böhner M, Huber A (2000). The PDZ assembled "transducisome" of microvillar photoreceptors: the TRP/TRPL problem. *Pflugers Arch* 439, 181-183.
- [110] Pearn MT, Randall LL, Shortridge RD, Burg MG, Pak WL (1996). Molecular, biochemical, and electrophysiological characterization of *Drosophila norpA* mutants. *J Biol Chem* 271, 4937-4945.
- [111] Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38, 233-52.
- [112] Pellikka M, Tanentzapf G, Pinto M, Smith C, McGlade CJ, Ready DF, Tepass U (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 416, 143-149.
- [113] Peretz A, Sandler C, Kirschfeld K, Hardie RC, Minke B (1994). Genetic dissection of light-induced Ca^{2+} influx into *Drosophila* photoreceptors. *J Gen Physiol* 104, 1057-1077.
- [114] Peretz A, Suss-Toby E, Rom-Glas A, Arnon A, Payne R, Minke B (1994). The light response of *Drosophila* photoreceptors is accompanied by an increase in cellular calcium: effects of specific mutations. *Neuron* 12, 1257-1267.
- [115] Philips AM, Bull A, and Kelly LE (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8, 631-642.
- [116] Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- [117] Polesello C, Delon I, Valenti P, Ferrer P, Payre F (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* 4, 782-789.
- [118] Pollard TD (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* 422, 741-745.

- [119] Porter JA, Montell C (1993). Distinct roles of the *Drosophila* *ninaC* kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis. *J Cell Biol* 122, 601-612.
- [120] Raghu P, Colley NJ, Webel R, James T, Hasan G, Danin M, Selinger Z, Hardie RC (2000). Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP(3) receptor gene. *Mol Cell Neurosci* 15, 429-445.
- [121] Raghu P, Usher K, Jonas S, Chyb S, Polyakov A, Hardie RC (2000). Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in *Drosophila* diacylglycerol kinase mutant *rdgA*. *Neuron* 26, 169-179.
- [122] Ranganathan R, Bacskai BJ, Tsien RY, Zuker CS (1994). Cytosolic calcium transients: spatial localization and role in *Drosophila* photoreceptor cell function. *Neuron* 13, 837-848.
- [123] Reuss H, Mojet MH, Chyb S, Hardie RC (1997). *In vivo* analysis of the *Drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* 19, 1249-1259.
- [124] Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Forster C (2003). Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18, 377-391.
- [125] Rorth P, Szabo K, Bailey A, Laverty T, Rehm J, Rubin GM, Weigmann K, Milan M, Benes V, Ansorge W, Cohen SM (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-107.
- [126] Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308, 83-88.
- [127] Saier MH Jr (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett* 362, 1-4.

- [128] Satoh AK, Ready DF (2005). Arrestin1 mediates light-dependent rhodopsin endocytosis and cell survival. *Curr Biol* 15, 1722-33.
- [129] Schreiber SL, Preiss A, Nagel AC, Wech I, Maier D (2002). Genetic screen for modifiers of the rough eye phenotype resulting from overexpression of the Notch antagonist hairless in *Drosophila*. *Genesis* 33, 141-52.
- [130] Scott K, Becker A, Sun Y, Hardy R, Zuker C (1995). Gq alpha protein function *in vivo*: genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. *Neuron* 15, 919-927.
- [131] Scott K, Sun Y, Beckingham K, Zuker CS (1997). Calmodulin regulation of *Drosophila* light-activated channels and receptor function mediates termination of the light response *in vivo*. *Cell* 91, 375-383.
- [132] Scott K, Zuker C (1998). TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells. *Curr Opin Neurobiol* 8, 383-388.
- [133] Sedgwick SG, Smerdon SJ (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* 24, 311-316.
- [134] Seitz G (1971). Structure and function of the complex eye of the blowfly. *Naturwissenschaften* 58, 258-265.
- [135] Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH, Wright F (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* 16, 8207-8211.
- [136] Sheng M, Lee SH (2001). AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105, 825-828.
- [137] Shortridge RD, McKay RR (1995). Invertebrate phosphatidylinositol-specific phospholipase C and their role in cell signaling. *Invert Neurosci* 1, 199-206.

- [138] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- [139] Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN Jr, Arshavsky VY (2002). Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 34, 95-106.
- [140] St Johnston D (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176-188.
- [141] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher TR, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.
- [142] Strissel KJ, Lishko PV, Trieu LH, Kennedy MJ, Hurley JB, Arshavsky VY (2005). Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 280, 29250-29255.
- [143] Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno JS Jr, Bove C, Kaneski CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt SA (2000). Mucopolidiosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* 9, 2471-2478.
- [144] Theodosiou NA, Xu T (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* 14, 355-365.
- [145] Turunen O, Wahlstrom T, Vaehri A (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* 126, 1445-1453.

- [146] Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401.
- [147] Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249.
- [148] Tsunoda S, Sun Y, Suzuki E, Zuker C (2001). Independent anchoring and assembly mechanisms of INAD signaling complexes in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 21, 150-158.
- [149] Vickery RG, von Zastrow M (1999). Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* 144, 31-43.
- [150] von Lintig J, Dreher A, Kiefer C, Wernet MF, Vogt K (2001). Analysis of the blind *Drosophila* mutant *ninaB* identifies the gene encoding the key enzyme for vitamin A formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1130-1135.
- [151] Wang T, Xu H, Oberwinkler J, Gu Y, Hardie RC, and Montell C (2005). Light activation, adaptation, and cell survival functions of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger CalX. *Sci STKE* 272, re3.
- [152] Wernet MF, Labhart T, Baumann F, Mazzoni EO, Pichaud F, Desplan C (2003). Homothorax switches function of *Drosophila* photoreceptors from color to polarized light sensors. *Cell* 115, 267-279.
- [153] Wessels G (2002). Funktionsanalyse der lichtaktivierten Phosphorylierung des Rhodopsins (Rh1) von *Drosophila melanogaster* mittels Mutagenese und Keimbahntransformation. Dissertation, Universität Karlsruhe.

- [154] Wolff T, and Ready DF (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In: Bate M, and Arias AM (eds.). The Development of *Drosophila melanogaster*, 1277-1325. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- [155] Yang Z, Emerson M, Su HS, Sehgal A (1998). Response of the timeless protein to light correlates with behavioral entrainment and suggests a nonvisual pathway for circadian photoreception. *Neuron* 21, 215-223.
- [156] Yoon J, Ben-Ami HC, Hong YS, Park S, Strong LLR, Bowman J, Geng C, Baek K, Minke B, Pak WL (2000). Novel mechanism of massive photoreceptor degeneration caused by mutations in the *trp* gene of *Drosophila*. *J Neurosci* 20, 649-659.
- [157] Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271, 18302-18305.
- [158] Zuker CS (1996). The biology of vision of *Drosophila*. *Proc Nat Acad Sci USA* 93, 571-576.
- [159] Zuker CS, Cowman AF, Rubin GM (1985). Isolation and structure of a *rhodopsin* gene from *D. melanogaster*. *Cell* 40, 851-858.

Abkürzungen

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
Arr1, Arr2	Arrestin1, Arrestin2
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	copy DNA
CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tri-cyclo [3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
cRNA	copy RNA
Cy5	Cyan5
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EMS	Ethylmethylsulfonat
ERG	Elektroretinogramm
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FITC	Fluorescein-isothiocyant
Flp	Flipase
FRT	flipase recombinase target

GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, -triphosphat
GFP	green fluorescent protein
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
Gq	visuelles G-Protein
IC	Immuncytochemie
IgG	Immunglobulin G
INAD	inactivation no afterpotential D
inaF	inactivation no afterpotential F
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
Lac	Lactose
Leu	Leucin
MOPS	3-(N-morpholino-)propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ninaB, ninaE	neither inactivation nor afterpotential B, E
NINAC	neither inactivation nor afterpotential C
NMDA	N-methyl-D-aspartat
norpA	no receptor potential A
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS, PBS-T	Phosphate buffered saline, PBS mit Tween20
PDB	Protein Data Bank
PDZ	PSD-95, DLG, ZO-1
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLCβ	Phospholipase Cβ
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R1-R8	Photorezeptorzellen 1-8
rdgA	retinal degeneration A
Rh	Rhodopsin
RNA	Ribonucleic Acid

RT	Raumtemperatur
rUTP	Ribonukleosid Uraciltriphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
shi	shibire
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	Sodium salt citrate
TBS, TBS-T	Tris buffered saline, TBS mit Tween20
TGF- β	transforming growth factor β
Thr	Threonin
TRITC	Tetramethylrhodamin
TRP	transient receptor potential
TRPL	transient receptor potential-like
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Anhang

A.1 Deletionsmapping: (weißäugige) Männchen der F1-Generation aus den Kreuzungen der beiden Defizienzen 3638 und 4956.

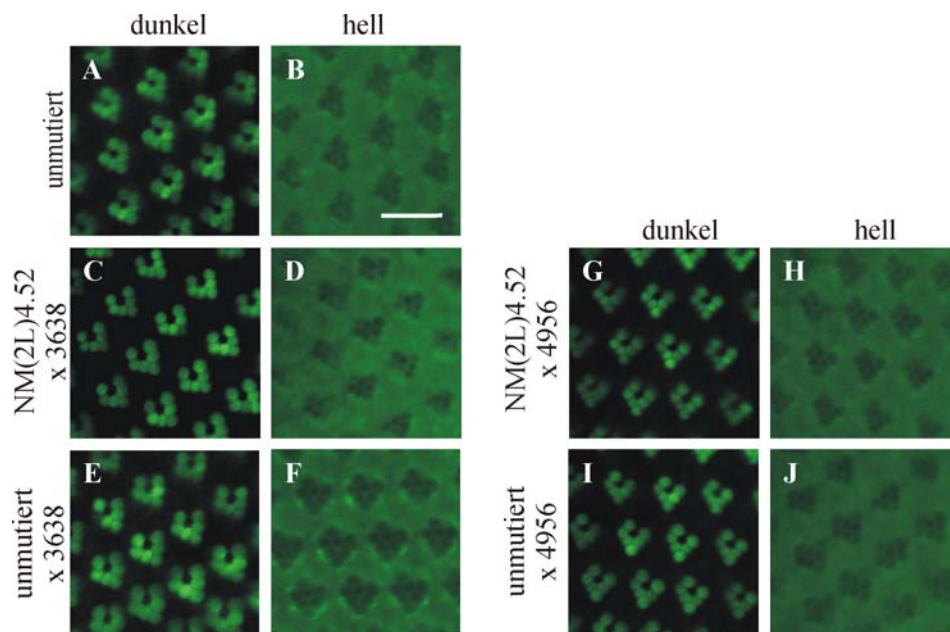


Abb. A-1 F1-Generation aus der Kreuzung der Stämme 3638 und 4956 mit der Mutante NM(2L)4.52 und mit unmutierten Fliegen. Wasserimmersionsbilder der eGFP-Fluoreszenz in den Augen von unmutierten Fliegen (A, B) und von (weißäugigen) Männchen der F1-Generation (C-J) welche über Nacht im Orangelicht oder im Dunkeln gehalten wurden, sind gezeigt. Die Männchen der F1-Generation

aus der Kreuzung der beiden Defizienzen sowohl mit der Mutante NM(2L)4.52 als auch mit unmutierten Fliegen zeigen eine TRPL-eGFP Wanderung. Eichstrich 15 μ m.

A.2 Räumliche Struktur des GFP

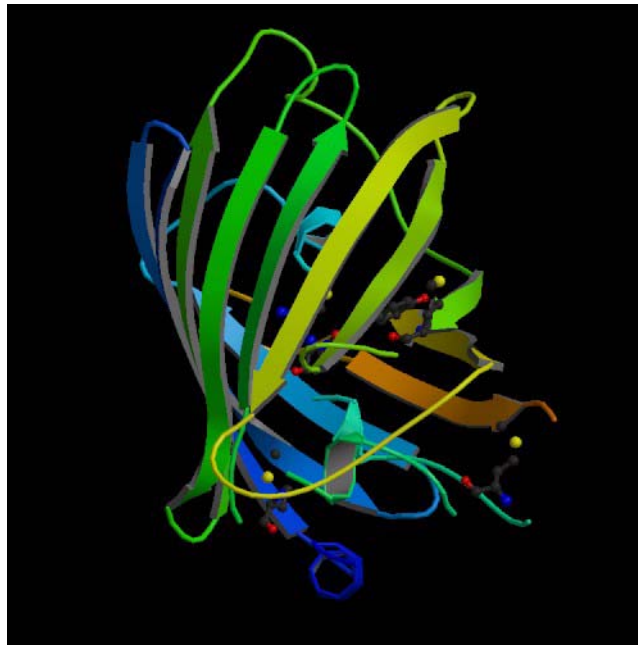


Abb. A-2 Räumliche Struktur des GFP. PDB-Eintrag 1EMA, [11]. Das zylindrische, elfsträngige β -Fass wird von einer zentralen Helix durchzogen. Die fluorophore Gruppe unterbricht die α -Helixstruktur, so dass sie nahezu im geometrischen Zentrum des Proteins angeordnet ist.

Lebenslauf

Persönliche Angaben		<u>Nina</u> Esther Meyer geboren am 09. 04. 1978 in Heilbronn ledig
Schulbildung	1984-1988 1988-1997	Grundschule in Neckarsulm Obereisesheim Albert-Schweitzer-Gymnasium in Neckarsulm Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote 2,4 (gut)
Studium	1997-2002	Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH) Hauptfächer: Genetik und Zoologie Biologisches Nebenfach: Biochemie Nichtbiologisches Nebenfach: Organische Chemie
	02/2002-10/2002	Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe (TH) „Untersuchungen zur lichtabhängigen Translokation eines eGFP-markierten Ionenkanals in den Photorezeptorzellen von <i>Drosophila melanogaster</i> “ Diplom-Biologin, Gesamtnote 1,3 (sehr gut)
	11/2002-12/2005	Durchführung einer Promotionsarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH) am Institut für Zoologie, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie
Beruflicher Werdegang	11/2002-12/2005	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Zoologie, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe (TH)

