

**Struktur-Funktionsanalysen von TRP-Ionenkanälen
in den Photorezeptorzellen von *Drosophila
melanogaster***

DISSERTATION

**David Oliver Richter
Karlsruhe, 2007**

**Struktur-Funktionsanalysen von TRP-Ionenkanälen
in den Photorezeptorzellen 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. Biochem. David Oliver Richter

aus Budapest

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta

Referent: Prof. Dr. Armin Huber

Korreferent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2007

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

Kongressbeiträge:

Richter DO, Heinold, A., Huber, A.

Targeting of the INAD signalling complex in *Drosophila* photoreceptor cells: A study using eGFP-tagged fusion proteins.

Europ. Dros. Res. Conf. 19: 2005

Richter DO, Oberacker T., Belusic G., Huber A.

Cytoplasmic C and N termini rather than transmembrane segments of TRPL cation channel contribute to light dependent changes in subcellular localisation

13th regional *Drosophila* research meeting Vienna 2006

Richter DO, Oberacker T., Kern J., Huber A.

Subunit composition of *Drosophila* microvillar TRPC channels: New answers to an old question

Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2007

Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei meiner Frau Viktoria und meiner Mutter Susanne für ihre jahrelange Unterstützung und Liebe, für viele Opfer und zahlreiche Entbehrungen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit und eines tollen Familienlebens beigetragen haben. Große Liebe für Euch.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Armin Huber für die Vergabe des Themas, welches ich sehr lieb gewonnen habe und im Besonderen für seine Geduld mit mir und die vielen Freiheiten, die er mir eingeräumt hat. Ich habe durch seine Kritik und Anregungen eine biochemische Betrachtungsweise der *Drosophila*-Arbeit kennen gelernt, die meinen Horizont stark erweitert hat.

Ich bin ebenso Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer zu großem Dank verpflichtet, der mir und unseren Diplomandinnen sein Laboratorium zu Verfügung gestellt hat und für konstruktive Beiträge und nette Gespräche, sowie für die Übernahme des Koreferates. Vielen Dank nochmals!

Dr. Gregor Belusic bin ich sehr dankbar für die Einführung in die Elektrophysiologie, seine Gastfreundschaft und zahlreiche ERG-Messungen, die mir neue Einblicke in Funktion des Nervensystems verschafft haben.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Studenten bedanken, die in dieser Zeit betreuen durfte, und die alle etwas von ihrem Sachverstand und Herzblut in diese Arbeit eingebracht haben. Ganz besonders natürlich Tina Oberacker, die durch ihren enormen Einsatz bei der Perfektionierung der biochemischen Analysen einen unverzichtbaren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Ebenso gilt mein Dank Jeannine Kern, die sich mit ihren „magischen Händen“ in Arbeiten mit großen prozeduralen Anforderungen besonders hervorgetan hat. Ich habe viel von Euch gelernt und viel Spaß bei der Betreuung gehabt. Bei Andi möchte ich für viele angenehme Gespräche und für seine Vorarbeit, die das Fundament für die biochemischen Teil dieser Arbeit war, bedanken.

Weiterhin danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zell und Neurobiologie, für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Besonders Kristina und Anne sind mir in dieser Zeit sehr ans Herz gewachsen und waren durch ihre besondere Art ein Farblecks im grauen Arbeitsalltag. Joachim und Prof. Paulsen danke ich besonders für Anregungen, Korrekturen und Diskussionen, die ich - auch wenn ich sie nicht immer strahlend aufgenommen habe - sehr zu schätzen weiß.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern meiner Familie für ihre ideelle und finanzielle Unterstützung: Meinem Vater für die Finanzierung meines Studiums, meinen Schwiegereltern Beate und Peter für ihre Hilfe, und besonders meinen tollen Schwiegergroßeltern nebst „T‘Hölga“ für ihren großen Einsatz beim Umzug nach Karlsruhe. Und natürlich meinem Leopold, der als Hund neue Maßstäbe gesetzt hat. Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Fliegen, die sich so zahlreich für die Wissenschaft geopfert haben, und mit denen ich sehr gerne arbeite.

FÜR MEINEN OPA
HARGITAY MÁTYÁS

„DAS GROSSE WERK ES IST VOLLBRACHT UND GUT.
DER MECHANISMUS LÄUFT DER SCHÖPFER RUHT.
ÄONEN BLEIBT DER RÄDER WERK IN FLUSS,
EH EINE SCHRAUBE MAN ERSETZEN MUSS.“

IMRE MADÁCH
DIE TRAGÖDIE DES MENSCHEN

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Die Phototransduktionskaskade von <i>Drosophila</i>	3
2.2 Funktionen und strukturelle Merkmale der TRP-Kanäle.....	5
2.3 <i>Drosophila</i> -TRPs.....	9
2.4 Reizabhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation des TRPL-Kanals.....	12
2.5 Zusammensetzung der TRP-Kanalmultimere in <i>Drosophila</i> - Photorezeptorzellen.....	14
2.6 Fragestellung.....	16
3. Material und Methoden	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien.....	20
3.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	20
3.1.3 Antikörper.....	22
3.1.4 Versuchstiere.....	23
3.1.5 Soft- und Hardware, Geräte.....	24
3.1.6 Öffentliche Internetquellen.....	25
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Aufzucht und Haltung von Fliegen.....	26
3.2.2 Präparation biologischen Materials.....	26
3.2.2.1 Massenisolation von <i>Drosophila</i> -Köpfen.....	26
3.2.3 Belichtung der Fliegen.....	26
3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	27
3.2.5 Untersuchung isolierter Ommatidien.....	27
3.2.6 Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i>	28
3.2.7 Biochemische Methoden.....	29
3.2.7.1 Präparation von Protein-Gesamtextrakten aus <i>Drosophila</i> -Köpfen.....	29
3.2.7.2 Proteinextraktion aus Fliegenköpfen für Immunopräzipitation.....	29
3.2.7.3 Proteinextraktion mit modifiziertem RIPA-Puffer aus Fliegenköpfen für Co-Immunopräzipitation.....	29
3.2.7.4 Co-Immunopräzipitation von <i>Drosophila</i> -Proteinextrakten.....	30
3.2.7.5 SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese.....	30
3.2.7.6 Western Blot.....	31
3.2.7.7 PFO-PAGE: native Perfluorooktanoat-Gelelektrophorese.....	32

	Seite
3.2.8 Elektretinogramm (ERG)	33
3.2.8.1 Versuchsaufbau ERG	33
3.3 Vektoren	35
3.3.1 Keimbahn-Transformations-Vektoren	35
3.3.1.1 pYC4-Rh1-DEST-UTR	35
3.3.1.2 pYC4-DEST	37
3.3.2 Gateway™-Klonierungs-Vektoren.....	38
3.3.2.1 pENTR- <i>ccdB</i> A1.....	38
3.3.3 eGFP/HcRed-Konstrukte	39
3.3.3.1 pENTR-TRP-eGFP/pUAS _T -TRP-eGFP.....	39
3.3.3.2 pENTR-TRPL-eGFP/ pUAS _T -TRPL-eGFP.....	40
3.3.3.3 TRPL-HcRed	42
3.3.3.4 pENTR-TRP-HcRed.....	43
3.3.4 Strategie für die Konstruktion von chimären TRP/TRPL und TRPL- Deletionsvarianten	45
3.3.4.1 Chimäre 1 (TRP-N-Terminus und Transmembranbereich /TRPL- eGFP C-Terminus).....	45
3.3.4.2 Chimäre 2 (TRP-eGFP/TRPL N-Terminus)	47
3.3.4.3 Chimäre 3 (TRP /TRPL-eGFP C/N-Term)	48
3.3.4.4 pENTR -ΔAnk-TRPL-eGFP/ pYC4 Rh1-ΔAnk-TRPL-eGFP	49
3.3.4.5 pENTR-ΔN-TRPL-eGFPN-TRPL-eGFP/ pYC4 Rh1-ΔN-TRPL- eGFP	51
3.3.4.6 pENTR-ΔInt-TRPL-eGFP pYC4 Rh1-Δ INT-TRPL-eGFP	52
3.3.4.7 ΔC-TRPL-eGFP /pYC4 Rh1-ΔC-TRPL-eGFP.....	53
4. Ergebnisse.....	55
4.1 Herstellung eines Gateway™ basierten <i>Drosophila</i> Transformationsvektors zur Expression von Transgenen in adulten Fliegen-Augen.....	55
4.2 Charakterisierung des TRP-eGFP-Transgens	58
4.2.1 Mikroskopische Untersuchung der TRP-eGFP-Lokalisation in den Photorezeptorzellen transgener <i>Drosophilae</i>	58
4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung der TRP-eGFP-Funktion in der Retina transgener <i>Drosophilae</i>	64
4.2.3 In Photorezeptorzellen exprimierte TRP-Kanäle verlassen das Rhabdomer nicht zusammen mit markierten TRPL-Untereinheiten	66

	Seite
4.2.4 Die Störung der Rab11-Funktion unterbindet den Transport von TRP-eGFP in das Rhabdomer	68
4.2.5 Die Expression einer dominant-negativen Rab11-Variante hat keinen Einfluss auf den Transport von TRPL in das Rhabdomer.....	69
4.3 Bestimmung der Bindungspartner von TRP-eGFP und TRPL-eGFP mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen.....	70
4.3.1 TRP-eGFP bildet exklusiv Multimere mit endogenem TRP	75
4.3.2 TRPL-eGFP Untereinheiten liegen <i>in vivo</i> als Homodimere und Homotetramere vor	76
4.3.3 Untersuchung der Wirkung der N- und C-Termini von TRPL auf die Assemblierung der Kanaluntereinheiten durch Chimären in Photorezeptoren	78
4.3.3.1 Bestimmung der Bindungspartner von Chimäre 1, Chimäre 2 und Chimäre 3 mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen	80
4.3.3.2 Deletionen in den N- und C-Termini des TRPL-eGFP verhindern den rhabdomerischen Transport der Fusionsproteine, aber nicht die Wechselwirkung mit endogenem TRPL.....	83
4.4 Das Δ C-TRPL-eGFP Protein transloziert nicht in die Rhabdomere dunkeladaptierter Fliegen	85
4.4.1 Das Δ C-TRPL-eGFP Protein akkumuliert in einem intrazellulären Kompartiment und stört die Funktion endogener Kanäle.....	86
4.4.2 Expression zusätzlicher TRPL-Kanäle führt zur Anreicherung des Δ C-TRPL-eGFP Proteins in den Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen	88
4.5 Δ Ank-TRPL-eGFP wird nicht in das Rhabdomer transportiert und stört die Funktion endogener TRPL-Untereinheiten	91
4.5.1 Das Δ Ank-TRPL-eGFP Protein transloziert nicht in die Rhabdomere dunkeladaptierter Fliegen	94
4.5.2 Endogene TRPL-Untereinheiten co-präzipitieren mit Δ Ank-TRPL-eGFP	95
4.5.3 Δ Ank-TRPL-eGFP bildet keine funktionalen Kanäle und stört die Kanalfunktion endogener TRPL-Untereinheiten in <i>wt</i> -Photorezeptoren	96
4.6 TRPL-eGFP benötigt TRP-vermittelten Calciumeinstrom um in helladaptierten Fliegen das Rhabdomer verlassen zu können.....	98
4.6.1 Untersuchungen der TRPL-Translokation bei TRP-unabhängiger Manipulation der Calciumkonzentration in Photorezeptoren	100
4.6.2 Verringerung des Calcium-Gehaltes der Photorezeptoren durch Überexpression des CalX-Proteins initiiert den Transport-Defekt von TRPL-eGFP in <i>trp</i> ⁹ - und <i>trp</i> ¹⁴ -Mutanten	100

	Seite
4.6.3 Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in der <i>calX^B</i> - Mutante hat keinen Einfluss auf das Translokationsverhalten des TRPL- eGFP	102
4.7 Elektrophysiologische Untersuchung der TRP/TRPL-Chimären in der Retina transgener <i>Drosophila</i>	103
4.7.1 Kriterien für die Rettung des <i>trpl³⁰²</i> -ERG-Phänotyps durch Überexpression chimärer Kanaluntereinheiten	103
4.7.2 Chimäre 1 zeigt im ERG Gemeinsamkeiten mit TRPL	104
4.7.3 Expression der Chimäre 1 in <i>trpl³⁰²</i> -Fliegen erhöht die Fähigkeit der Photorezeptorzellen, sich an Hintergrund-Licht geringer Intensität zu adaptieren.....	106
4.7.4 Die Chimäre 2 rettet den ERG-Phänotyp der <i>trpl³⁰²</i> -Mutante nicht.....	110
4.7.5 Die Chimäre 3 rettet den ERG-Phänotyp der <i>trpl³⁰²</i> -Mutante nicht.....	112
4.7.6 Die Chimären 1/2/3 komplementieren den transienten ERG-Phänotyp der <i>trp⁹</i> -Mutante nicht	113
4.8 Sequenzunterschiede zwischen TRP und TRPL im N- und C-Terminus sind für das unterschiedliche Wanderungsverhalten der beiden Kanäle verantwortlich.....	115
4.8.1 Mikroskopische Untersuchung der reizbedingten Veränderung der subzellulären Lokalisation von Chimäre 3.....	115
4.8.2 Mikroskopische Untersuchung der reizbedingten Veränderung der subzellulären Lokalisation von Chimäre 1 und 2	119
5. Diskussion	122
5.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>Drosophila</i> mit dem Gateway™-System.....	122
5.2 Medizinische Bedeutung der Assemblierung von TRP-Kanälen	124
5.3 Assemblierung der <i>Drosophila</i> TRPC-Kanäle	125
5.4 Einfluss der cytoplasmatischen Termini des TRPL auf die Auswahl der Interaktionspartner	126
5.5 Einfluss der N- und C-Termini des TRPL auf die lichtabhängige Translokation	129
5.6 Funktionelle Wechselwirkung zwischen TRP und TRPL.....	134
5.7 Elektrophysiologie	135
6. Literaturverzeichnis	138
7. Abkürzungen	148
Anhang.....	149

1. Zusammenfassung

TRP-Kanäle sind in Rezeptorzellen unterschiedlicher Sinnes-Modalitäten und in Geweben epithelialen Ursprungs bei Vertebraten und Evertrebraten vertreten. Die Öffnung der TRPC-Kationen-Kanäle TRP und TRPL von *Drosophila* erzeugt das Rezeptorpotenzial in Retinulazellen (Niemeyer *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden epitop-markierte chimäre Proteine aus TRP und TRPL sowie Deletionsmutanten, denen die N-terminalen Ankyrin-Repeats bzw. ein Teil des N-Terminus fehlten, konstruiert und in Photorezeptorzellen von *Drosophila* exprimiert. Der Einfluss der intrazellulären N- und C-Termini auf zellbiologische, biochemische und biophysikalische Eigenschaften wurde mit besonderem Augenmerk auf lichtabhängige Translokation untersucht.

Die Co-Immunopräzipitation epitop-markierter TRP-/TRPL-Kanäle zeigte, dass die vorherrschenden Kanäle der Photorezeptor-Membranen aus TRPL- und TRP-Homomeren bestehen. Die native Gelelektrophorese aus Membranextrakten TRPL-eGFP exprimierender Fliegen bestätigte das Vorkommen von TRPL-eGFP-Homotetrameren. Gestützt werden diese Ergebnisse durch die unterschiedliche subzelluläre Verteilung von epitop-markiertem TRP und TRPL in lichtadaptierten Fliegen, sowie durch Hinweise auf unterschiedliche Transportwege der beiden Kanäle in das Rhabdomer. Die Expression eines dominant-negativen Rab11-Proteins oder Rab11-RNAi beeinträchtigt den Transport des TRPL-eGFP im Gegensatz zu TRP nicht.

Biochemische Untersuchungen an Deletionsvarianten des TRPL-Kanals sowie an TRP- und TRPL-Chimären zeigten, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von TRPL Motive enthält, welche die Wechselwirkungen mit endogenem TRPL vermitteln. Der N- oder der C-Terminus des TRPL ist für die selektive Wechselwirkung mit endogenem TRPL ausreichend. Die mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Deletionsvarianten von TRPL zeigte, dass die Deletion zweier Ankyrin-Repeats (Δ Ank-TRPL-eGFP) oder der Region C-terminal der TRP-Box zum Verlust des Transportes in das Rhabdomer führt. In wildtypischen Fliegen exprimiertes Δ Ank-TRPL-eGFP war in der Lage, im ERG einen Phänotyp zu erzeugen, welcher Merkmale der amorphen *trpl*-Mutante hat. Die Ursache ist wahrscheinlich die Retention von endogenem TRPL durch Δ Ank-TRPL-eGFP im intrazellulären Speicherkompartiment. Die Ergebnisse belegen, dass die N- und C-terminalen Bereiche des TRPL für die Spezifität der Assemblierung zu multimeren Ionenkanälen ausschlaggebend sind.

Als Schnittstelle der funktionalen Interaktion von TRP und TRPL wurde der TRP-vermittelte Calcium-Einstrom als Voraussetzung für den Export des TRPL aus dem Rhabdomer durch die Untersuchung des Translokationsverhaltens von TRPL-eGFP in der *trp*¹⁴-Mutante und bei Co-Expression der Na⁺/Ca²⁺-Pumpe-CalX bestätigt.

Die chimären Proteine, bei denen der N- oder C-Terminus des TRP gegen die entsprechende Region aus TRPL ausgetauscht wurde, wurden elektrophysiologisch und mikroskopisch charakterisiert. Weder der N- noch der C-Terminus des TRPL allein erwiesen sich als ausreichend, um eine lichtabhängige Translokation (nach Art des TRPL) des Ionenkanals zu indizieren. Eine Chimäre, in der der N- und der C-Terminus des TRP durch die entsprechenden Regionen des TRPL ersetzt worden waren, zeigte hingegen die lichtabhängige Translokation. Somit konnten beide intrazellulären Termini des TRPL als notwendig und ausreichend für die lichtabhängige Translokation identifiziert werden.

Die Funktionalität der chimären Ionenkanäle wurde durch Messung von Elektroretinogrammen in Fliegen, die weder über endogenes TRP noch über TRPL verfügen, bestätigt. Hierbei erwies sich der chimäre Kanal, in dem der C-Terminus von TRP durch den C-Terminus des TRPL ersetzt worden war, als ausreichend, um in Mutanten den TRPL-Kanal teilweise zu ersetzen. Die Untersuchung der Photorezeptoren anhand von Reiz-Reizantwort-Kurven zeigte, dass der chimäre Kanal in der Lage ist, den Adaptationsdefekt in *trpl*³⁰²-Mutanten zu kompensieren.

Die TRPL-Transmembranbereiche und die Regionen, die die Transmembranhelices miteinander verbinden, spielen bei der Auswahl der Untereinheiten und dem Translokationsverhalten des TRPL eine untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Multimerisierung die Translokation und die elektrophysiologischen Eigenschaften des TRPL von unterschiedlichen, aber funktionell miteinander wechselwirkenden Regionen in den intrazellulären Termini bestimmt werden.

2. Einleitung

2.1 Die Phototransduktionskaskade von *Drosophila*

Die Phototransduktionskaskade in *Drosophila*-Photorezeptoren ist ein G-Protein-abhängiger Signalweg mit einer Phospholipase C β (PLC β) als zentralem Effektor (Abb. 2.1). (Hardie, 2001). Rhodopsine in der rhabdomerischen Membran absorbieren auftreffende Lichtquanten und leiten dadurch die Depolarisation der Rezeptorzellen ein (O'Tousa *et al.*, 1985; Pierce *et al.*, 2002; Zuker *et al.*, 1985).

Die Lichtabsorption führt zur Isomerisierung des Chromophors 11-*cis*-3-Hydroxyretinal in all-*trans*-Hydroxyretinal. Die Isomerisierung des Chromophors ist die Voraussetzung für die Konformationsänderung des inaktiven Rhodopsins (R) in das aktive Metarhodopsin (M).

Das Metarhodopsin aktiviert das heterotrimere Gq Protein, welches nach Austausch von GDP durch GTP in die α und $\beta\gamma$ -Untereinheiten zerfällt. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β (PLC β , *norp-A*-Genprodukt) (Bloomquist *et al.*, 1988). Das Substrat der Phospholipase C β ist Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP $_2$), welches zu Inositol-3,4,5-Triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert wird (Paulsen *et al.*, 2001; Hardie und Raghu, 2001; Montell, 1999; Zuker, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden als Liganden der TRP-Kanäle diskutiert, die zur Öffnung der Kanäle führen. (Chyb *et al.*, 1999; Raghu *et al.*, 2000; Jörs *et al.* 2006). Freie ungesättigte Fettsäuren (PUFA: „polyunsaturated fatty acids“) entstehen wahrscheinlich durch die Hydrolyse des DAGs.

Die Schlüsselkomponenten der *Drosophila*-Phototransduktionskaskade sind zu einem Multiprotein-Komplex, dem sog. INAD-Signalplex, zusammengelagert (Scott und Zucker 1998). Welche Komponenten der Phototransduktionskaskade permanente Bestandteile des Signalplexes sind, ist nicht vollständig geklärt. ePKC, PLC, Rhodopsin, TRP und NINAC konnten als Bindungspartner des INAD identifiziert werden, während die Wechselwirkung mit TRPL nicht als gesichert gilt (Wes *et al.*, 1999; Tsunoda *et al.*, 2001). Wahrscheinlich bildet das Gerüstprotein INAD zusammen mit dem TRP-Protein den Kern des Signalplexes, der für die Verankerung an der rhabdomerischen Membran notwendig ist (Li und Montell, 2000). Das INAD-Protein bindet die Bestandteile der Signalkaskade über fünf PDZ-Domänen (Xu *et al.*, 1998).

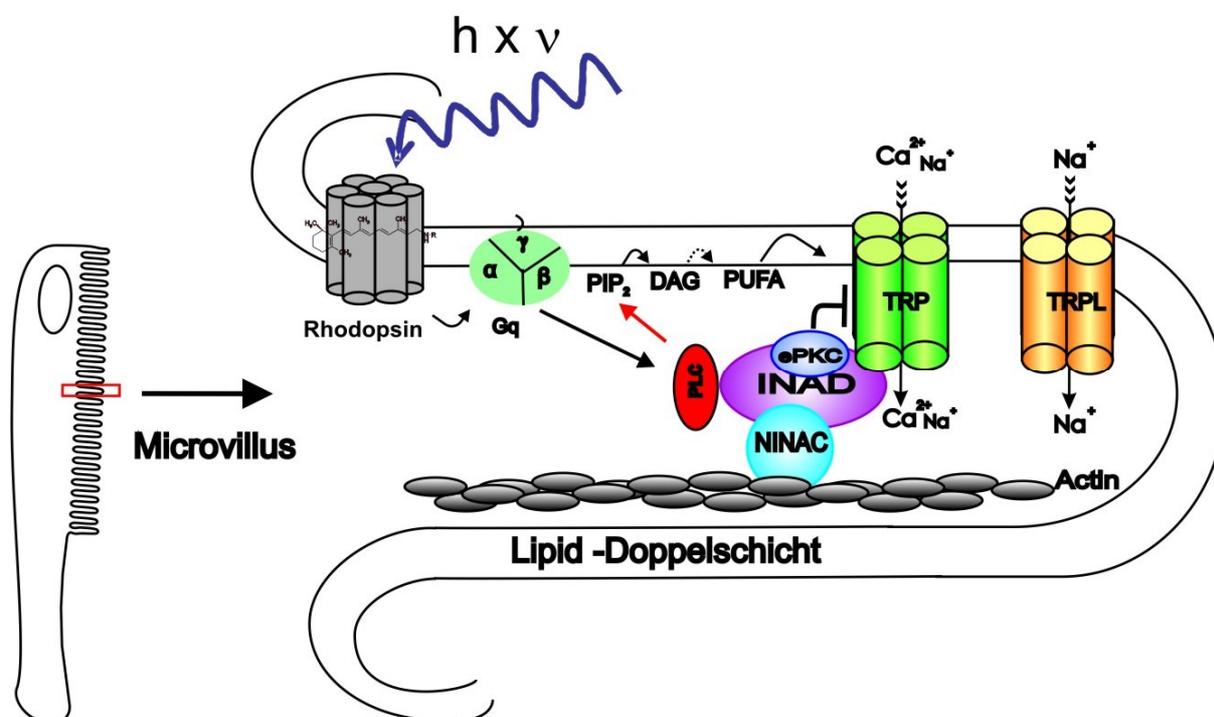


Abb. 2.1 Vereinfachte Darstellung der visuellen Signaltransduktionskaskade in der rhabdomerischen Membran einer Photorezeptorzelle

Dargestellt sind die zentralen Komponenten der Signalkaskade im Mikrovillus der rhabdomerischen Membran. Erläuterungen siehe Text.

R: Rhodopsin, **Gq:** visuelles G-Protein, **PLC:** Phospholipase C β , **ePKC:** augenspezifische Proteinkinase C, **INAD:** Gerüstprotein, **PUFA:** (polyunsaturated fatty acid)-mehrfach ungesättigte Fettsäuren, **TRP:** TRP-Kanal, **TRPL:** TRPL-Kanal.

Der TRP- und TRPL-vermittelte Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen depolarisiert die Photorezeptorzellen. Der spannungsabhängige Calcium-Kanal *Cacophony* öffnet sich als Reaktion auf die Änderung des Photorezeptorpotenzials und führt zur Freisetzung des Neurotransmitters Histamin aus den synaptischen Vesikeln der Rezeptorzellen (Smith *et al.*, 1996; Gengs *et al.*, 2002).

2.2 Funktionen und strukturelle Merkmale der TRP-Kanäle

TRP-Kanäle sind in zahlreichen Sinnesorganen an der Perzeption und/oder Transduktion von Reizen beteiligt. Defekte in TRP-Kanälen führen zu einer Reihe schwerwiegender Erkrankungen beim Menschen (mucopolysaccharidose type IV (MLIV), autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), familial focal segmental glomerulosclerosis (FSG), hypomagnesemia mit sekundärer Hypocalzämie (HSH), und Cardiomyopathien, Krebserkrankungen, (Übersicht: Kiselyov *et al.* 2007; Nilius *et al.* 2007; Freichel *et al.* 2007). Calcium-Oszillationen in Schrittmacherneuronen, wie sie in glatten Muskelzellen zu finden sind, werden ebenfalls von TRP-Kanälen vermittelt. (Estevez und Strange, 2005; Wu *et al.*, 2002; Torihashi *et al.*, 2002; Grimaldi *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2006).

Das weite Spektrum unterschiedlicher Aufgaben, die von TRP-Kanälen wahrgenommen werden, erklärt die großen strukturellen Unterschiede dieser Protein-Familie.

TRP-Kanäle werden anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in sieben Unterfamilien eingeteilt (Abb. 2.3) (Clapham, 2003; Vriens *et al.*, 2004; Huang, 2004; Montell, 2005). Die Einteilung von Ionenkanälen anhand von Sequenzhomologie ist untypisch. Ionenkanäle werden in der Regel anhand von biophysikalischen Eigenschaften unterteilt (Hille 2000). Die Kanal-Funktion wurde im Fall des TRP erst nach der Klonierung des codierenden Genes erkannt. (Hardie R.C. und Minke B., 1992).

Als TRPCs („classical“ oder „canonical“ TRP- Kanäle) werden Homologe des *Drosophila*-TRP zusammengefasst. Weitere Unterfamilien werden entsprechend der zuerst klonierten Vertreter der Unterfamilien als TRPV (Vanilloidrezeptor-verwandt), TRPM (Melastatin-ähnlich), TRPP (PKD; „polycystic kidney disease“), TRPML (MLN; Mucolipin), TRPN (NOMP-C; „no mechanoreceptor potential-C“) und TRPA (ANKTM1; „ankyrin-like with transmembrane domain 1“) bezeichnet.

Die Strukturvorhersagen der TRP-Kanäle basieren auf Vergleichen mit spannungsabhängigen Kalium-, Natrium- und Calciumkanälen. Den TRP-Kanälen fehlen die positiv geladenen Aminosäuren im vierten Transmembransegment. Diese Aminosäuren dienen den spannungsabhängigen Kanälen als Spannungssensor.

Kennzeichnend für alle TRP-Kanaluntereinheiten sind die cytosolischen N- und C-Termini, sowie sechs Transmembransegmente (S1-S6, Abb.2). Die Porenregion wird von dem fünften und sechsten Transmembransegment und der sie verknüpfenden Schleife gebildet (Clapham *et al.*, 2003). Die Länge und Sequenz der intrazellulären Termini variiert zwischen den Unterfamilien und wird daher zur Unterteilung herangezogen.

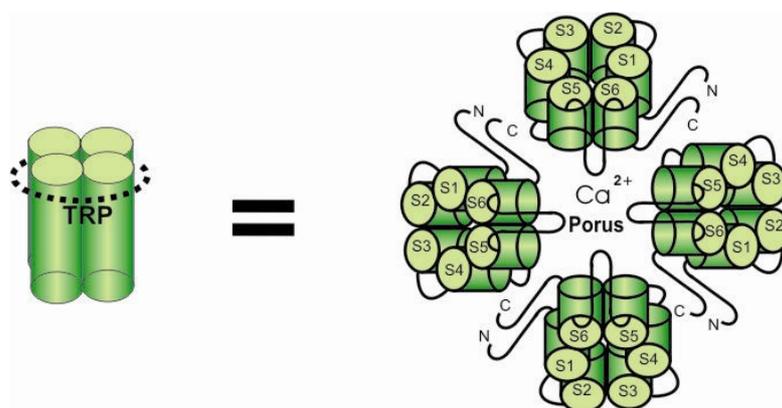


Abb. 2.2 Schematisierte Darstellung eines TRP-Tetramers.

Dargestellt sind die sechs Transmembran-Helices (S1-S6) und die Ionenkanalpore.

Ein TRP-Kanal wird wahrscheinlich von vier Monomeren gebildet (Abb. 2.2). Bei den Monomeren kann es sich um gleichartige (Bildung von Homomultimeren) oder verschiedene Monomere handeln (Bildung von Heteromultimeren). Heteromultimerisierung ist bereits für einige Vertreter der TRPC- und TRPV- Familie (TRPC1/ TRPC4; TRPC1/ TRPC5; TRPC3/ TRPC6; TRPC5/ TRPC3/ TRPC6; TRPV5/ TRPV6) gezeigt worden (Hellwig *et al.*, 2005; Hoenderop *et al.*, 2003; Strübing *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2002).

Die Untereinheiten der TRPC- TRPV-, TRPA- und TRPN-Unterfamilie besitzen am N-Terminus mehrere Ankyrin-Wiederholungen („ankyrin-repeats“). Ankyrin-repeats sind ca. 33 Aminosäuren (AS) lange Motive, die bei verschiedenen Proteinen vorkommen (Michaely und Bennett, 1993). Es wurde gezeigt, dass sie zur Interaktion von TRP-Kanaluntereinheiten benötigt werden (Erlor *et al.*, 2004; Benham *et al.*, 2002) oder Membranproteine mit dem Cytoskelett verbinden (Groschner *et al.*, 1998; Lockwich *et al.*, 2000; Lockwich *et al.*, 2001; Wes *et al.*, 1995). Für TRPV6 wurde durch verschiedene Methoden (Co-Immunopräzipitation, Sucrosegradienten-Zentrifugation, two-hybrid-Methode und Patch-Clamp-Analysen) eine an der Multimerisierung beteiligte Interaktionsdomäne identifiziert. Die Domäne, welche die dritte Ankyrin-Wiederholung (ANK 3) beinhaltet, wird für die physische Interaktion von TRPV6-Untereinheiten benötigt. Eine Deletion dieser dritten Ankyrin-Wiederholung oder eine Mutation dieses Bereiches führt zur Expression eines funktionslosen Kanals (Erlor *et al.*, 2004). Neuere Studien unterstützen dieses Ergebnis. Arniges und Mitarbeiter (2006) fanden durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Analysen und Co-Immunopräzipitationen von TRPV4-Spleißvarianten heraus, dass die Ankyrin-repeats bei der Multimerisierung der TRPV4-Kanaluntereinheiten eine Schlüsselfunktion innehaben (Arniges *et al.*, 2006).

Eine coiled-coil-Domäne kommt bei TRPCs im N-Terminus vor und setzt sich zum Teil aus den Ankyrin-Wiederholungen zusammen. Die cc-Domäne ist eine Tertiärstruktur, die durch Superspiralisierung mehrerer α -Helices entsteht und an der Dimerisierung von Proteinen

beteiligt ist. Es gibt Hinweise dafür, dass die cc-Domäne der Tetramerisierung von TRP-Proteinen oder der Interaktion mit anderen Proteinen dient (Engelke *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000).

Die Vertreter der TRPC-, TRPM- und der TRPN-Unterfamilie tragen ein kurzes, unmittelbar hinter dem sechsten Transmembransegment befindliches Motiv von sechs Aminosäuren (EWKFAR). Bei der TRPV-Unterfamilie ist das Motiv nicht so stark konserviert. Dieses Motiv wird als TRP-Box bezeichnet. Die Untersuchung von Mutanten ohne TRP-Box zeigte die mögliche Beteiligung an unterschiedlichen Funktionen. So zeigten mehrere Gruppen eine mögliche Beteiligung der TRP-Box an der Assemblierung von TRPV1 zu Tetrameren (García-Sanz *et al.*, 2004; Valchova *et al.*, 2004). Es gibt Hinweise auf die direkte Wechselwirkung von PIP₂ mit der TRP-Box von TRPM8 (Rohacs *et al.*, 2005).

Einige Mitglieder der TRPM-Unterfamilie (TRPM2, TRPM6 und TRPM7) zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben der Kanal- noch eine intrazelluläre Kinase-Domäne am C-Terminus besitzen (Scharenberg, 2005).

Ein PRM (PRM: **P**rolin reiches **M**otiv) kommt bei den TRPC-Kanälen im C-Terminus vor. Proteindomänen, die prolinreiche Motive binden, sind meistens an der Multimerisierung der Kanaluntereinheiten beteiligt. Prolin begünstigt diese spezifische Erkennung derartiger Motive. Es gibt mehrere Familien von PRM bindenden Modulen. In den TRP-Kanälen von *Drosophila* ist als PRM die Scr-Homologie-3 (SH3)-Domäne (Grabs *et al.*, 1997) zu finden.

Darüber hinaus ist bekannt, dass Immunophiline an PRM von TRPL binden können (Goel *et al.*, 2001). Eine Immunophilin-Interaktion mit Säugetier-TRPC-Kanälen konnte unter anderem durch Co-Immunopräzipitationen gezeigt werden (Sinkins *et al.*, 2004). CBSs wurden bei TRP-Kanälen in unterschiedlicher Anzahl im C-Terminus gefunden. Im C-Terminus vom *Drosophila*-TRP (DmTRP) findet man eine Calmodulin-Bindungsstelle (CBS, Phillips *et al.*, 1992; Chevesich *et al.*, 1997), bei *Drosophila*-TRPL hingegen zwei (CBS-1 und CBS-2) (Phillips *et al.*, 1992; Warr und Kelly, 1996). Es wurde herausgefunden, dass CaM Ca²⁺-abhängig an CBS-1 (AS 710- 728) bindet. Dafür sind *in vivo* Ca²⁺-Konzentrationen über 0,3-0,5 µM nötig. CBS-2 (AS 809- 825) hingegen bindet die Ca²⁺-freie Form von Calmodulin (CaM, Warr und Kelly, 1996).

Scott und Zuker (1997) zeigten mittels „whole-cell-recordings“ von Lichtsinneszellen adulter Fliegen, die TRPL-Kanäle mit Deletion der CBS-1 oder CBS-2 exprimieren, dass die Kanäle nicht mehr geschlossen werden (Scott und Zuker, 1997). Die Calmodulin-Bindung an die CBS in TRPC1 wirkt ebenfalls hemmend beim Ca²⁺-Einstrom aus intrazellulären Kompartimenten (sog. SOCE: „store-operated Ca²⁺-entry“, Singh *et al.*, 2000). Im Falle des TRPC5 wirkte die CaM-Bindung an den C-Terminus aktivierend auf den Kanal (Ordaz *et al.*, 2005).

Die Mitglieder der TRPP- und TRPML-Unterfamilien besitzen eine große extrazelluläre Schleife zwischen dem ersten und zweiten Transmembransegment (Abb. 2.3).

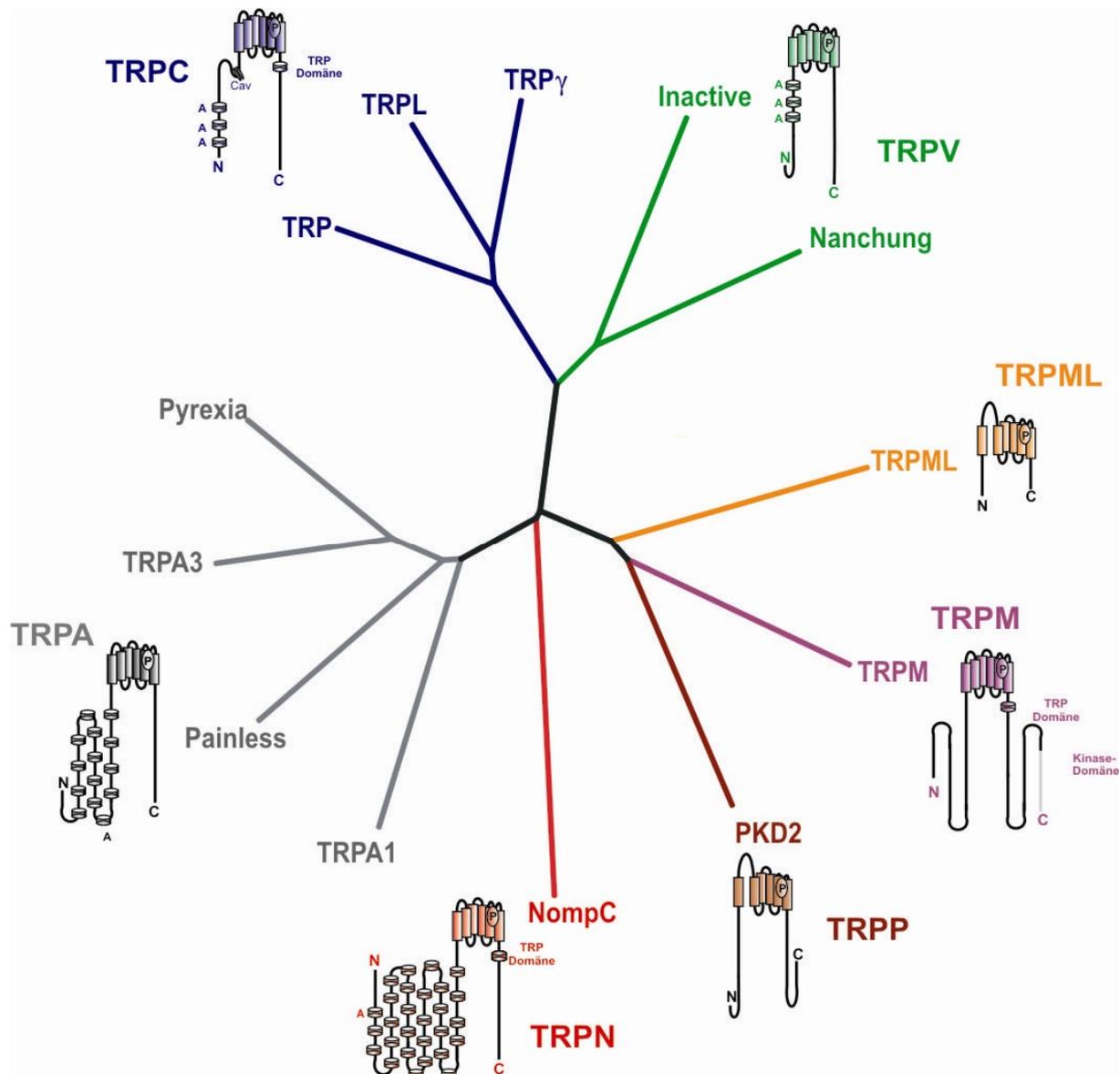


Abb. 2.3 Stammbaum der TRP-Proteine von *Drosophila melanogaster*
 Der Stammbaum wurde aus einem globalen Alignment mit den Programmen T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/t-coffee/> Notredame et al 2000; Poirot et al., 2003) und Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) erstellt. Die verwendeten Proteinsequenzen wurden der Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) entnommen. Erklärung siehe Text.

2.3 *Drosophila*-TRPs

Für alle TRP-Unterfamilien sind *Drosophila*-Homologe bekannt (Übersicht: Vriens *et al.*, 2004). Zu ihnen zählen TRP (Montell & Rubin, 1989), TRPL (Phillips *et al.*, 1992) und TRP γ (Xu *et al.*, 2000) als Vertreter der TRPC-Unterfamilie (Montell, 2001).

Die TRP-Familie wurde nach dem *Drosophila trp*-Genprodukt benannt (Montell und Rubin, 1989). Das hypomorphe *trp^{CM}*-Allel gab der TRP-Familie seinen Namen. *trp^{CM}* zeichnet sich durch die Ausbildung eines transienten Rezeptorpotentials als Antwort auf einen kontinuierlichen Lichtreiz aus (*trp*: „transient receptor potential“; Cosens und Manning, 1969).

Bei dem vom *trp*-Gen kodierten Protein handelt es sich um einen Ca²⁺-selektiven, nicht-spannungsabhängigen Ionenkanal (Hardie und Minke, 1992). *Trp*-Null-Mutanten (z.B. *trp⁹*) werden bei langer starker Belichtung vorübergehend blind, da der Calcium- Einstrom in die Photorezeptorzellen gestört ist und das in der Photorezeptormembran verfügbare PIP₂ aufgebraucht wird. Verantwortlich für den transienten *trp*-Phänotyp ist die Phosphoinositid-Synthase oder ein vergleichbares Enzym, welches Ca²⁺-abhängig PIP₂ regeneriert (Hardie *et al.*, 2001; Wang und Montell 2006). TRP und TRPL (Abb. 2.3 und 2.4) haben die für TRP-Kanäle typischen sechs Transmembrandomänen, mit intrazellulären der N- und der C-Termini. Die strukturelle Ähnlichkeit zu spannungsabhängigen Calcium-Kanäle legt nahe, dass die Porenregion aus der fünften und sechsten Transmembran-Helix und der verknüpfenden intrazellulären Schleife besteht. Die Pore wird aus der beschriebenen Region vier unabhängiger Kanaluntereinheiten gebildet (Cook und Minke, 1999).

Die Sequenzidentität der N-Termini und der Transmembranregion (N-TRPL As 1-335 TM-TRPL As 336-680, N-TRP As 336-673, TM-TRP As 1-330) von TRP und TRPL. Im N-Terminus beider Proteine werden mehrere Ankyrin-Repeats und eine teilweise überlappende coiled-coil-Domäne vermutet (Cook und Minke, 1999). Die unmittelbar an die erste Transmembran-Helix angrenzende Region zeigt Ähnlichkeiten zu beschriebene Caveolin-Bindestellen (Beobachtung des Autors).

Die mittels PSORT (PSORT II, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>, Nakai and Horton, 1997) gemachte Voraussage über die subzelluläre Lokalisation des TRPL zeigt, dass es sich mit einer 43,5%igen Wahrscheinlichkeit um ein Plasmamembran-ständige und mit einer 26,1%igen Wahrscheinlichkeit um ein ER-residentes Protein (ER, endoplasmatisches Retikulum) handelt. Bei den As 2-5 (GRKK) im N-Terminus das im As 1120-1123 (PKHR) C-Terminus des TRPL handelt es sich um mögliche ER-Retentionssignale. Im Gegensatz dazu wird TRP zu 43,5% als plasmamembran-ständig vorhergesagt und zu 13 % als ER-resident vorhergesagt. Eine manuelle Auswertung der Aminosäuresequenzen des TRP/TRPL zeigt ein mögliches Di-Leucin-Motiv (ExxxLL) ab As 42-47 (bei TRP As 33-38).

Der C-Terminus (TRPL As 681-1124, TRP As 674-1275) ist mit 19% Sequenzidentität die am schwächsten konservierte Region zwischen TRP und TRPL. Eine Ausnahme ist die C-terminal direkt an den Transmembran-Bereich angrenzende TRP-Box (EWKFAR). Die Funktion der TRP-Box ist nicht bekannt, sie wird als die Bindungsstelle von PIP₂ und bei der Assemblierung von TRPV1-Multimeren diskutiert (Nilius *et al.*, 2006; Garcia-Sanz *et al.*, 2004).

TRPL wird durch Calcium reguliert. Calcium wirkt abhängig von der Konzentration sowohl stimulierend als auch inhibierend (Harteneck *et al.*, 2000; Cook und Minke, 2002). Der TRPL-Kanal verfügt über zwei Calmodulin-binding-sites (CBSs) im C-Terminus (Abb. 2.5) (Phillips *et al.*, 1992; Warr und Kelly, 1996; Scott und Zucker 1998). Diese dienen der Ca²⁺-vermittelnden Schließung des Kanals.

Im C-Terminus des TRP befindet sich eine PEST-Sequenz. (Übersicht Minke und Cook, 2002). sowie eine prolinreiche Region, bei der das aus Lysin (K) und Prolin (P) bestehende Dipeptid 27mal wiederholt wird. Dieser Region folgt eine aus acht Aminosäuren bestehende Sequenz (DKDKKPG/AD), die neunmal wiederholt (Übersicht Minke und Cook, 2002). Die Funktion der beschriebenen Motive ist nicht bekannt. Nahe am C-Terminus befindet sich die INAD-Bindestelle, die durch ein S-X-V Motiv gebildet wird (Shieh und Zhu, 1996). INAD und TRP bilden den „Kern“ des Signalplex. Bei Verlust eines der beiden Kern-Komponenten oder der Wechselwirkung zwischen TRP und INAD führt zur Fehlverteilung aller peripheren Membran- und cytoplasmatischen Proteine des Signalplex (Li *et al.*, 2000)

Der Phänotyp der *trpl*-Mutanten wurde von Leung und Mitarbeitern (2000) beschrieben. Bei intrazellulärer Ableitung des Rezeptorpotentials ist die Peak-Amplitude von *trpl*-Mutanten für kurze Belichtungszeiten (2s) der Peak-Amplitude von *wt*-Fliegen sehr ähnlich, während bei Belichtung für 20s deutliche Unterschiede erkennbar sind. Bei der Belichtung über 20s fallen Rezeptorpotentiale sowohl des *wts* als auch der *trpl*³⁰²-Mutante ab. Die Annäherung an den Endwert erfolgt bei *trpl*-Mutanten, aber mit einer schnelleren Kinetik. Kennzeichnend für die *trpl*-Mutante sind 75 Hz Oszillationen des Rezeptorpotentials während der Plateau-Phase der Reizantwort bei mittlerer Belichtungsintensität.

Ein weiteres Merkmal der *trpl*-Mutanten ist die kurzfristige Hyperpolarisation nach Reizende. Anhand von Reiz-Reizantwort-Kurven bei unterschiedlicher Hintergrund-Beleuchtung wurde gezeigt, dass sich *trpl*-Mutanten nicht an schwache Lichtstimuli adaptieren. Die einfache arithmetische Summation der Rezeptorpotentiale, die in *trp*-, bzw. *trpl*³⁰²-Mutanten gemessen worden sind, ergibt laut Leung und Mitarbeiter kein *wt*-Rezeptorpotential; daraus schlossen die Autoren auf einen dritten Kanal, der sich aus TRP- und TRPL-Untereinheiten zusammensetzt (Leung *et al.*, 2000). In den Retinula-Zellen von *Drosophila* konnten drei Vertreter der TRPC-Familie nachgewiesen werden (Niemeyer *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000). An der Ausbildung eines Photorezeptorpotenzials sind sowohl TRP als auch TRPL beteiligt. Die Frage nach der biologischen Bedeutung von TRPL und TRP_γ kann noch nicht

abschließend beantwortet werden. TRP γ ist entweder nicht in der Lage, Homo-Multimere zu bilden oder spielt *in vivo* keine bedeutende Rolle für die Ausbildung des Photorezeptorpotenzials, da *trpl*³⁰² *trp*⁹-Doppelmutanten blind sind (Niemeyer *et al.*, 1996). Möglicherweise ist TRP γ aber als Heteromer mit TRPL aktiv (Xu *et al.*, 2000).

TRP, TRPL und TRP γ sind nicht nur für das Sehen verantwortlich. Kürzlich wurde gezeigt, dass sie auch in den Malpighi-Gefäßen von *Drosophila* exprimiert werden (Mac Pherson *et al.*, 2005). Sie dienen dort der Ca²⁺-abhängigen Signalübertragung und dem epithelialen Flüssigkeitstransport. Des Weiteren ist bekannt, dass in *Drosophila* olfaktorisches Lernen TRP-Kanal abhängig ist (Störtkuhl *et al.*, 1999).

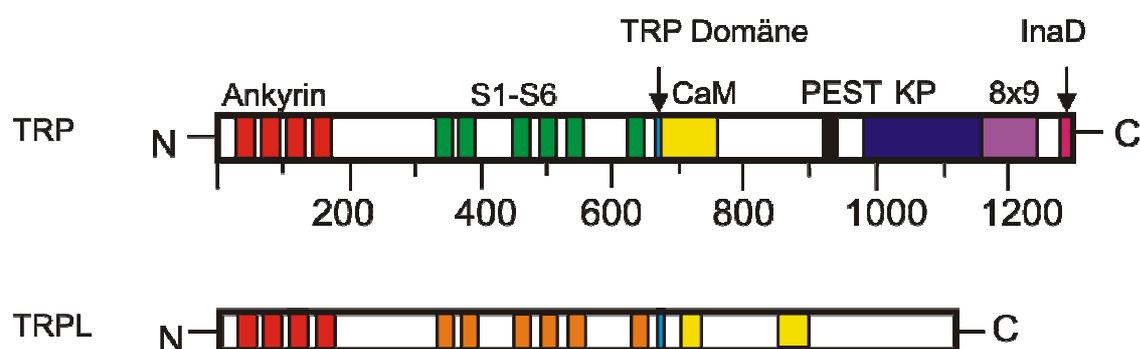


Abb. 2.4 Proteindomänen von TRP und TRPL

Ankyrin steht für die Ankyrin-Motive (rot), S1- S6 stellen die Transmembransegmente 1-6 dar (grün bzw. orange).

Die TRP-Domäne ist hellblau und die CaM-bindenden Bereiche sind gelb dargestellt. PEST steht für die PEST-Region (schwarz), einem Signal für den Proteinabbau. Der Abbau erfolgt durch die calciumabhängige Protease Calpain. KP (dunkelblau) stellt die prolinreiche Region dar. Das aus Lysin (K) und Prolin (P) bestehende Motiv wird mehrmals wiederholt. In lila ist die 9-fache Wiederholung der Aminosäuresequenz DKDKKPG/AD (8x9) dargestellt, die möglicherweise an der Protein-Protein-Interaktion mitwirken könnte. Die InaD-Bindestelle („inactivation no after potential“) ist pink dargestellt. Die Skala gibt die Anzahl der Aminosäuren an. (Verändert nach Minke und Cook, 2002)

2.4 Reizabhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation des TRPL-Kanals

Einige Vertreter der TRP-Kanäle sind in der Lage, auf einen Reiz hin ihre subzelluläre Lokalisation zu verändern. Dazu zählt der TRPL-Kanal von *Drosophila*. Das Vorhandensein von TRPL in der rhabdomerischen Membran trägt zur Sensitivität/ Adaptation der Photorezeptorzelle bei (Leung *et al.*, 2000). Das TRPL-Protein ist in der Lage, seine Lokalisation lichtabhängig zu verändern (Bähner *et al.*, 2002): Während sich das TRPL in lichtadaptierten Fliegen in einem intrazellulären Membrankompartiment befindet, ist es bei dunkeladaptierten Fliegen in der rhabdomerischen Membran angereichert (Abb. 2.5). Zur Unterscheidung, ob das TRPL-Protein lichtabhängig degradiert und neu synthetisiert wird, haben Bähner und Mitarbeiter die TRPL-Transkript-Mengen in licht- und dunkeladaptierten *Calliphorae* bestimmt. Die Northern-blot-Analyse der TRPL-Transkript-Menge brachte keine Hinweise auf eine lichtabhängige Regulation (Bähner *et al.*, 2002). Bei *Drosophila* hingegen oszilliert die TRPL-Transkript-Menge in 12 h L/D gehaltenen Fliegen (Ueda *et al.*, 2002). Die Menge an TRPL-Protein bleibt in der Gesamtmembranpräparation in hell- und dunkeladaptierten *Calliphorae* konstant. In isolierten Photorezeptormembranen nimmt sie jedoch im Dunkeln zu und im Hellen ab. Um zwischen der TRPL-Translokation bzw. Neusynthese/ Degradation unterscheiden zu können, führten Bähner und Mitarbeiter Pulse-Chase-Experimente an lebenden *Calliphorae* durch. Die TRPL-Neusynthese wurde verfolgt, indem man ³⁵[S]-Methionin ins *Calliphora*-Auge injizierte und anschließend die Fliegen für sechs Stunden in Dunkelheit inkubierte. Das neu synthetisierte TRPL war nach sechsständiger Adaptation im Dunklen maximal in der rhabdomerischen Membran angereichert. Die Analyse der gesamten TRPL-Menge (neu synthetisiert und bereits vorhanden) in der rhabdomerischen Membranfraktion erbrachte, dass sich die absolute Menge an TRPL in den Rhabdomeren nach 1 Stunde nicht mehr ändert. (Bähner *et al.*, 2002). Dieses Experiment legte nahe, dass das Auffüllen der Rhabdomere mit TRPL im Dunkeln durch den allmählichen Transport des neu synthetisierten TRPLs erfolgt.

Weitere Studien zeigten, dass für die lichtabhängige Änderung der subzellulären Lokalisation von TRPL die Aktivierung der Phototransduktionskaskade notwendig ist (Meyer *et al.*, 2006, Cronin *et al.* 2006). Durch Wasserimmersionsaufnahmen von hell- und dunkeladaptierten Fliegen, die TRPL-eGFP exprimieren, wurde gezeigt, dass für den Transport von TRPL vom Rhabdomer in den Zellkörper Rhodopsin 1 benötigt wird. In *NinaE*-Mutanten unterbleibt die TRPL-Translokation in das zelluläre Kompartiment (Meyer *et al.*, 2006). In analogen Versuchen mit Mutanten der visuellen Signaltransduktionskaskade konnte gezeigt werden, dass Gq, PLC, INAD und TRP für den Export aus dem Rhabdomer benötigt werden. Weitere Versuche legen nahe, dass TRP vorrangig als Ca²⁺-Lieferant und nicht als Interaktionspartner für Komponenten der Signaltransduktionskaskade gebraucht wird. Hierfür

spricht die Beobachtung, dass in isolierten Augen die lichtabhängige TRPL-Translokation aus dem Rhabdomer nur bei Vorhandensein von extrazellulärem Ca^{2+} stattfindet.

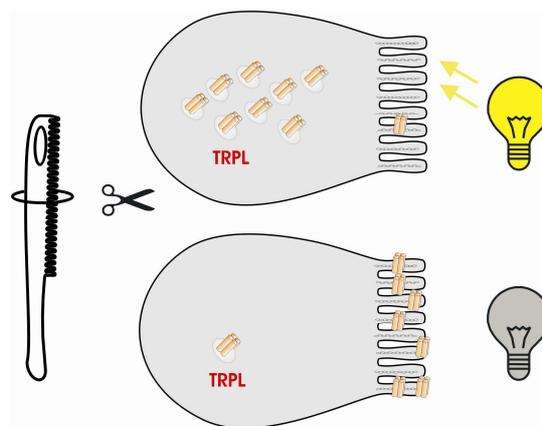


Abb. 2.5 Schema der lichtabhängigen Veränderung der subzellulären Lokalisation des TRPL
Erläuterungen siehe Text

Die Arbeit von Cronin *et al.* (2006) demonstriert, dass die Translokation des TRPL-Kanals von *Drosophila* in zwei Stadien erfolgt. Im ersten Stadium bewegt sich TRPL aus dem Rhabdomer in die angrenzende „stalk“-Membran. Dieser lichtabhängige Prozess erfolgt innerhalb von fünf Minuten, während die weitere Translokation zur basolateralen Membran mehr als sechs Stunden dauert. Eine immunhistochemische Untersuchung der TRPL-Verteilung in Mutanten zeigte, dass für die TRPL-Translokation in Stadium 1 PLC β , und für die weitere Translokation zur basolateralen Membran neben TRP auch ePKC benötigt.

TRP-Proteine aus anderen Organismen zeigen ebenfalls reizabhängige Translokation. Der N-Terminus des TRPC3 interagiert mit dem v-SNARE-Protein VAMP2 (vesicle associated membrane proteine 2). VAMP2 reguliert den Transport von TRPC3 zur Plasmamembran (Singh *et al.*, 2004). Für die Translokation des TRPV1 zur Plasmamembran wurde die Beteiligung einiger SNARE-Proteine gezeigt. Die SNARE-Proteine Syt IX (Synaptotagmin IX) und Snapin interagieren mit den Ankyrin-Wiederholungen im N-Terminus des TRPV1 (Morenilla-Palao *et al.*, 2004).

TRPV-Kanäle translozieren nach Stimulation mit einem Agonisten (Johannsen *et al.*, 2006; Übersicht Niemeyer, 2005). Die Beteiligung der monomeren GTPase Rab11 am vesikulären Transport zur Plasmamembran wurde für die Ionenkanäle TRPV5 und TRPV6 gezeigt (van de Graaf *et al.*, 2006). Bei *Drosophila* ist Rab11 essentiell für den vesikulären Transport von Rhodopsin1 und TRP in die rhabdomerische Membran der Photorezeptorzellen (Satoh *et al.*, 2005).

2.5 Zusammensetzung der TRP-Kanalmultimere in *Drosophila*-Photorezeptorzellen

Xu und Mitarbeiter (Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000) regten durch eine Reihe biochemischer und elektrophysiologischer Untersuchungen die Frage nach der Existenz von TRP/TRPL-Heteromultimeren an. Die Autoren wiesen die Existenz von TRP/TRPL-Heteromultimeren in transient co-transfizierten Zellen nach. Diese Experimente führten zu der heute verbreiteten Annahme, dass TRP-Homomultimere und TRP/TRPL-Heteromultimere den überwiegenden Anteil der rhabdomerischen TRPC-Kanäle darstellen. Die Autoren gingen dabei von der Vorstellung aus, dass Kanaluntereinheiten, die zufällig aufeinander treffen, sich zu Multimeren zusammenlagern (ähnliche Prozesse wurden mit dem Begriff „random collision“- oder „diffusion-collision“-Modell bezeichnet). Unter Annahme dieses Modells sind vor allem zwei Faktoren für die Bildung von Homo- und/oder Heterotetrameren bestimmend: Das Mengenverhältnis der möglichen Interaktionspartner und die Affinität der Untereinheiten zueinander.

TRPL konnte aus Kopfmembranpräparationen und transfizierten Zellen mit einem α -TRP-Antikörper präzipitiert werden. Co-IP-Experimente von TRP- und TRPL-Untereinheiten aus rhabdomerischen Extrakten von *Calliphora erythrocephala* konnten die Existenz von TRP/TRPL-Heteromeren zumindest für *Calliphora erythrocephala* nicht bestätigen (Paulsen *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis ist interessant, da sich entsprechende *Calliphora*-Orthologe bezüglich der Wanderung und Elektrophysiologie ähnlich verhalten wie *Drosophila* TRP/TRPL. Um die zur Interaktion notwendigen Domänen zu finden, wurden two-hybrid-Analysen mit N- und C-terminalen Domänen von TRP bzw. TRPL durchgeführt (Xu *et al.*, 1997). Die homophile und heterophile Interaktion zwischen TRP und TRPL N-Termini wurde durch GST-Pull-Down-Experimente bestätigt (Xu *et al.*, 1997). Einzelkanalströme heterolog exprimierter TRP-Kanäle konnten durch gleichzeitige Expression N-terminaler Fragmente von TRP oder TRPL unterdrückt werden. Vergleichbare Experimente unter Verwendung dominant-negativer Kanaluntereinheiten legten ebenfalls die Bildung von TRP/TRPL-Heteromultimeren nahe (Xu *et al.*, 1997).

In Zellkultur und Xenopus-Oozyten co-exprimierte TRP/TRPL-Kanäle zeigen Strom-Spannungskurven, die sowohl TRP- als auch TRPL-spezifische Eigenschaften widerspiegeln (Gillo *et al.*, 1996; Harteneck *et al.*, 1995).

In situ Messungen an isolierten Ommatidien aus *trp*-, *trpl*- und *wt*-Fliegen bestätigen die Ergebnisse aus heterologen Expressionssystemen jedoch nicht (Reuss *et al.* 1957). Ionenselektivität und Strom-Spannungskurven von *wt*-Fliegen zeigten im Vergleich zu den Einzel-Kanal-Mutanten, dass die Stromantwort wildtypischer Fliegen zwischen den Werten der *trpl*- bzw. *trp*-Mutanten liegt. Dieses Ergebnis deutet auf unabhängige TRP- und TRPL-Komponenten hin, deren Eigenschaften additiv sind. *wt*-Fliegen zeigen ein biphasisches Umkehrpotential. Reuss und Mitarbeiter zeigten, dass für das biphasische Umkehrpotential

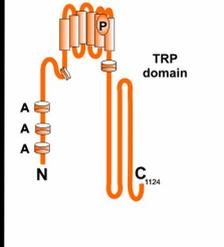
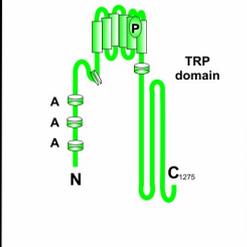
in *wt*-Fliegen die sequenzielle Aktivierung von TRP und TRPL-Kanälen verantwortlich ist. Die Analyse von Stromfluktuationen in isolierten Ommatidien („channel noise“) ermöglicht es, in *trpl*- bzw. *trp*-Mutanten Einzelkanal-Leitfähigkeiten zu berechnen (TRPL- Kanal: 35 pS; TRP-Kanal: 4 pS in Ca²⁺-freier Ringer-Lösung: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM Ca²⁺, und 4 mM Mg²⁺). Die in *wt*-Ommatidien gemessene Leitfähigkeit zeigt eine charakteristische Spannungsabhängigkeit. Diese Spannungsabhängigkeit kann durch ein Modell vorhergesagt werden, welches eine einfache Addition der Kanalleitfähigkeit von TRP und TRPL annimmt (Reuss *et al.*, 1997).

Die Rezeptorzellen der *trp*-Mutanten repolarisieren während des Lichtstimulus, das Rezeptorpotenzial ist transient (Cosens und Manning 1969). Im Gegensatz zum markanten Phänotyp der *trp*-Mutanten hat die amorphe *trpl*³⁰²-Mutante einen weniger eindeutigen ERG-Phänotyp. Einen Katalog des *trpl*³⁰²-Phänotyps legten Leung und Mitarbeiter anhand intrazellulärer Ableitungen des Rezeptorpotentials vor (Leung und Pak 2002). Diese Methode misst ebenso wie die Elektroretinographie das Photorezeptorpotenzial als Funktion aller an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten. Der Unterschied zum ERG liegt darin, dass die Eigenschaften einzelner Rezeptoren gemessen werden, während die Elektroretinographie als extrazelluläre Ableitung des Rezeptorpotentials die elektrophysiologischen Eigenschaften der gesamten Retina erfasst. Leung und Mitarbeiter untersuchten die Homo- oder Heteromultimerisierung von TRP und TRPL. Die Autoren verglichen die elektrophysiologischen Phänotypen mutanter Fliegen, die geringe Mengen an INAD-gebundenem TRP exprimierten, mit Fliegen, die normale Mengen nicht-INAD-gebundenes TRP-Protein exprimierten. Messungen der Refraktär- und Latenzzeiten nach Stimulation der Rezeptorzellen zeigten in Rezeptorzellen, die nicht-INAD-gebundenes TRP exprimierten, geringere Unterschiede zum *wt*. Wurde in beiden Mutanten zusätzlich TRPL entfernt, waren die Defekte in der Mutante, die wildtypische Mengen nicht-INAD-gebundenes TRP-Protein exprimierte, ausgeprägter. Die TRP-Menge nahm in diesen Fliegen bei zusätzlicher Entfernung von TRPL ab. Aus diesen Ergebnissen schlossen Leung und Mitarbeiter, dass nicht INAD-gebundenes TRP durch physische Interaktion mit TRPL in der rhabdomerischen Membran gehalten wird (Leung *et al.*, 2000).

2.6 Fragestellung

Die Translokation zwischen Zellkompartimenten ist für Mitglieder unterschiedlicher TRP-Familien beschrieben worden (Übersicht: Niemeyer, 2006; Ambudkar, 2007; Witzgall R., 2007). Die Veränderung der Ionenkanal-Zusammensetzung von Membranen ist eine bislang wenig untersuchte Form der Regulation neuronaler Signale. Der *Drosophila*-TRPL-Kanal befindet sich abhängig von den Lichtverhältnissen in den Rhabdomeren oder in einem intrazellulären Kompartiment, während die Verteilung des TRP-Kanals auf die Rhabdomere beschränkt ist. Die lichtabhängige An/Abreicherung des TRPL in der rhabdomerischen Membran vergrößert den Bereich an Lichtintensitäten, auf den die Photorezeptoren reagieren können (Bähner *et al.*, 2002).

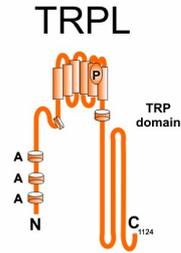
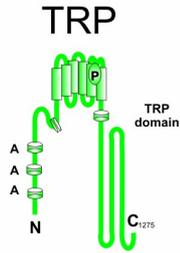
Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Funktion N- und C-terminaler Proteindomänen für die subzelluläre Lokalisation, Assemblierung, und Physiologie der TRP-Ionenkanäle in *Drosophila*-Photorezeptoren. Unterschiede in den elektrophysiologischen, biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von TRP und TRPL sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 zusammengefasst.

Kanaleigenschaften		
E_{rev}	-4,3 mV	11,6 mV
Permeabilität	$P_{Na}:P_{Cs}$ 4.3 $P_{Ca}:P_{Cs}$ 0.84	$P_{Na}:P_{Cs}$ 1.27 $P_{Ca}:P_{Cs}$ 109.9
Ligand	PUFA	PUFA
Leitfähigkeit	35 pS	4 pS
ERG-Phänotyp der Mutante	on-Transient fehlt 75Hz-Oszillationen	Rezeptorpotential ist transient

Tab. 2.1 Kanal-Eigenschaften von *Drosophila*-TRP und -TRPL im Vergleich

PUFA: Poly-unsaturated fatty acid; E_{rev} : Umkehrpotential.

Angaben nach Leung und Pak, 2000; Reuss *et al.*, 1997; Chyb *et al.*, 1999; Hendersson *et al.*, 2000.

Zellbiologie/ Biochemie		
lichtabhängige Translokation	+	-
subzelluläre Verteilung	Rhabdomere/ intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere
ER-Retentions -Motive		
KKXX-Motiv	C-Terminus As 1120-1123 PKHR	-
XXRR- Motiv	N-Terminus As 2-5 GRKK	
INAD-Bindung	nicht gesichert	C-Terminus As 1272-1275 GWL
ϕ XX ϕ -Motiv Y..[LMVIF]	mehrere vorhergesagt experimentell noch nicht bestätigt	

Tab. 2.2 Biochemische/zellbiologische Eigenschaften von *Drosophila*-TRP und TRPL im Vergleich

Angaben nach Bähner *et al.*, 2002; Cronin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2001; Harteneck *et al.*, 2002.

Vorhersage der Motive durch ELM server: <http://elm.eu.org/>

Drosophila-Photorezeptorzellen bieten ein großes Repertoire genetischer, biochemischer und elektrophysiologischer Methoden zum Studium von Ionenkanal-Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*.

Der Einfluss der cytoplasmatischen N- oder C-Termini von TRPL auf die lichtabhängige Translokation sollte anhand von chimären Proteinen aus TRP/TRPL untersucht werden. Hierfür sollte der C- und oder der N-Terminus des TRP durch die entsprechende Region aus TRPL ersetzt werden. Für die Überexpression dieser Kanal-Varianten in Photorezeptorzellen wurde ein geeigneter Vektor konstruiert, der durch Verwendung der Gateway-Technologie die Erzeugung transgener *Drosophilae* beschleunigt. Die Wirkung der paralogen

Proteindomänen auf die Translokation der Chimären kann durch die Fusion mit eGFP am C-Terminus der Proteine an intakten *Drosophila*-Augen verfolgt werden. Zusätzlich sollten TRPL-Varianten mit Deletionen im C- oder N-Terminus helfen, die Funktion dieser Proteindomänen bei der Assemblierung und Translokation auf kleinere Bereiche einzugrenzen. Die funktionale Wechselwirkung von TRPL und TRP bei der Erzeugung des Photorezeptorpotenzials und der Translokation gilt als gesichert. Die Zusammensetzung der Kanäle *in vivo* ist jedoch Gegenstand aktueller Diskussion. Die Bildung von Heteromeren und Homomeren aus TRPL/TRP-Untereinheiten sollte besonders als mögliche Voraussetzung für die Translokation untersucht werden. Die Auswahl der Bindungspartner der chimären Ionenkanäle sollte Rückschlüsse auf Proteindomänen erlauben, die bei der Assemblierung der Multimere beteiligt sind.

TRP und TRPL unterscheiden sich hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften (Tab. 2.1). Elektroretinogramme der Fliegen, welche die chimären Proteine exprimieren, sollten zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Kanal-Eigenschaften von TRPL und TRP beitragen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Die verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit (p.A., pro Analysis) und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Serva, Sigma oder Fluka bezogen. Weitere Chemikalien und Labormaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen.

Kanülen	0,45 x 35 mm	B. Braun
Mikrosiebsatz		NeoLab
PVDF-Membran		BioRad
PFO Perfluorooctanoat, reinst		ABCR GmbH & Co. KG Karlsruhe
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase		peqlab Erlangen Germany
protein molecular mass marker kit (MW-GF-1000)		Sigma (St. Louis, MO,)
Molekulargewichtsstandard: Precision Plus Protein Standard 10-250 kDa		BioRad
Röntgenfilme CL-XPosure		Pierce
Röntgenfilmentwickler, Röntgenfilmfixierer		Eastmann KODAK Company
ECL Western Blotting Analysis System		Amersham

3.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1x SDS-PAGE Extraktionspuffer	5% (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
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 (mit Tris/Glycerin einstellen)
2x PFO-Ladepuffer	100 mM Tris Base, 8%-NaPFO(w/v), 20%(v/v) glycerol, 0.005% Bromphenolblau; pH 8.0
RIPA-modifiziert	50 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl 1,5 % NP-40 0,2 % Dodecylmaltosid 0,1 % SDS
Laufpuffer-PFO	25 mM Tris, 192 mM Glycine 0.5% (w/v) NaPFO; pH 8,5
1x Blotpuffer	50mM Tris 0,1% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
TBS-Tween	50mM Tris/HCl, pH 7,3
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween	50mM NaCl 0,1% (w/v) Tween 20
Triton X-100 Extraktionspuffer (TXEP)	50mM Tris/HCl, pH 8,0 150mM NaCl

Triton X-100 Waschpuffer (TXWP)	1% (v/v) Triton X-100 4mM PMSF (frisch) 50mM Tris/HCl, pH 8,0 100mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 4mM PMSF (frisch)
0,1M Phosphatpuffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ 0,1M NaH ₂ PO ₄ pH 7,2
Injektionspuffer	0,1mM Phosphatpuffer pH 7,2 5mM KCl
Apfelsaftagar	Agar-Agar (3% (w/v)) 1,67% (w/v) Saccharose, 1,33% (v/v) Nipagin (10% in Ethanol) 33,3% Apfelsaft

3.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western Blots (WB) und Immunopräzipitationen (IP) verwendet.

Antikörper	erzeugt in:	Verdünnung	Referenz
α-DmTRP	Kaninchen	1:1500 (WB)	Bähner, 2001
α-DmTRPL	Kaninchen	1:2000 (WB)	Fa. Chemicon
α-GFP	Maus	0,4 µg/µl (IP)	Fa. Roche
α-rabbit-HRP	Ziege	1:10.000	Fa. Sigma

Tab. 3.1 Verwendete Antikörper (Dm: *Drosophila melanogaster*, HRP: horseradishperoxidase)

3.1.4 Versuchstiere

In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *Drosophila*-Stämme aufgelistet.

In Tabelle 3.3 sind die in dieser Arbeit hergestellten *Drosophila*-Stämme aufgelistet.

Laborinterne Bezeichnung	Genotyp	Quelle
A 35 (<i>w^t</i>)	(<i>w[*]</i>) OregonR	
Y 41	<i>yw</i> ; CyO(Cy)/ Sp; MKRS(Sb)/ TM2(Ubx)	
<i>yw</i>	<i>yw</i> ; ;	
trpl-eGFP	<i>yw</i> ; P[Rh1>trpl- eGFP, <i>y⁺</i>] ;	(Meyer et al., 2006)
trpl-eGFP trpl ⁻	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² ; P[Rh>1trpl- eGFP, <i>y⁺</i>]	(Meyer et al., 2006)
trpl-eGFP trp ⁻	<i>yw</i> ; ; P[Rh1>trpl- eGFP, <i>y⁺</i>] , trp ⁹	(Meyer et al., 2006)
trpl-eGFP trpl ⁻ , trp ⁻	<i>yw</i> , P[Rh1>trpl- eGFP, <i>y⁺</i>] , trpl ³⁰² ; trp ⁹	(Meyer et al., 2006)
trp ⁻ (trp ⁹)	<i>yw</i> ; ; trp ⁹ oder <i>yw</i> ; CyO (Cy)/ Sp; trp ⁹	(Pak et al., 1979)
trpl ⁻ (trpl ³⁰²)	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² ;	(Niemeyer et al., 2006)

Tab. 3.2 Verwendete *Drosophila*-Stämme

Laborinterne Bezeichnung	Genotyp
Chimäre 1 (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim1, <i>y⁺</i>] ;
Chimäre 1 trpl ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim1, <i>y⁺</i>] , trpl ³⁰² ;
Chimäre 1 trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim1, <i>y⁺</i>] ; trp ⁹
Chimäre 1 trpl ⁻ , trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim1, <i>y⁺</i>] ,trpl ³⁰² ; trp ⁹
Chimäre 2 (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim2, <i>y⁺</i>] ;
Chimäre 2 trpl ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim2, <i>y⁺</i>] , trpl ³⁰² ;
Chimäre 2 trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim2, <i>y⁺</i>] ; trp ⁹
Chimäre 2 trpl ⁻ , trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim2, <i>y⁺</i>] , trpl ³⁰² ; trp ⁹
Chimäre 3 (3 rd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim3, <i>y⁺</i>]
Chimäre 3 trp ⁻ (3 rd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>Chim3, <i>y⁺</i>] , trp ⁹
Chimäre 3 trpl ⁻ , trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² /trpl ³⁰² ; P[Rh1>Chim3, <i>y⁺</i>] ,trp ⁹
Chimäre 3 trpl ⁻ (3 rd)	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² ; P[Rh1>Chim3, <i>y⁺</i>]
trp-eGFP (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>trp- eGFP, <i>y⁺</i>] ;
trp-eGFP trpl ⁻ (3 rd)	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² ; P[Rh1>trp-eGFP, <i>y⁺</i>] ;
trp-eGFP trp ⁻ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>trp-eGFP, <i>y⁺</i>] ; trp ⁹
trp-eGFP trpl ⁻ , trp ⁻ (3 rd)	<i>yw</i> ; trpl ³⁰² ;P[Rh1>trp-eGFP, <i>y⁺</i>] , trp ⁹
ΔAnk; trp ⁹ (2 nd)	<i>yw</i> ; P[Rh1>ΔAnk trpl- eGFP, <i>y⁺</i>] ; trp ⁹

Δ Ank, trp ⁹ (3 rd)	<i>yw; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺], trp⁹</i>
trpl ³⁰² Δ Ank; (3 rd)	<i>yw; trpl³⁰²; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ Ank (2 nd);	<i>yw; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ Ank, trp ⁹ (3 rd)	<i>yw; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺], trp⁹</i>
Δ Ank (2 nd); Δ Ank (3 rd)	<i>yw; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺]; P[Rh1>>ΔAnk trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ C (X-chr)	<i>yw, P[Rh1>>ΔC trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ C (3 rd)	<i>yw; P[Rh1>>ΔC trpl- eGFP,y⁺]</i>
Δ C (3rd); trpl ³⁰² (3 rd)	<i>yw; trpl³⁰²; P[Rh1>>ΔC trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ Int; trpl ³⁰² (3 rd)	<i>yw; trpl³⁰²; P[Rh1>>ΔInt trpl-eGFP,y⁺]</i>
Δ N; trpl ³⁰² (2 nd)	<i>yw; P[Rh1 >ΔN trpl- eGFP,y⁺], trpl³⁰²</i>
INAD-eGFP (2 nd)	<i>yw; P[Rh1> InaD-eGFP,y⁺]</i>
<i>yw; CyO(Cy)/ Sp; MKRS(Sb), trp⁹/trp⁹</i>	<i>yw; CyO(Cy)/ Sp; MKRS(Sb), trp⁹/ trp⁹</i>

Tab. 3.3 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *Drosophila*-Stämme
 ((2nd) und (3rd) geben die Insertion des P-Elements auf dem zweiten oder dritten Chromosom an), die Kreuzungen erfolgten mit Standardmethoden (Greenspan R.J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)

3.1.5 Soft- und Hardware, Geräte

Thermocycler	Perkin-Elmer, Cetus
Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop	Leica DM LFS, Fa. Leica AG
Digitale Kamera	Leica DC200, Fa. Leica AG Camera
Software für Kamera	Leica DC Twain, Fa. Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Fa. Carl Zeiss Oberkochen
Digitale Kamera	Spot, Fa. Spot Diagnostic Instruments Inc.
Software für Kamera	Spot Advanced, Fa. Spot Diagnostic Instruments Inc.

Bildbearbeitung	CorelDRAW 12, Corel, Ottawa (Kanada) Adobe Photoshop 6, Adobe Systems GmbH (Unterschleißheim)
Whole-Cell-Analysis-Software	3.0.8, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK
Prism	GraphPad Software, Inc.11452 El Camino Real, #215San Diego, CA 92130 USA
BioCapt Gel-Dokumentationssystem	BioCapt-Software Version 99.02s, Fa. LFT Labortechnik
Bioinformatik (Homologie-Vergleiche)	Jellyfish, LabVelocity
SDS-PAGE Zubehör (Mighty Small)	Hoefer, Amersham, Freiburg
Semi-Dry Blotapparatur, Transblot SD	BioRad, Freiburg
Tischzentrifuge	Beckmann, München
Digitalisierung: Western- Blot,	Flachbrettscanner Canon

3.1.6 Öffentliche Internetquellen

NCBI (National Center for Biotechnology Information), PubMed:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

Flybase (National Institute of Health): <http://flybase.bio.indiana.edu/>

EMBnet: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

PSORT: <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>

ELM: <http://elm.eu.org/>

3.2 Methoden

3.2.1 Aufzucht und Haltung von Fliegen

Die Aufzucht und Haltung der Fliegen erfolgte auf einem Maismehl-Nährmedium (5% (w/v) Maismehl, 3,2% (w/v) Zucker, 1,2% (w/v) Agar, 2,4% Frischhefe, 0,5% Propionsäure und 0,0064% (w/v) 4-Hydroxybenzoemethylester, Ascorbinsäure) in speziellen Zuchtgefäßen. Die Fliegen wurden im Brutraum (25°C) aufgezogen oder bei Raumtemperatur (15°C) gehalten.

3.2.2 Präparation biologischen Materials

3.2.2.1 Massenisolation von *Drosophila*-Köpfen

Zwei Tage alte Fliegen wurden für 12-18 h in Dunkelheit gehalten. Danach wurden die Fliegen mit CO₂- Gas betäubt und mit einem Trichter in ein 50 ml Falcon-Tube gekippt. Das Falcon-Tube wurde zuvor mit einer glühenden Kanüle perforiert. Das präparierte Falcon-Tube wurde in flüssigen Stickstoff getaucht und mehrmals über Kopf geschüttelt. Anschließend wurden die Fliegen in einen in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Micro-Siebsatz (enthält 4 verschieden große Siebsätze; von oben nach unten werden die Siebe stets feiner, neoLab, Heidelberg) überführt und kräftig geschüttelt. Durch diese Schüttelbewegungen brachen die Köpfe der vitrifizierten *Drosophilae* vom Abdomen ab und fielen durch die groben Siebmaschen in einen Bereich mit kleineren Maschen, wo sie sich anreicherten. Die Köpfe wurden aus dem Sieb mit Hilfe eines Trichters in ein vorgewogenes Eppendorfgefäß überführt. Das Eppendorfgefäß mit den Köpfen wurde anschließend gewogen, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Belichtung der Fliegen

Fliegen im Alter von ein bis zwei Tagen wurden für die Belichtungen verwendet. Die Fliegen wurden in eine orangefarbige Plexiglasbox gesetzt und, wenn nicht anders angegeben, über Nacht im Abzug belichtet. Dunkeladaptierte Fliegen wurden ebenfalls über Nacht in eine Dunkelbox gesetzt.

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie intakter Fliegenretinae

Untersuchung der Photorezeptorzellen mittels Wasserimmersionsmikroskopie. Für die mikroskopische Untersuchung der Retinula wurde die Cornea der Komplexaugen mit Wasser optisch neutralisiert. Die Retinulazellen wurden anhand der eGFP-Fluoreszenz epitopmarkierter Proteine identifiziert. Es wurden Fliegen im Alter von zwei Tagen verwendet. Die Fliegen wurden mit Diethylether stark anästhesiert/abgetötet. Die Fliege wurde mit der dorsalen Seite nach unten gedreht und mit einer Insektennadel am Thorax aufgespießt. Die Insektennadel mit der Fliege wurde mittels Plastilin auf einem Objektträger fixiert. Das Präparat wurde so orientiert, dass das Komplexauge dem Objektiv zugewandt war. Das Präparat wurde vollständig mit destilliertem Wasser benetzt. Die eGFP-Fluoreszenz bei orthodromer Beleuchtung (Kirschfeld und Franceschini, 1968; 1971) wurde mikroskopisch (DM LSF; Fa. Leica) unter Verwendung eines 20-fachen Wasserimmersionsobjektivs dokumentiert. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberlampe (100W, ebq 100 dc-1; Fa. Jena GmbH). Der Bandpass-Anregungsfilter (Filtersatz 13; Fa. Leica) transmittiert nur Licht im Wellenbereich zwischen 450 und 490nm. Der dichromatische Teilerspiegel reflektiert kurzwellige Erregungsstrahlung zum Präparat hin, ist aber transparent für das emittierte Licht der Wellenlänge größer als 510nm. Der Langpass-Emissionsfilter ist durchlässig für Wellenlängen über 515nm. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels einer digitalen Kamera (DC200; Fa. Leica) dokumentiert.

3.2.5 Untersuchung isolierter Ommatidien

Fünf bis sechs Fliegen wurden mit CO₂-Gas betäubt und unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) im Weißlicht auf einem Objektträger präpariert. Die Köpfe wurden vom Körper mittels einer Kanüle (Fa. Braun) abgetrennt und die Köpfe sofort in 30µl „Grace’s insect cell culture medium“ (Fa. Gibco) aufgenommen. Mit Hilfe einer Kanüle wurden die Augen aus den Köpfen geschnitten. Überschüssiges Medium wurde mit einem Whatman-Filterpapier entfernt. Die präparierten Augen wurden mit einem Deckgläschen gespreitet, so dass sich die Ommatidien vereinzeln.

Die Dokumentation der präparierten Ommatidien erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss). Dokumentiert wurde die Epifluoreszenz mit einem 100-fachen Ölimmersionsobjektiv in Ölimmersion (Immersionsoil™ 518F, Fa. Carl Zeiss). Als Lichtquelle diente eine Quecksilberlampe (HBO 100, XBO 75W, Fa. Carl Zeiss). Die Fluoreszenzsignale wurden mittels einer digitalen Kamera (Spot, Fa. Spot Diagnostic Instruments Inc.) dokumentiert.

3.2.6 Keimbahntransformation von *Drosophila*

Zwei bis acht Tage alte *yw*-Fliegen wurden für die Eiablage in ein Ablagegefäß überführt, die Gefäßöffnung wurde mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen. Zur Stimulation der Eiablage wurde die Apfelsaftagarplatte mit Hefepaste (Backhefe und Leitungswasser, mit Zahnpasta-Konsistenz) bestrichen. Die Apfelsaftagarplatte wurde alle 30min durch eine neue ersetzt. Dieser Vorgang wurde drei bis viermal wiederholt und die Platten wurden verworfen, um den Anteil überalterter Eier zu minimieren. Die abgelegten Eier auf der Apfelsaftagarplatte wurden mit einem Pinsel in eine Filtereinheit (abgeschnittenes 50ml Falcon-Tube, mit im Deckel eingearbeitetem Nylon-Netz) überführt und mit Natriumhypochlorid-Lösung (1 Teil Natriumhypochlorid, 1 Teil H₂O) ca. 1,5min dechorioniert. Anschließend wurden die Eier mit Leitungswasser gewaschen und mit einem Pinsel auf ein ca. 2x1 cm großes Apfelsaftagar-Blöckchen überführt. Die Embryonen/Eier wurden mit einer Präpariernadel auf dem Blöckchen ca. 1,5 „Embryonen-Längen“ vom Rand des Blöckchens aufgereiht. Der posteriore Bereich der Embryonen war dem Blöckchenrand zugewandt. Die Embryonen wurden dann mit einem Klebstoff (in n-Heptan gelöstes Scotch-Klebeband) beschichteten Deckgläschen abgenommen. Zum Trocknen der Embryonen wurden die Deckgläschen für ca. 7min in eine mit Silicagel gefüllte Plastikdose gestellt. Anschließend wurden die Embryonen mit Öl (Votalef-10S-Öl) überschichtet.

Die P-Element-Vektor(1 mg/ml) wurde mit 0,25 mg/ml $\pi\Delta 2-3$ -Vektor in Injektionspuffer (mit Carbenicillin 1mg/ml) gemischt. Der fertige Injektionsmix (DNA, in die Injektionsnadel (sterile Femtotips, Fa. Eppendorf) wurde mit Hilfe eines Filamentes in die Hohlnadelspitze pipettiert und diese in der Halterung des Mikroinjektors montiert. Die Spitze der Nadel wurde entweder abgebrochen oder mehrmals in einem überalterten Embryo gestochen, bis die Nadel offen war.

Die Injektion der DNA in die Embryonen erfolgte unter dem Invertmikroskop (Axiovert 35, Fa. Zeiss) mit Hilfe des Mikromanipulators in den posterioren Pol der Embryonen. Die Injektor-Einstellungen: P1 (Reinigungsdruck) 400hPa; P2 (Injektionsdruck) ca. 450hPa, P3 (Haltedruck) 80hPa. Der Injektionsdruck wurde je nach Durchmesser der Glaskapillare variiert. Das injizierte Volumen betrug ca. 2% des Embryovolumens. Überalterte Embryonen wurden mit der Injektionsnadel durchstoßen, um sie zu zerstören.

Die injizierten Embryonen wurden mit dem Deckgläschen in eine feuchte Kammer (Apfelsaftagarplatte mit Aussparungen in dem sich Wasser befindet) gelegt. Die geschlüpften Larven wurden abgesammelt und in ein Zuchtgefäß überführt.

Die Injektion und die Aufbewahrung der injizierten Embryonen erfolgten bei 18°C.

3.2.7 Biochemische Methoden

3.2.7.1 Präparation von Protein-Gesamtextrakten aus *Drosophila*-Köpfen

Die vitrifizierten Fliegenköpfe wurden in 1x SDS-Extraktionspuffer (2µl/Kopf) und PMSF (Endkonzentration 4mM) mit einem Mikro-Pistill homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Homogenat wurde dann zur Abtrennung der Chitinreste 10min bei 20.000g/4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurden die Proben mit ½ Volumen 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt.

3.2.7.2 Proteinextraktion aus Fliegenköpfen für Immunopräzipitation

Zu den bei -80°C gefrorenen Fliegen-Köpfen wurde TXEP (2µl/Kopf) mit PMSF (Endkonzentration 4mM) gegeben und anschließend mit einem Mikro-Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde 5min im Ultraschallbad extrahiert. Die Chitinreste wurden durch 5min Zentrifugation bei 20.000g/4°C abgetrennt. Der Extrakt (Überstand) für 30min bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot (20µl, Überstand vor IP) entnommen und mit dem ½ Volumen 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Der Überstand wurde unmittelbar für die Co-Immunopräzipitation verwendet oder in flüssigen Stickstoff vorgekühlt und bei -80°C bis zur Immunopräzipitation gelagert.

3.2.7.3 Proteinextraktion mit modifiziertem RIPA-Puffer aus Fliegenköpfen für Co-Immunopräzipitation

Zu den bei -80°C gefrorenen Fliegen-Köpfen wurde modifizierten RIPA (2µl/Kopf) mit PMSF (Endkonzentration 4mM) gegeben und anschließend mit einem Mikro-Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde 5min im Ultraschallbad extrahiert. Die Chitinreste wurden durch 5min Zentrifugation bei 20.000g/4°C abgetrennt. Der Extrakt (Überstand) für 30min bei 100.000g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot (20µl, Überstand vor IP) entnommen, mit dem ½ Volumen 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Der Überstand wurde unmittelbar für die Co-Immunopräzipitation verwendet.

3.2.7.4 Co-Immunopräzipitation von *Drosophila*-Proteinextrakten

Zur Präzipitation der eGFP-Fusions-Proteine aus *Drosophila*-Köpfen wurde der monoklonale α -GFP-Antikörper (Fa. Roche) und Protein G-Beads (Fa. Roche) verwendet. Abhängig von der verwendeten Extraktionsmethode (TXEP oder RIPA-Puffer) wurden die Waschschriffe mit TXWP oder modifiziertem RIPA-Puffer durchgeführt.

Die benötigte Menge an Protein G-Beads wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze entnommen und dreimal mit 500 μ l TXWP (oder modifiziertem RIPA-Puffer) gewaschen. Für die Kopplung der Antikörper wurden die Beads und der Antikörper (35 μ l Beads und 25 μ l Antikörper/ 500 Köpfe) für 1,5h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert (1min, 20.000g, 4°C) und dreimal mit 500 μ l TXWP (oder modifizierter RIPA-Puffer) gewaschen, um die ungekoppelten Antikörper zu entfernen.

Für die Immunopräzipitation wurde der hergestellte Proteinextrakt mit den Antikörpergekoppelten Beads für 1,5-2 h bei 4°C geschüttelt. Danach wurden die Beads abzentrifugiert (1min, 14.000g, 4°C) und ein Aliquot des Überstandes (20 μ l, Überstand nach IP) entnommen. Das Aliquot wurde mit dem $\frac{1}{2}$ Volumen 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Das Präzipitat wurde viermal mit 600 μ l TXWP (oder modifizierter RIPA-Puffer) gewaschen, wobei der Überstand mit einer Kanüle (Fa. Braun) abgenommen wurde. Anschließend wurde das Präzipitat mit 20 μ l 3x SDS-PAGE Auftragepuffer versetzt und 5min bei 80°C gekocht, um die präzipitierten Proteine von den Beads zu eluieren. Zum Abtrennen der Beads wurde für 1min bei 14.000g und 4°C zentrifugiert, und der Überstand (IP) bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7.5 SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte in vertikalen Flachgelen mit einer Dicke von 0,75mm. Es wurden homogen konzentrierte Trenn- und Sammelgele in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgelpuffer pH 6,8, Trenngelpuffer pH 8,8, Elektrodenpuffer pH 8,4) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

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

Tab. 3.4 Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

Die Einstellung der Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentration erfolgte aus kommerziell erhältlicher 40% Lösung (Fa. Roth; Mischungsverhältnis 37,5:1) Die Länge des Sammelgels betrug 1cm, die des Trenngels 5cm. Die Elektrophorese wurde mit einer „2050 Midget“ Elektrophorese-Einheit (Fa. Amersham) bei konstanten 20mA pro Gel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente die Proteinleiter „Precision Plus Protein Standard“ (Fa. BioRad). Die verwendeten Puffer sind in Kapitel 3.1.2 aufgeführt.

3.2.7.6 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf einer Semi-Dry-Blotapparatur (Trans Blot, Fa. BioRad) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Die Membran wurde vor dem Zusammensetzen der Apparatur mit Methanol benetzt und wie das Gel für 2min im Blotpuffer äquilibriert. Auf die untere Elektrode wurden drei Lagen von Blotpuffer-getränktem Whatman-Filterpapier aufgelegt. Darauf wurden die Membran und dann das SDS-Gel gelegt. Darüber folgten drei Lagen mit Blotpuffer getränktes Whatman-Filterpapier. Beim Zusammenbau der Schichten wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen. Nach dem Auflegen der Kathode erfolgte der Elektrotransfer bei einer konstanten Stromstärke von 1mA/cm² Membranfläche für 30min. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran zur Blockierung unbesetzter Bindungsstellen für 30min in 5% (w/v) Skim Milk (Fa. Fluka) in TBS-T inkubiert und anschließend dreimal 5min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 15-20h in 5% (w/v) Skim Milk in TBS-T in den in Tabelle 3.1 zusammengestellten Verdünnungen. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für jeweils 5min wurde die Membran 1h mit sekundärem Antikörper (α -rabbit-HRP) in 5% (w/v) Skim Milk in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für jeweils 5min gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch das ECL-System (Fa. Amersham).

Für Nachweise mit weiteren Antikörpern wurde die Membran von den Antikörpern gemäß den Angaben des ECL-Herstellers (Fa. Amersham) entfernt und anschließend mit anderen Antikörpern inkubiert.

3.2.7.7 PFO-PAGE: native Perfluorooktanoat-Gelelektrophorese

Fliegen-Köpfe wurden in 50 mM Tris-Base pH 8.0, NaCl 150 mM (2µl/Kopf) mit PMSF- (Endkonzentration 4mM) suspendiert und mit einem Mikro-Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde 5min im Ultraschallbad extrahiert. Chitinreste wurden durch 5min Zentrifugation bei 14.000g/4°C abgetrennt. Der Membranen wurden durch 15min Zentrifugation 14.000g/4°C aus dem Überstand pelletiert. Das Membranpellet wurde in 2x PFO-Ladepuffer (100 mM Tris-Base, 8%-NaPFO(w/v), 20%(v/v) Glycerol, 0.005% Bromophenol-Blau; pH 8.0) aufgenommen (1µl/Kopf). Die Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 14.000g/4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand wurde durch nicht denaturierenden PFO-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet.

Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte in vertikalen Flachgelen mit einer Dicke von 0,75mm. Es wurden homogen Trenngele ohne Sammelgel verwendet (Tab. 3.5)

PFO	Gel 4%
Acrylamid	4% (w/v)
Bisacrylamid	0,04% (w/v)
Tris/HCl	0,375M pH 8,0
PFO	4% (w/v)
APS	0,05% (w/v)
TEMED	0,075% (v/v)

Tab. 3.5 Zusammensetzung der PFO-PAGE Gele

Die Einstellung der Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentration erfolgte aus kommerziell erhältlicher 40% Lösung (Fa. Roth; Mischungsverhältnis 37,5:1) Die Länge des Sammelgels betrug 1cm, die des Trenngels 5cm. Die Elektrophorese wurde mit einer „2050 Midget“ Elektrophorese-Einheit (Fa. Amersham) bei konstanten 20mA pro Gel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente eine Mischung des „protein molecular mass marker kit“ (MW-GF-1000 Sigma St. Louis, MO). Die Gele wurden wie für die entsprechenden SDS-Gele beschrieben geblottet. Der Nachweis des TRPL-eGFP erfolgte mit einem monoklonalen Maus-α-eGFP Ak siehe Tabelle 3.1.

3.2.8 Elektretinogramm (ERG)

Elektretinographie (ERG) misst Kanaleigenschaften im zellulären Kontext. Im Gegensatz zu Einzelkanalableitungen, bei denen die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle direkt anhand der Einzelkanalströme gemessen werden, ist das Elektretinogramm eine Superposition aller am Rezeptorpotential beteiligten Komponenten. Das ERG erfasst die Änderung des Ruhepotenzials einer Vielzahl von Retinula- und Laminazellen als Reaktion auf einen Lichtreiz. Die Abbildung 3.1 zeigt schematisch den verwendeten ERG Versuchsaufbau.

3.2.8.1 Versuchsaufbau ERG

Drei bis fünf Tage alte weißäugige *Drosophila*e wurden in 12-h hell/12-h dunkel Bedingungen kultiviert. Für die Aufnahme von Elektretinogrammen wurden die Fliegen mit einer Mischung aus Kroenig's wax (2:1, Bienenwachs-Collophonium) und Wärmeleitpaste auf einem Probenhalter aus Kupfer immobilisiert. Die Temperatur der Fliegen wurde mit einem Peltier-Element auf 24°C gehalten. Test-Stimuli (500-ms Dauer, 20 nm Bandbreite at 520 nm) wurden mit einer 150W Xenonbogenlampe (Osram, Germany) erzeugt. Die Wellenlänge wurde mit einem Monochromator eingestellt (Oriel Instruments, Stanford, CA). Die Lichtintensität wurde mit Neutralglasfiltern (Melles Griot, Zeevenar, The Netherlands) variiert. Für die Erzeugung der Hintergrund-Beleuchtung diente eine zweite Xenonbogenlampe und ein OG 580 orange Filter (Schott, Germany).

Boro-Silikat-Glaselektroden enthielten Insekten Saline: (0.67% NaCl, 0.015% KCl, 0.012% CaCl₂, 0.015% NaHCO₃, pH 7.2) Die Glaskapillare mit der Elektrode wurde unmittelbar unterhalb der Cornea mit Hilfe eines Mikromanipulators in das Auge eingestochen. Als Elektrode diente ein Ag/AgCl Draht. Als indifferente Elektrode diente ein Ag/AgCl Draht, welcher im Thorax der Fliege platziert wurde. Die Signale wurden mit einem AI 401 SmartProbe Differential-Verstärker, der an ein CyberAmp 320 „signal conditioner“ (beide von Axon Instruments, Inc., Foster City, CA) angeschlossen war, erfasst. Die Signale wurden mit einem Lab-PC-1200 A/D-Wandler (National Instruments) tiefpass-gefiltert (1kHz) mit einer Sampling Rate von 7.5 kHz digitalisiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Whole-Cell-Analysis-Program und Prism.

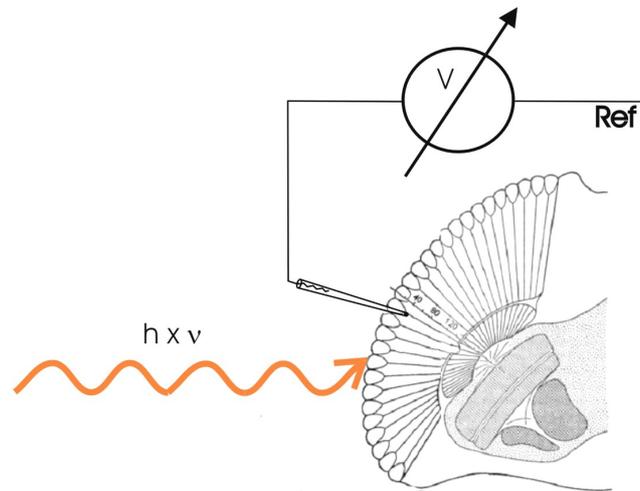


Abb. 3.1 Schema: Messanordnung der ERG

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf einen Lichtreiz relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Messerelektrode wird in das Auge auf Höhe der Photorezeptorzellen eingestochen. Die Referenzelektrode wird in den Thorax oder in das nicht belichtete Auge eingestochen (verändert nach Heisenberg).

Adaptation ist das zeitliche Abklingen der Erregung eines Rezeptors oder eines ganzen Sinnesorgans bei unverändert andauernden oder dicht aufeinander folgenden Reizen. Das Adaptationsverhalten der Photorezeptorzellen von *Drosophila* wurde mit Hilfe von Reizintensität-Reizantwort-Kurven untersucht (siehe Kap. 4.7.3). Reiz-Reizantwort-Kurven haben bei halblogarithmischer Auftragung einen sigmoiden Verlauf, der einer Sättigungskinetik entspricht. Zur optimalen Repräsentation der Spannungsantwort als Funktion der Lichtintensität wurden die Kurven durch nicht-lineare Regression unter Verwendung der Hill-Gleichung an $[V/V_{\max} = I^n / (I^n + I_{50}^n)]$ an die Datenpunkte angepasst [I_{50} -theoretische Intensität die zu halbmaximaler Antwort führt, n-Hill-Koeffizient Steigung der Kurve]. Details siehe Kapitel 4.7.3.

Gemäß der Konvention, bei *Drosophila melanogaster* Gene nach dem mutanten Phänotyp des zuerst entdeckten Allels zu benennen, sind für die ERG-Phänotypen in Mutanten endogene Ionenkanäle verantwortlich, die von der Mutation nicht betroffen sind (Abb. 3.2).

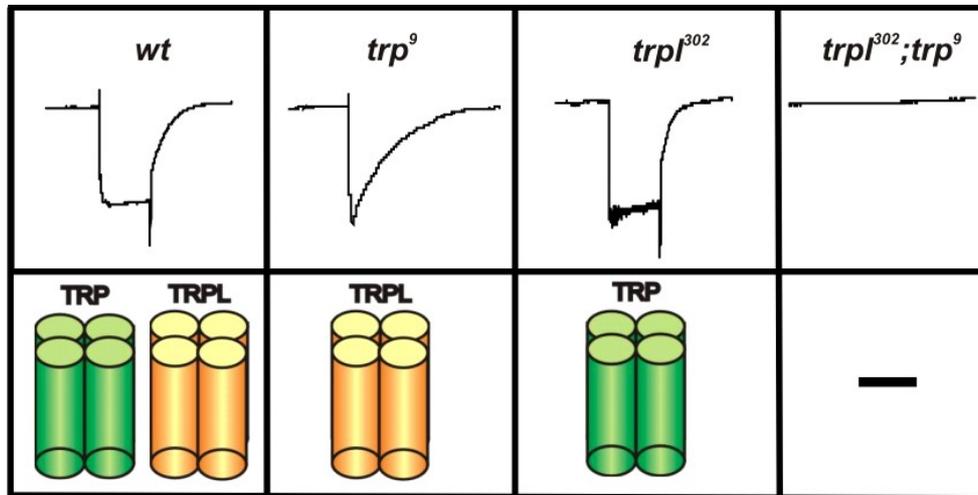


Abb. 3.2 Typische Elektroretinogramme wildtypischer, $trpl^{302}$ - und $trpl^{302};trp^9$ -mutanter Fliegen und schematische Darstellung der Ionenkanäle. Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf einen 5s Lichtreiz relativ zu einer indifferenten Elektrode.

3.3 Vektoren

Alle präparativen PCR-Reaktionen wurden mit *Pwo*-Polymerase durchgeführt.

3.3.1 Keimbahn-Transformations-Vektoren

3.3.1.1 pYC4-*Rh1*-DEST-UTR

Ausgangspunkt für diesen Destination-Vektor war das laboreigene Bluescript-Derivat pBRh1-UTR (Schillo *et al.*, 2004). Dieser Vektor enthält ein 900 bp Fragment aus dem *ninaE* (Rhodopsin 1, *Rh1*) Promotor (Mismer *et al.*, 1987) sowie ca. 0,6 Kb 3'-UTR, getrennt durch eine kurze Sequenz aus der multiple cloning site (mcs) des Bluescript-Vektors. Der Vektor wurde mit *Sma*I verdaut und die GatewayTM-Expressions-Kassette frame A in den Vektor ligiert. In der Kassette werden ein Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen und das *ccdB*-Gen von zwei *attR*-Sequenzen eingerahmt. Die *Sma*I-Schnittstelle befindet sich zwischen dem Promotor und der 3'-UTR-Region. Die Fusion aus dem *Rh1*-Promotor, der GatewayTM-Expressions-Kassette und dem 3'-UTR wurde als *Sac*I/*Xho*I-Fragment in pYC4 (von Pam Geyer, Patton *et al.*, 1992) subkloniert. Die *attR1*-Sequenz ist in diesem Konstrukt dem *Rh1*-Promotor zugewandt und erlaubt es, die Sequenz direktional in den Vektor zu rekombinieren. Der Vektor hat vor der Rekombination eine Größe von ca. 12664 bp. Zur Identifizierung von Transformanten trägt der Vektor den Körperfarbmarker y^+ . In *w*-Hintergrund ist dieser Vektor für ERG-Messungen geeignet. Proteincodierende Sequenzen, die in diesen Vektor

rekombiniert wurden, werden unter der Kontrolle des *ninaE(Rh1)*-Promotors in den Photorezeptorzellen R1-R6 exprimiert.

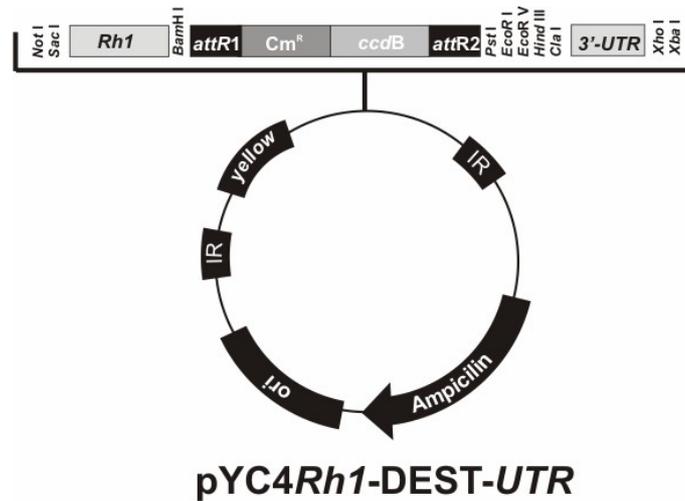


Abb. 3.3 Vektorkarte des pYC4Rh1-DEST-UTR für rekombinante Expression von Proteinen in *Drosophila* Photorezeptorzellen

Der Vektor enthält folgende Elemente:

Rh1, *ninaE* Minimalpromotor (bp -833-+67) (nach Mismar 1987)

3' UTR- 600 bp des *ninaE* Gens

ori Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

IR „inverted Repeat“, Transposase-Erkennung/Schnittstelle

yellow-Transformationsmarker der die Körperfarbe von *Drosophila* beeinflusst.

Ampicillin ,Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

Cm^r, Chloramphenicolacetyltransferase-Antibiotikaresistenzgen, *ccdB* (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -Excisionase/Integrase

3.3.1.2 pYC4-DEST

Der Vektor pYC4-Vektor wurde mit *SmaI* verdaut und die Gateway™-Expressions-Kassette frame A in den Vektor blunt ligiert. In der Kassette werden ein Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen und das *ccdB*-Gen von zwei *attR*-Sequenzen eingerahmt. Der pYC4-DEST Vektor hat eine Größe von ca. 10,2 Kb, und trägt als Transformationsmarker das *Drosophila yellow*-Gen. YC4-DEST erlaubt die freie Wahl des Promotors. Für die Keimbahn-Transformation von *Drosophila* muss ein geeigneter Promotor zwischen die *attL*-Sequenzen des verwendeten Entry-Vektors kloniert werden.

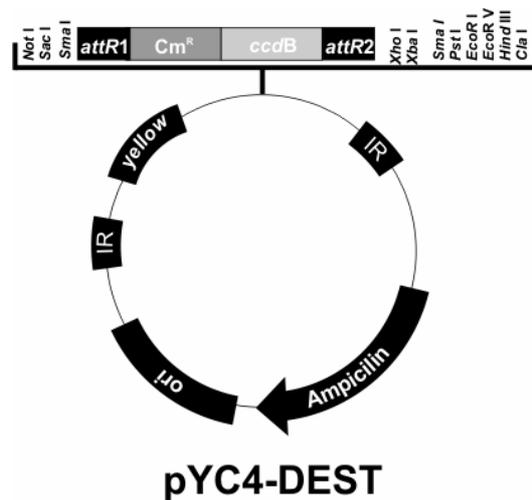


Abb. 3.4 Vektorkarte des pYC4-DEST

Der Vektor enthält folgende Elemente:

ori Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

IR „inverted Repeat“, Transposase-Erkennung/Schnittstelle

yellow-Transformationsmarker der die Körperfarbe von *Drosophila* beeinflusst.

Ampicillin ,Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

Cm^r, Chloramphenicolacetyltransferase-Antibiotikaresistenzgen, *ccdB* (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ-Excisionase/Integrase

3.3.2 Gateway™-Klonierungs-Vektoren

3.3.2.1 pENTR-*ccdB* A1

Ein käuflich erworbener pENTR A1 wurde mit *EcoRI* verdaut und ohne das *ccdB*-Gen zu mit sich selbst ligiert. Dies ermöglicht die Verwendung aller Schnittstellen in der multiple cloning site (mcs) des Vektors. Die mcs wird auf beiden Seiten von *attL*-Sequenzen flankiert. Der entstandene Vektor hat eine Größe von ca. 2294 bp.

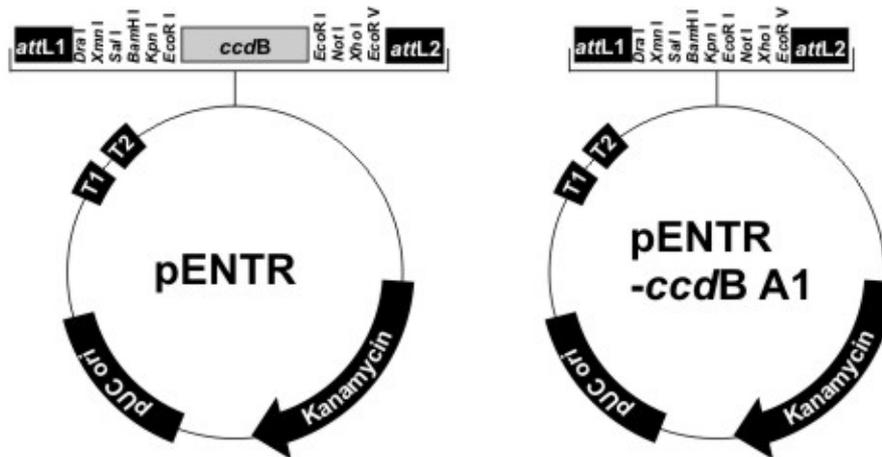


Abb. 3.5 Vektorkarten des pENTR™1A (2717 bp) und pENTR-*ccdB*A1 (2294 bp)

Die Vektoren enthalten folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.3 eGFP/HcRed-Konstrukte

Alle beschriebenen Konstrukte sind C-terminale Fusionen mit eGFP (BD-Biosciences); die Codon-usage ist durch 190 stille Mutationen für humane tRNA-Verwendung optimiert. Das Stoppcodon in TRP /TRPL wurde mittels PCR durch eine *Apa* I-Schnittstelle ersetzt (G. Gerdon), um einen offenen Leserahmen für die Fusion mit GFP zu erhalten. Dadurch werden die As WARDPPVAT an den C-Terminus von TRPL bzw. TRP angefügt. Diese Fusion wurde in allen weiteren Konstrukten beibehalten, da einige N-/C-terminale eGFP-Fusionen mit TRP-Kanälen instabil zu sein scheinen (C. Harteneck/ B.Minke persönliche Mitteilung).

3.3.3.1 pENTR-TRP-eGFP/pUAS⁺-TRP-eGFP

Als Ausgangsvektor zur Konstruktion von pENTR-TRP-eGFP diente der Vektor RTE2 (pBlueskript *Rh1*-TRP-eGFP, Gabi Gerdon). Ein 4638 bp *Kpn* I /*Not* I Fragment, welches für die TRP-eGFP-Fusionsprotein codiert, wurde in pENTR-*ccdB* A1-Vektor umgesetzt (pENTR-TRP-eGFP ca. 6922 bp) Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1524 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 170 kDa.

Die *trp*-eGFP cDNA-Sequenz aus pENTR-TRP-eGFP wurde durch präparativen *Bgl*II/*Not*I-Verdau aus dem pENTR-Vektor ausgeschnitten und in den *Bgl*II/*Not*I-verdauten Keimbahntransformationsvektor pUAS⁺ (Brand und Perrimon 1993) eingesetzt. Der pUAS⁺-TRPL-eGFP-Vektor wurde im Auftrag von der Firma BestGene (BestGene Inc, 2918 Rustic Bridge, Chino Hills, CA 91709) injiziert. Die Funktionalität des Vektors wurde in heterozygoten Fliegen getestet (Abb. 3.6).

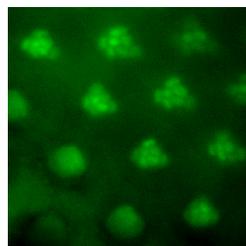


Abb. 3.6 TRP-eGFP Expressiom in Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (63x Wasserimmersionsobjektiv). Die 1-2 Tage alten transgenen TRP-eGFP; *wt*-Fliegen wurden vor der Präparation 16h dunkeladaptiert. F₁-Generation aus der Kreuzung *GMR-Gal4/GMR-Gal4* X *w¹¹¹⁸ P[UAS⁺ trp-eGFP, w⁺]* (Fliegen sind heterozygot für beide Transgene).

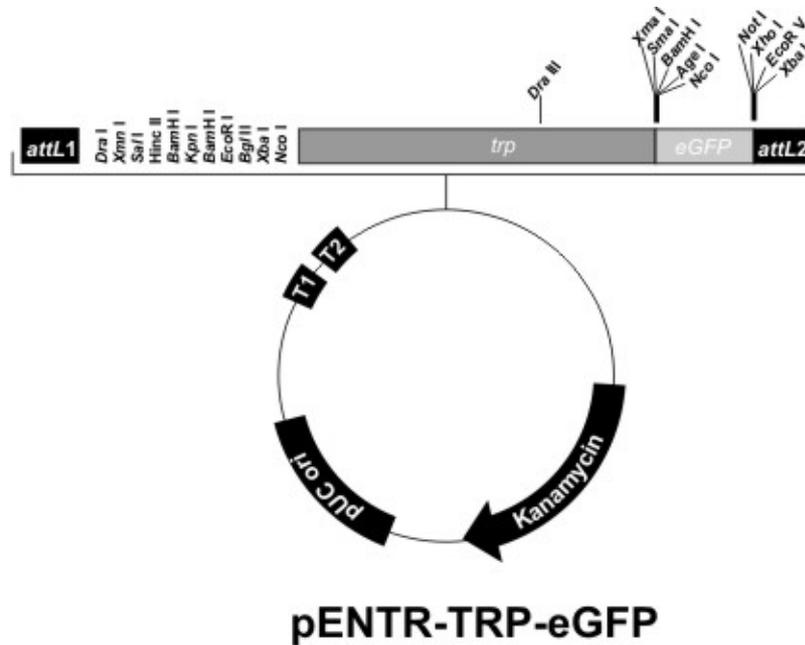


Abb. 3.7 Vektorkarte pENTR-TRP-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (controller of cell division or death B), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.3.2 pENTR-TRPL-eGFP/ pUAS_t-TRPL-eGFP

Um den Vektor pENTR-TRPL-eGFP zu erhalten, wurde ein 863 bp großes *Sa*II /*M*scl-Fragment aus pENTR Chimäre 2 in den *Sa*II /*M*scl verdauten pENTR Δ -Ank-TRPL-eGFP umgesetzt. Das Fragment enthält die *trpl*-cDNA-Sequenz vom Startcodon bis zur *trpl*-eigenen *M*scl-Schnittstelle (startcodon entspricht den Basen 1-3, *M*scl-Schnittstelle Basen: 827-832). Diese Schnittstelle liegt 3' von der *Sac* II-Schnittstelle, welche zur Deletion der Ankyrin-Repeats verwendet wurde. Das Konstrukt (ca. 6427 bp) enthält eine Fusion aus der Vollängen *trpl*-cDNA und eGFP. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1373 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 155 kDa.

Die *trpl*-eGFP cDNA-Sequenz aus pENTR-TRPL-eGFP wurde durch präparativen *Eco*RI/*Not*I-Verdau aus dem pENTR-Vektor ausgeschnitten und in den *Eco*RI/*Not*I-verdauten Keimbahntransformationsvektor pUAS_t, (Brand und Perrimon 1993) eingesetzt. Der pUAS_t-TRPL-eGFP-Vektor wurde im Auftrag von der Firma BestGene (BestGene Inc,

2918 Rustic Bridge, Chino Hills, CA 91709) injiziert. Die Funktionalität des Vektors wurde in heterozygoten Fliegen getestet (Abb. 3.8).

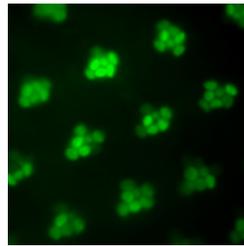


Abb. 3.8 TRPL-eGFP Expression in Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (63x Wasserimmersionsobjektiv). Die 1-2 Tage alten transgenen TRPL-eGFP; *wt*-Fliegen wurden vor der Präparation 16h dunkeladaptiert. F₁-Generation aus der Kreuzung *GMR-Gal4/GMR-Gal4 X yw P[UAS> trpl-eGFP, w⁺]* (Fliegen sind heterozygot für beide Transgene).

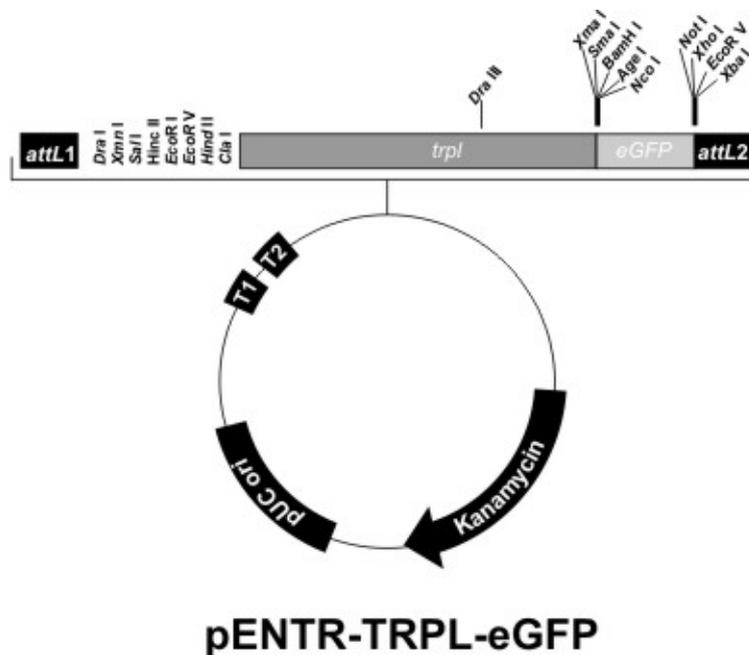


Abb. 3.9 Vektorkarte pENTR-TRPL-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ-

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.3.3 TRPL-HcRed

Durch die C-terminale Fusion des TRPL an HcRed wird auf Proteinebene die Sequenz WARYPVATS zwischen TRPL und HcRed eingefügt. Der ORF des HcRed wurde unter Verwendung der Primer Red3_for und Red4_rev mit dem Vektor pHcRed (BD-Biosciences) als Template mittels PCR amplifiziert. Beide Primer führen eine *KpnI*-Schnittstelle in das ca. 700 bp große PCR-Produkt ein. Das PCR-Produkt wurde über *KpnI*-Schnittstellen in den *KpnI*-verdauten RTLE4 Vektor (pBlueskript *Rh1*-TRPL-eGFP, Gabi Gerdon) eingesetzt. Der ORF des eGFP wird in RTLE4 5' und 3' von *KpnI*-Schnittstellen eingerahmt. Das eGFP-Gen (ca. 700 bp) des pENTR-TRP-eGFP-Vektors wurde durch das HcRed-PCR-Produkt ersetzt. Die *KpnI*-Schnittstelle 3' des eGFP-ORF ist im mcs des pBluescript-Vektors. Als Zwischenprodukt wurde der p*BRh1*-TRPL-HcRed-Vektor erhalten. Der ORF des TRPL-HcRed-Fusionsproteins (4120bp) als *EcoR* I / *Not* I Fragment in pENTR-*ccdB* subkloniert. Hierbei wurde die *Rh1*-Promotor-Sequenz nicht in den pENTR-Vektor übertragen. Das entstandene Konstrukt (pENTR-TRPL-HcRed ca. 6390 bp) codiert für ein Fusionsprotein aus den As 1-1124 des TRPL mit der beschriebenen C-terminalen HcRed-Fusion. Die von den *attL*-Sequenzen flankierten Regionen von pENTR-TRPL-HcRed wurden in die Destination-Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT-DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1361 As und ein theoretisches Molekulargewicht von 155 kDa.

Es wurden folgende PCR Bedingungen verwendet:

Template pHcRed (BD-Biosciences)

Red3_for 5'-AATAGGTACCCGGTCGCCACCATGGTG-3'

Red4_rev 5'-AATAGGTACCCGTACGGCCGACTAG-3'

2' 95°C, 30''95°C, 30''56°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30

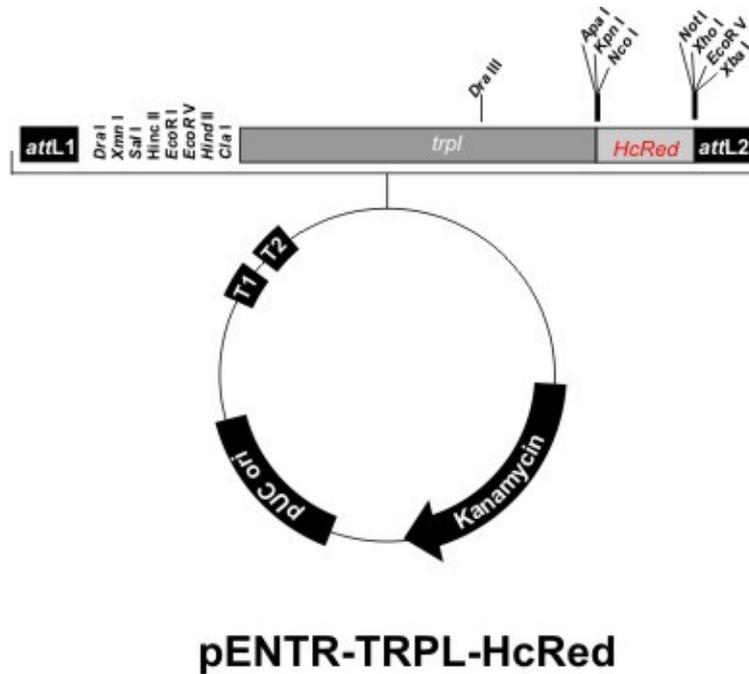


Abb. 3.10 Vektorkarte pENTR-TRPL-HcRed

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.3.4 pENTR-TRP-HcRed

Der ORF des HcRed wurde unter Verwendung der Primer Red5_for und Red4_rev mit dem Vektor pHcRed (BD-Biosciences) als Template mittels PCR amplifiziert. Das eGFP-Gen wurde im pENTR-TRP-eGFP-Vektor durch das ca. 700 bp große HcRed-PCR-Produkt ersetzt. Das PCR-Produkt wurde über *Age I* / *Not I* ligiert. Die *Age I*-Schnittstelle wurde durch den Primer Red5_for in das PCR Produkt eingeführt, die *Not I*-Schnittstelle wurde aus der 3' mcs des Templates mitamplifiziert. Das entstandene Konstrukt (pENTR-TRP-HcRed ca. 6390 bp) codiert für ein Fusionsprotein, welches aus den As 1-1275 des TRP mit der HcRed-Fusion entspricht. Durch die Fusion wird die Sequenz WARDPPVAT (analog zur GFP-Fusion) zwischen TRP und HcRed eingefügt. Das entstandene Konstrukt pENTR-TRP-HcRed (ca. 6888 bp) wurde in die Destination-Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Die korrekte Sequenz des Produktes wurde durch Transfektion des pMT TRP-HcRed 48 in S2-Zellen und mikroskopische Analyse bestätigt.

Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1513 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 169 kDa.

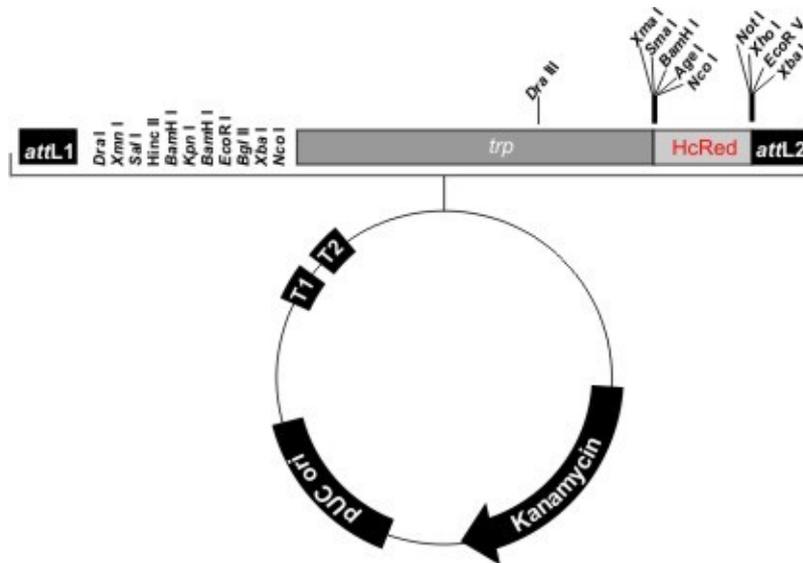
Es wurden folgende PCR Bedingungen verwendet:

Template pHcRed (BD-Biosciences)

Red_5for 5 'AATACCGGTCGCCACCATG 3 '

Red4_rev 5'-AATAGGTACCCGTACGGCCGACTAG-3'

2' 95°C, 30"95°C, 30"59°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30



pENTR-TRP-HcRed

Abb. 3.11 Vektorkarte pENTR-TRP-HcRed

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (controller of cell division or death B), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4 Strategie für die Konstruktion von chimären TRP/TRPL und TRPL-Deletionsvarianten

Für die Konstruktion der TRP/TRPL-Chimären und der Deletionsvarianten des TRPL-eGFP wurden je zwei singuläre Restriktionsschnittstellen gesucht, die an die Region, die deletiert oder ersetzt werden sollte, 5' und 3' angrenzten. Die Vektoren wurden mit den Enzymen im präparativen Maßstab verdaut. Fragmente die die Region enthielt die deletiert oder ersetzt werden sollte wurden durch Gelelektrophorese abgetrennt. Wenn die verwendeten Restriktionsschnittstellen nicht exakt die Region einrahmte die entfernt werden sollte so wurden durch den Verdau/Gelelektrophorese auch Bereiche entfernt, die im fertigen Konstrukt erhalten bleiben sollten. Daher wurden diese Bereiche mittels PCR amplifiziert und in die Vektoren zurückgesetzt. Die PCR-Primer wurden dabei so konstruiert, dass sie 5' und 3' die Restriktionsschnittstellen enthielten, die für den präparativen Verdau verwendet wurden.

3.3.4.1 Chimäre 1 (TRP-N-Terminus und Transmembranbereich /TRPL-eGFP C-Terminus)

Ausgehend von pENTR TRP-eGFP wurde eine singuläre, zwischen *trp* und *trpl* konservierte *DraIII* Schnittstelle (in *trpl*: Basen 2040-2048, *trp*: Basen 2019-2027) verwendet, um die *trpl*-eGFP cDNA mit dem „Rumpf“ der *trp*-cDNA zu ligieren. Die *DraIII* Schnittstelle liegt in der TRP-box entsprechenden Region. Der *trp*-Rumpf entspricht dem N-Terminus und der Transmembranregion auf Proteinebene. Hierzu wurde zunächst die *DraIII*-Schnittstelle des *trpl* mutiert, um mit der *DraIII*-Schnittstelle des *trp* ligiert werden zu können (die *DraIII*-Schnittstelle hat 3 variable Positionen, die von dem Palindrom CACGAG eingerahmt werden). Es wurde über den Primer TRPL for *DraIII*mut eine *DraIII* Schnittstelle vom „*trp*-Typ“ im *trpl*-PCR-Produkt erzeugt. Mit dem reversen Primer TRPL rev *DraIII* mut wurde eine *HindIII*-Schnittstelle in das 251 bp Amplifikat eingeführt. Als Template diente RTLE4 (pBlueskript *Rh1*-TRPL-eGFP, Gabi Gerdon). Der pENTRTRP-eGFP-Vektor wurde mit *DraIII/HindIII* verdaut; ein 630 bp großes Fragment wurde gelelektrophoretisch abgetrennt und durch das oben genannte *DraIII/HindIII*-verdaute PCR-Produkt ersetzt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde pENTR TRPTRPLTRP (pENTR TTT) genannt. Mit dem PCR-Produkt wurde auch eine *trpl* spezifische *Clal*-Schnittstelle umgesetzt. Der Vektor RTLE4 (pBlueskript *Rh1*-TRPL-eGFP, Gabi Gerdon) wurde mit *Clal/NotI* verdaut und ein 1949 bp großes Fragment in den pENTR TRPTRPLTRP Vektor ligiert (da die entsprechende *Clal*-Schnittstelle methyliert ist, wurde unmethylierte DNA verwendet). Das Fragment entspricht dem C-Terminus des TRPL mit der eGFP-Fusion. Das entstandene Konstrukt (pENTR-Chimäre 1 ca. 6421 bp) codiert für ein Fusionsprotein, welches den As 1-674 des TRP und

den As 681-1124 des TRPL mit der beschriebenen eGFP-Fusion entspricht (die Zahlen beziehen sich auf die Position im wildtypischen TRP bzw. TRPL-Protein). Die mittels PCR amplifizierten Regionen wurden im Auftrag sequenziert. Die von den *attL*-Sequenzen flankierten Regionen von pENTR-Chimäre 1 wurden in die Destination-Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1366 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 156 kDa.

Es wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL for DralIII mut CGGACACTGAGTGGAAGTTTG

TRPL rev DralIII mut 5'-CCCAAGCTTCGATACGGGATTATT-3'

2' 95°C, 30''60°C, 2' 72°C, 10' 72°C , Zyklen 30

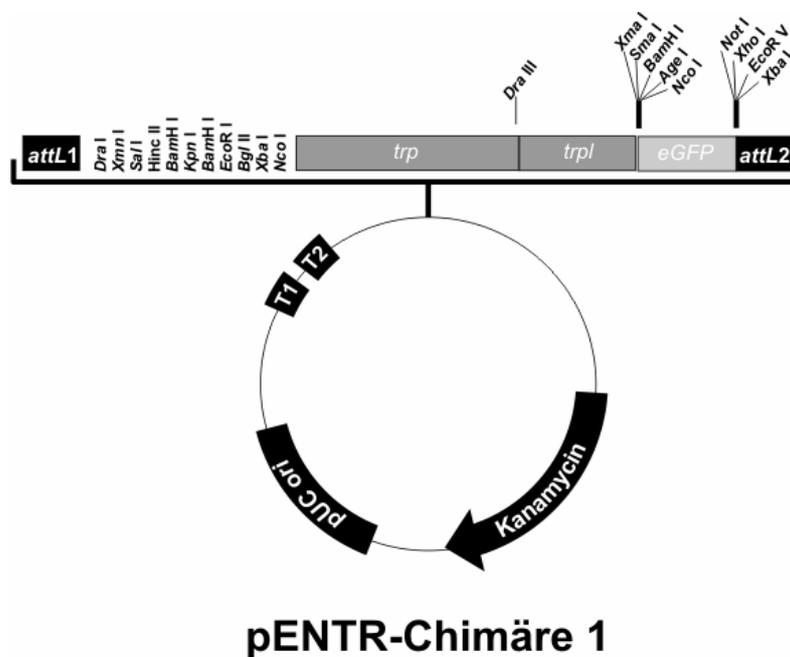


Abb. 3.12 Vektorkarte pENTR-Chimäre 1

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4.2 Chimäre 2 (TRP-eGFP/TRPL N-Terminus)

Der Bereich der *trpI*-cDNA der für den N-Terminus des TRPL-Proteins codiert wurde durch PCR mit den Primern TRPL for Sal und TRPL N-Term rev mit RTLE4 als Template amplifiziert. TRPL for Sal fügt eine *Sall* Schnittstelle 5'-stromaufwärts des TRPL-Startcodons ein, TRPL N-Term rev fügt eine *StuI*-Schnittstelle in das Amplifikat ein. Der pENTR-TRP-eGFP-Vektor wurde mit *Sall/StuI* verdaut und ein 1064 bp großes Fragment wurde gelelektrophoretisch abgetrennt. Das PCR-Produkt wurde in den *Sall/StuI* verdauten pENTR-TRP-eGFP ligiert. Das entstandene Konstrukt pENTR-Chimäre 2 (ca. 6895 bp) codiert für ein Fusionsprotein, welches aus den As 1-335 des TRPL und den As 328-1275 des TRP mit eGFP-Fusion entspricht (die Zahlen beziehen sich auf die Position im wildtypischen TRP bzw. TRPL-Protein). Die mittels PCR amplifizierten Regionen wurden im Auftrag sequenziert. Die von den *attL*-Sequenzen flankierten Regionen von pENTR-Chimäre 2 wurden in die Destination Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Der rekombinierte Vektor pYC4-*Rh1*-Chimäre 2-UTR hat eine ungefähre Größe von 15,7 kb. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1373 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 170 kDa.

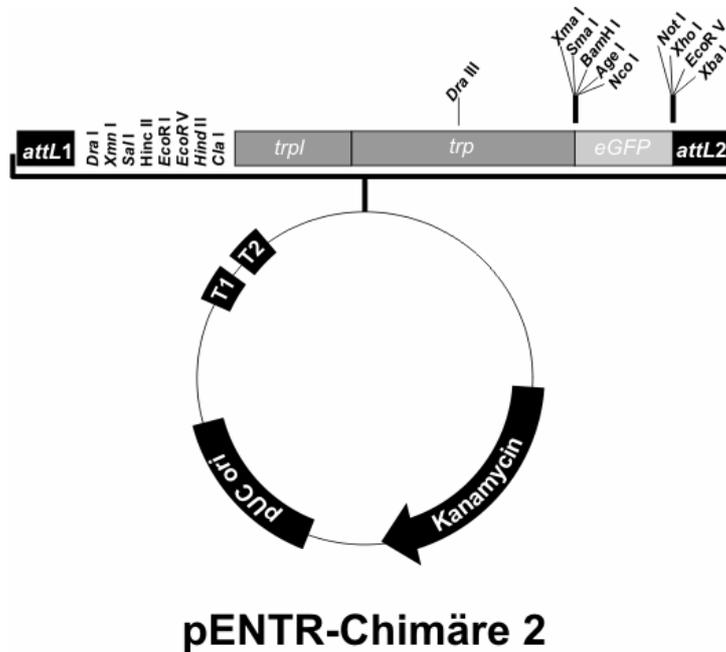
Es wurden folgende PCR Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL N Term rev 5'-AGGCCTGCTTGCGCCGGAATCC-3'

TRPL for Sal 5'-TAAGTCGACGAATTCGATATCAAGCTT-3'

2' 95°C, 30''95°C, 30''62°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30



pENTR-Chimäre 2

Abb. 3.13 Vektorkarte pENTR-Chimäre 2

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (controller of cell division or death B), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4.3 Chimäre 3 (TRP /TRPL-eGFP C/N-Term)

Als Ausgangsvektoren für dieses Konstrukt dienten pENTR Chimäre1 und pENTR Chimäre 2. Der pENTR-Chimäre 1-Vektor wurde mit *Sall/Stul* verdaut; es wurde ein ca. 1064 bp großes Fragment isoliert und in den *Sall/Stul*-verdauten pENTR-Chimäre 2-Vektor eingesetzt. Das entstandene Konstrukt pENTR Chimäre 3 (ca. 6427 bp) codiert für ein Fusionsprotein, in dem die As 1-335 des TRPL mit den As 328-1275 des TRP und den As 681-1124 des TRPL fusioniert sind (die Zahlen beziehen sich auf die Position im wildtypischen TRP bzw. TRPL-Protein). Die C-terminale Region entspricht der oben beschriebenen TRPL-eGFP-Fusion. Die von den *attL*-Sequenzen flankierten Regionen von pENTR-Chimäre 3 wurden in die Destination-Vektoren *YC4-Rh1-DEST-UTR* und *pMT DEST48* rekombiniert.

Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1373 As und ein theoretisches Molekulargewicht von 156 kDa.

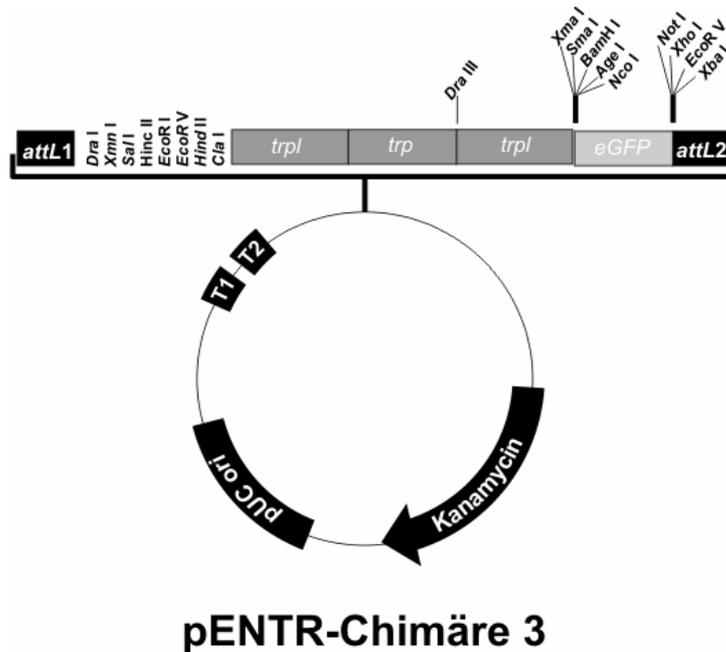


Abb. 3.14 Vektorkarte pENTR-Chimäre 3

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (controller of cell division or death B), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4.4 pENTR Δ -Ank-TRPL-eGFP/ pYC4 Rh1- Δ Ank-TRPL-eGFP

Der Vektor RTLE4 (pBlueskript *Rh1*-TRPL-eGFP, Gabi Gerdon) wurde mit *Sac*II verdaut, und ein ca. 1,6 Kb großes Fragment, welches den *Rh1*-Promotor und die Basen 1-587 der *trpI*-cDNA enthält, gelelektrophoretisch abgetrennt. Dabei wurde auch das Startcodon der *trpI*-cDNA entfernt. Das Startcodon bis Base 222 wurde mit den Primern TRPL Ank1 for TRPL Ank2 rev aus RTLE4 amplifiziert und in den Vektor zurückgesetzt. Durch diese Strategie wurden auf Proteinebene die As 76-196 einschließlich deletiert. Die entstandene Fusion aus der *trpI*-cDNA mit der Deletion und des *eGFP* ORF wurde als *EcoR* I/ *Not* I-Fragment in pENTR-*ccdB* A1 subkloniert. Die von den *attL*-Sequenzen flankierten Regionen des entstandenen pENTR Δ -Ank-TRPL-eGFP (ca. 6064 bp) wurden in die Destination-

Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1252 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 142 kDa.

Es wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL Δ ank1 for 5' TAA CCG CGG TTC GAT ATC AAG CTT-3'

TRPL Δ ank2 rev 5' TAACCGCGGTCATGCAGTTGATGTT-3'

PCR: 2' 95°C, 30''95°C, 30''63°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30

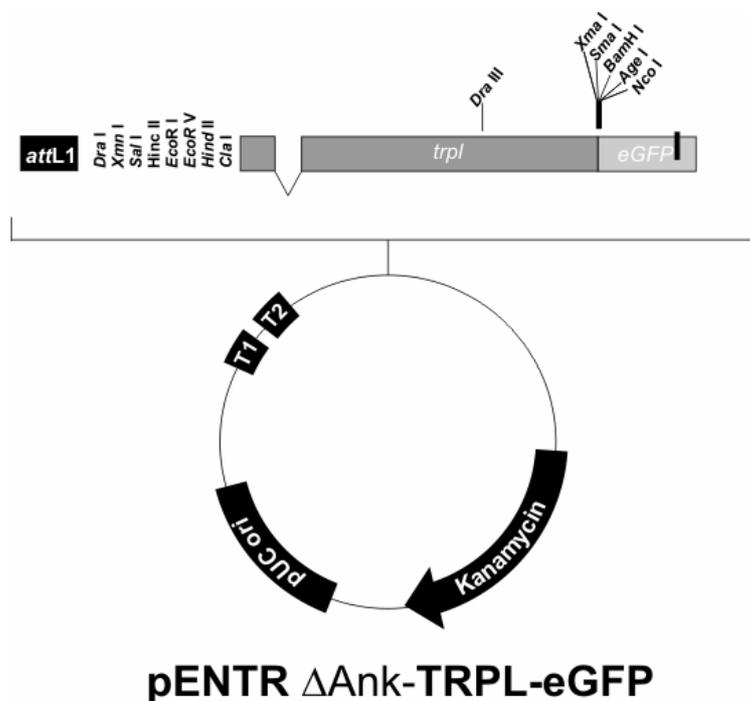


Abb. 3.15 Vektorkarte pENTR Δ Ank-TRPL-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (controller of cell division or death B), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4.5 pENTR- Δ N-TRPL-eGFPN-TRPL-eGFP/ pYC4 Rh1- Δ N-TRPL-eGFP

Der pENTR- Δ Ank-Vektor wurde mit *Sa*II/*Sac*II verdaut; ein ca. 430 bp großes Fragment wurde gelelektrophoretisch abgetrennt und durch ein *Sa*II/ *Sac*II-verdautes PCR-Fragment ersetzt. Das Konstrukt codiert für eine TRPL-eGFP-Variante mit einer Deletion der As 1-74. Das Methionin 75 wird zum N-Terminus.

Es wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL N del for AAAGTCGACATGGACCCATTGGGC

TRPL N del rev AAAGACTTTGTCCTCCGCGGTACG

2' 95°C, 30''95°C, 45''62°C, 2' 72°C, 10' 72°C, Zyklen 30

Das entstandene Konstrukt wurde in die Destination-Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1299 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 147 kDa

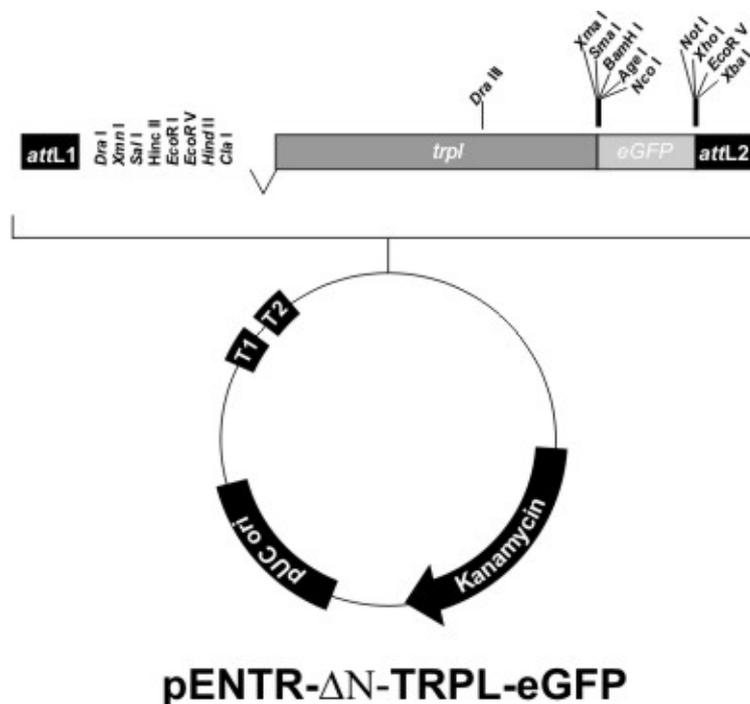


Abb. 3.16 Vektorkarte pENTR- Δ N-TRPL-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

3.3.4.6 pENTR- Δ Int-TRPL-eGFP pYC4 Rh1- Δ INT-TRPL-eGFP

Der Vektor pENTR-Dank-TRPL-eGFP wurde mit *Pf1f1* (*Tth1111*)/*Sal*I präparativ verdaut und ein ca. 688 bp großes Fragment wurde durch ein *Pf1f1* (*Tth1111*)/*Sal*I verdautes 631bp großes PCR-Produkt ersetzt. Das Konstrukt codiert für eine TRPL-eGFP-Variante mit einer Deletion der As 199-338.

Es wurden folgende PCR Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL for *Sal*I 5'-TAAGTCGACGAATTCGATATCAAGCTT-3'

TRPL N del rev 5'-AAAGACTTTGTCTCCGCGGTCAG-3'

2' 95°C, 30"95°C, 45"62°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30

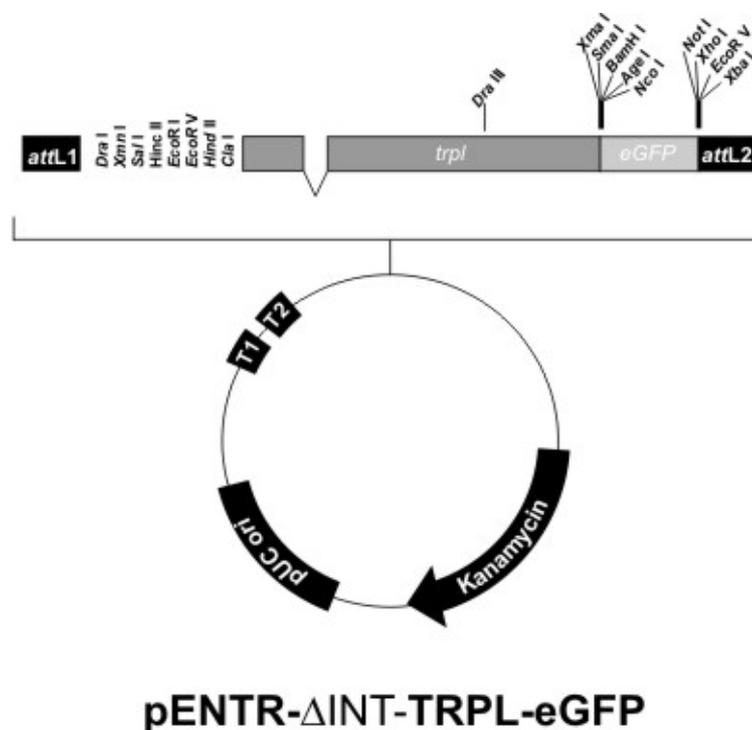


Abb. 3.17 Vektorkarte pENTR- Δ Int-TRPL-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

Das entstandene Konstrukt wurde in die Destination Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1233 As und eine theoretisches Molekulargewicht von 139 kDa.

3.3.4.7 Δ C-TRPL-eGFP /pYC4 Rh1- Δ C-TRPL-eGFP

Der Vektor pENTR- TRPL-eGFP wurde mit *DraIII/Agel* präparativ verdaut, ein ca. 456 bp großes Fragment wurde gelelektrophoretisch abgetrennt und durch ein *DraIII/Agel* verdautes PCR-Produkt ersetzt. Das Konstrukt codiert für eine TRPL-eGFP-Variante mit einer Deletion der As 833-1128 der Region C-terminal der TRP-box-Region.

Es wurden folgende PCR Bedingungen verwendet:

Template RTLE4

TRPL delta C-rev 5' TTTACCGGTTTACAGCCATTTTGAC 3'

TRPL delta C-for 5' AAACACGGAGTGGAAGTTTGCC 3'

3' 95°C, 30''95°C, 45''58°C, 2' 72°C, 10' 72°C Zyklen 30

Das entstandene Konstrukt wurde in die Destination Vektoren YC4-*Rh1*-DEST-UTR und pMT DEST48 rekombiniert. Das erwartete Proteinprodukt hat eine Länge von 1076 As und ein theoretisches Molekulargewicht von 123 kDa.

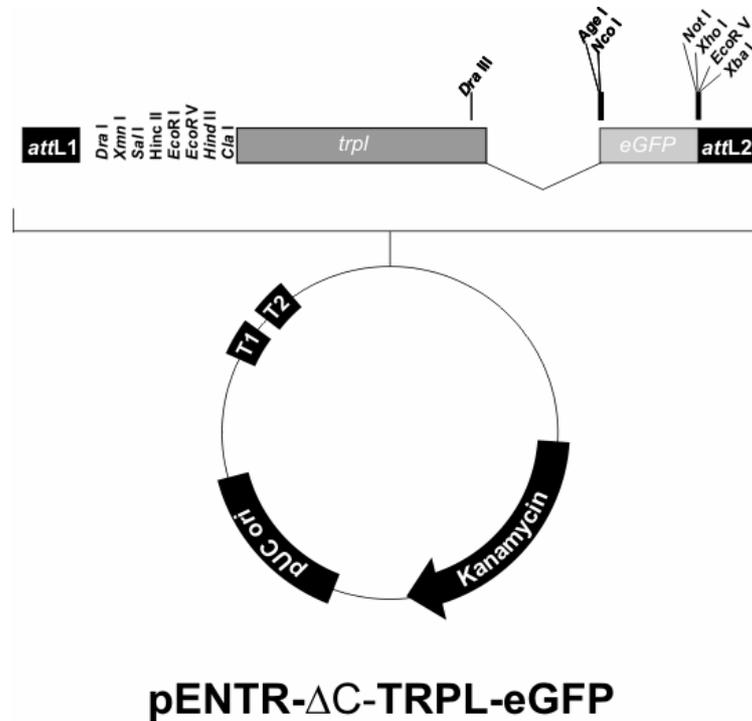


Abb. 3.18 Vektorkarte pENTR- Δ C-TRPL-eGFP

Der Vektor enthält folgende Elemente:

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Kanamycin, Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

rrnB T2 Terminator-Sequenz

4. Ergebnisse

Das TRPL/TRPL-eGFP Protein verändert seine subzelluläre Lokalisation auf einen Lichtreiz hin (Bähner *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006; Cronin *et al.*, 2006). Sie translozieren zwischen der rhabdomerischen Membran und einem intrazellulären Membrankompartiment. Die Ergebnisse, die aus der Expression des TRPL-eGFP Proteins gewonnen wurden, legten nahe, dass die Untersuchung vergleichbarer epitop-markierter Komponenten der Phototransduktionskaskade tiefere Einblicke in den Translokationsmechanismus und die Kanalfunktion erlauben würden.

4.1 Herstellung eines GatewayTM basierten *Drosophila* Transformationsvektors zur Expression von Transgenen in adulten Fliegen-Augen

Für die Expression des TRPL-eGFP Proteins in *Drosophila*-Ommatidien wurde der YC4-Vektor (ein Derivat des Y.E.S.-Vektors, Patton *et al.* 1992; Meyer *et al.*, 2006) verwendet. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass er als Transformationsmarker das *y*-Gen verwendet und zudem die freie Wahl des Promotors erlaubt. Für die mikroskopische und elektrophysiologische Untersuchung intakter *Drosophila*-Augen ist es vorteilhaft, Fliegen ohne Schirmpigmente zu verwenden. In den sehr weit verbreiteten pUAS/p-Vektoren dient das *mini-white*-Gen (*w^{+mC}*) als Transformationsmarker (Brand und Perrimon, 1993). Erfolgreich transformierte Fliegen haben schwach gelbe bis dunkelrote Augen. Für die Messung von Elektroretinogrammen und mikroskopische Untersuchungen intakter Augen müssen die UAS-Transgene in mehreren Schritten in einen mutanten genetischen Hintergrund gekreuzt/rekombiniert werden, in dem keine Schirmpigmente gebildet werden (z.B. *cn, bw*). Die Verwendung von UAS-Vektoren erfordert zusätzlich die Einkreuzung so genannter „Treiber-Linien“. Diese ersetzen den Promotor in UAS-Vektoren und bestimmen den Zeitpunkt und den Ort der Expression der Transgene. Wegen der Notwendigkeit aufwendiger Kreuzungen sind UAS-Vektoren für die vorliegende Fragestellung ungeeignet. Alle *Drosophila*-Transformationsvektoren sind über 10 kb groß und enthalten eine Vielzahl von Erkennungsstellen für gängige Restriktionsenzyme. Diese Eigenschaft macht es notwendig, Manipulationen wie die Fusion von Epitopen oder die Einführung von Deletionen/Insertionen/Punktmutationen in kleineren Vektoren durchzuführen. Die fertigen „Konstrukte“ müssen anschließend in den *Drosophila*-Transformationsvektor ligiert werden. Bei der Verwendung des YC4-Vektors muss zusätzlich die gewünschte Promotor-Sequenz in den Klonierungs- oder Transformationsvektor eingebracht werden.

Um die Expression rekombinanter Proteine in *Drosophila*-Augen zu vereinfachen, wurde der 900 bp Rhodopsin 1/*ninaE*, (Mismer *et al.*, 1987) Minimalpromotor in den YC4-Vektor kloniert. Dieser Promotor erlaubt es, die dahinter liegenden Sequenzen in den Photorezeptorzellen R1-R6 zu exprimieren. Da das Transgen in den Rezeptorzellen R7 und R8 nicht exprimiert wird (Mismer *et al.* 1987; O' Tousa *et al.*, 1985; Zucker *et al.*, 1985), können R7 und R8 als interne Kontrollen herangezogen werden.

Um das Einbringen der zu exprimierenden Sequenz in den YC4-Vektor zu erleichtern, wurde eine sog. „Destination-Kassette“ (Invitrogen) 3' des Rh1-Promotors in den Vektor ligiert. In diesem Fragment rahmen zwei „attachment-sites“ des λ -Phagen die selektierbaren Marker Cm^r und *ccdB* ein (Abb. 4.1). Bei den „attachment-sites“ *attR* handelt es sich um zwei ähnliche palindromische Sequenzen, die in einer *in vitro* Reaktion mit komplementären *attL*-Sequenzen direktional rekombiniert werden können. Der beschriebene Vektor (pYC4Rh1-DEST-UTR Abb. 4.1) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um an eGFP/HcRed fusionierte TRP-Kanalvarianten in den Augen von *Drosophila* zu exprimieren.

Die Manipulation der DNA, die in *Drosophila*-Augen exprimiert werden soll, erfolgt in einem so genannten pENTR-Vektor. Die ausgewählte Sequenz wird in diesem Vektor von den ähnlichen *attL*-Sequenzen eingerahmt. Die sequenzspezifische Rekombination erfolgt zwischen entsprechenden *attL* und *attR*-Sequenzen. Dabei werden die von den *attL*-Elementen eingerahmten Sequenzen zwischen den beteiligten pENTR- und pDEST-Vektoren ausgetauscht. Diese Methode ist um ein Vielfaches effizienter als die Subklonierung eines Fragmentes in einen Vektor dieser Größe. Gegen das unerwünschte pENTR-Nebenprodukt wird mit Hilfe der übertragenen Marker aus der Destination-Kassette selektiert

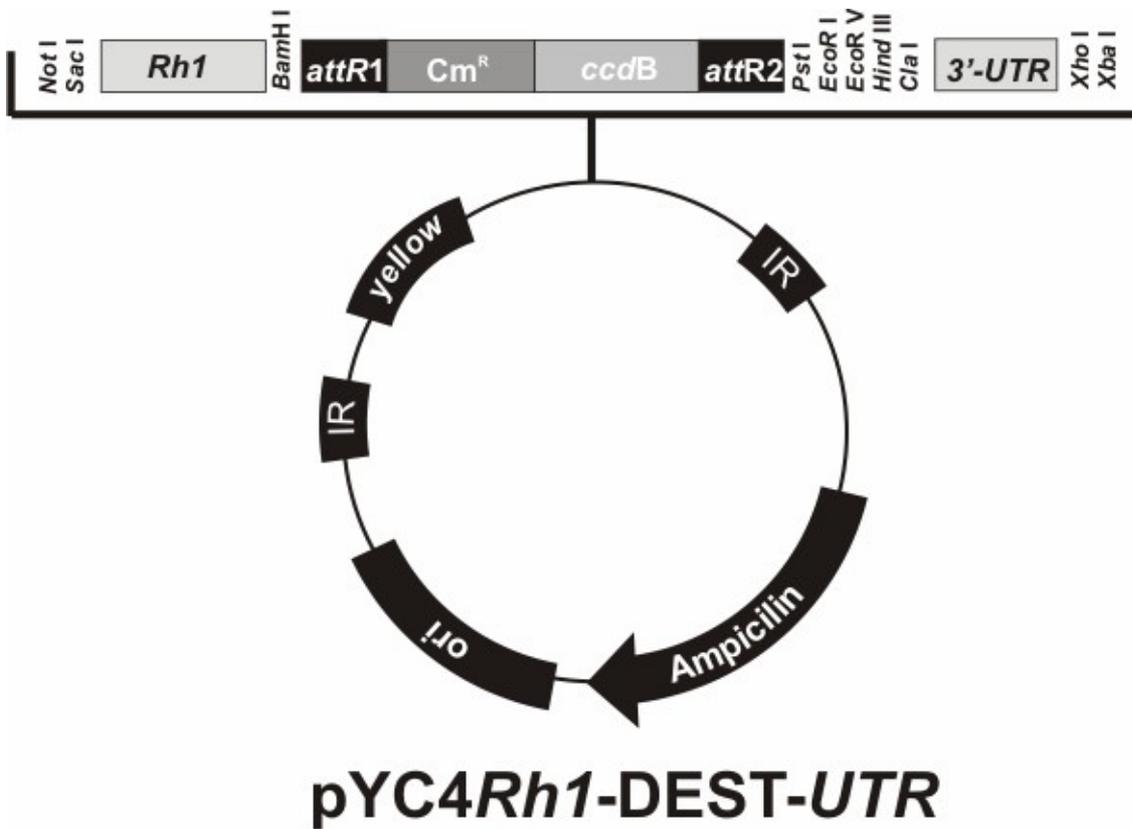


Abb. 4.1 Vektorkarte des pYC4Rh1-DEST-UTR für rekombinante Expression von Proteinen in den Photorezeptorzellen von *Drosophila*

Der Vektor enthält folgende Elemente:

Rh1, *ninaE* Minimalpromotor (bp -833-+67) (nach Mismar 1987)

3' UTR- 600 bp des *ninaE* Gens

ori Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

IR „inverted Repeat“, Transposase-Erkennung/Schnittstelle

yellow-Transformationsmarker der die Körperfarbe von *Drosophila* beeinflusst.

Ampicillin ,Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

Cm^r, Chloramphenicolacetyltransferase -Antibiotikaresistenzgen, *ccdB* (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -Excisionase/Integrase

4.2 Charakterisierung des TRP-eGFP-Transgens

4.2.1 Mikroskopische Untersuchung der TRP-eGFP-Lokalisation in den Photorezeptorzellen transgener *Drosophila*

Die optische Neutralisierung der Cornea durch Wasserimmersion ermöglicht die mikroskopische Beobachtung einzelner Ommatidien in lebenden Fliegen (Franceschini und Kirschfeld, 1971). Die Verwendung dieser Methode in Verbindung mit Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die subzelluläre Verteilung eGFP-markierter Proteine in lebenden Photorezeptorzellen zu untersuchen. (Abb. 4.2 B C) (Meyer *et al.*, 2006).

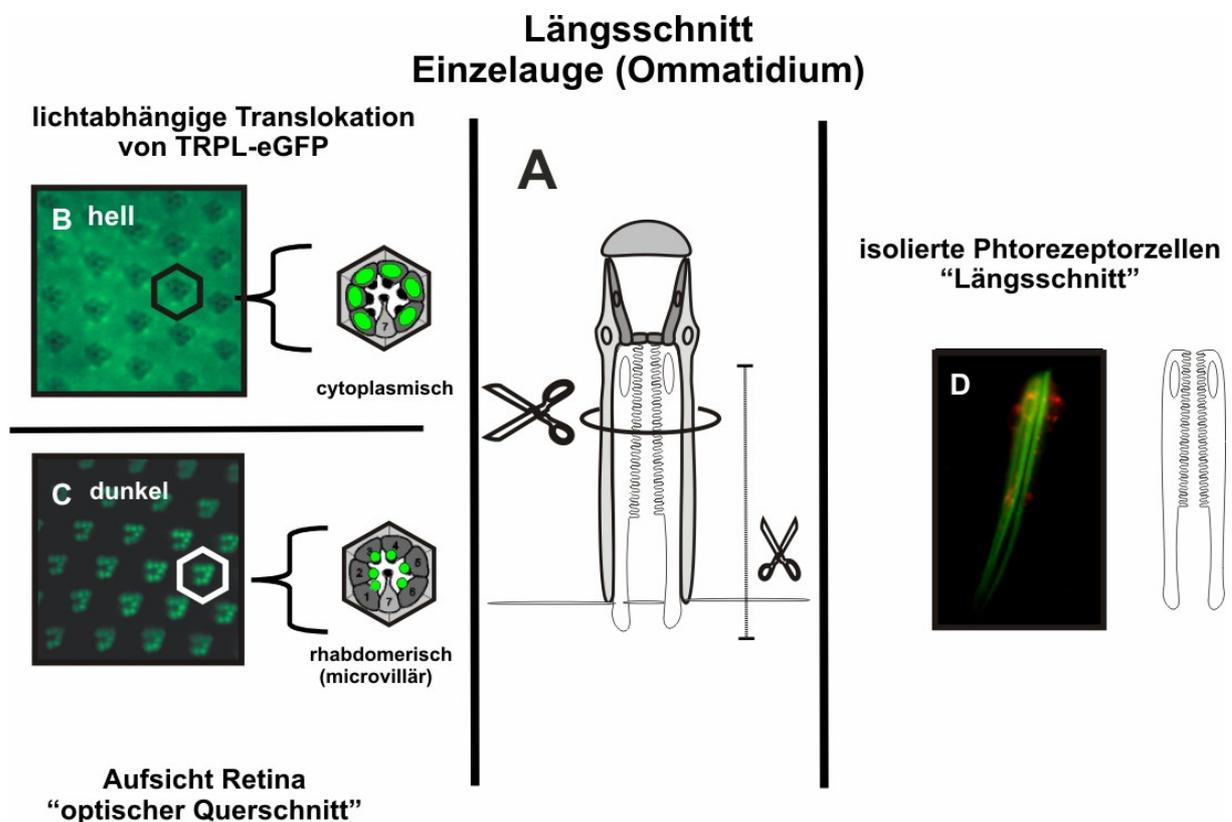


Abb. 4.2 Schema eines Ommatidiums (A) und mikroskopische Darstellung der lichtabhängigen TRPL-eGFP-Translokation (B-C). Rhabdomere isolierter Ommatidien anhand INAD-eGFP-Fluoreszenz dargestellt (D).

Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP-exprimierender *Drosophila*-Retinae

A: Schematische Darstellung eines einzelnen Ommatidiums.

B: TRPL-eGFP im intrazellulären Speicherkompartiment in helladaptierten Fliegen

C: TRPL-eGFP ist rhabdomerisch in dunkeladaptierten Fliegen. Die eingezeichneten Sechsecke geben die ungefähre Größe eines Ommatidiums an.

D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines isolierten Ommatidiums INAD-eGFP (grün) befindet sich in den Rhabdomeren isolierter Ommatidien und TRPL-HcRed im intrazellulären Speicherkompartiment helladaptierter Fliegen.

Der TRP-Kanal ist neben TRPL für die Erzeugung des Photorezeptorpotentials notwendig. Ein wesentlicher Unterschied zu TRPL/TRPL-eGFP ist, dass TRP seine subzelluläre Lokalisation nicht reizbedingt verändert. TRP wird nach der Synthese in die Rhabdomere transportiert und bleibt auch bei Belichtung in der rhabdomerischen Membran verankert (Xu *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 2005). Obwohl für TRP keine lichtabhängige Wanderung zwischen zellulären Kompartimenten nachgewiesen wurde (Bähner *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006; Cronin *et al.*, 2006), war die mikroskopische Untersuchung der Verteilung eines C-terminalen TRP-eGFP-Fusionsproteins (Abb. 4.3) in Photorezeptoren eine wichtige Voraussetzung für die Konstruktion chimärer Proteine aus TRP und TRPL-eGFP. Der Vergleich des Translokationsverhaltens der chimären Proteine mit TRP-eGFP und TRPL-eGFP sollte Hinweise auf die für Translokation und Assemblierung notwendigen und hinreichenden Sequenzen liefern.

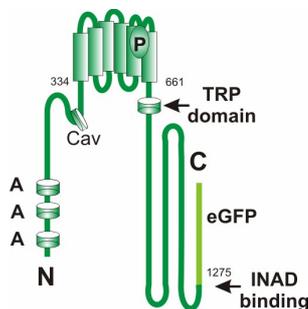


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des TRP-eGFP-Fusionsproteins

N: N-Terminus; **A:** Ankyrin-Wiederholungen; Cav: Caveolinbindestelle;

P: Porenregion; **C:** C-Terminus; **INAD-binding:** INAD- (InaD: “inactivation no after potential”)

Für die Konstruktion des TRP-eGFP Fusionsproteins in Abbildung 4.3 wurde wie im Falle des TRPL-eGFPs (Meyer *et al.*, 2006) das Stoppcodon in einer PCR-Reaktion durch einen mutagenen Primer entfernt (Details siehe Material und Methoden). Anschließend wurde das eGFP-codierende Gen (aus peGFP-1, BD-Biosciences) in den Leserahmen der *trp*-cDNA eingesetzt (Gerdon und Huber unveröffentlicht). Das eGFP-Gen endet mit einem Stoppcodon. Die Expression der *trp*-eGFP cDNA erfolgte im YC4-Vektor unter der Kontrolle des Rhodopsin 1 (*ninaE*)-Promotors (Mismer *et al.*, 1987). Das resultierende TRP-Protein ist C-terminal mit eGFP fusioniert.

Die Verteilung des TRP-eGFP wurde fluoreszenzmikroskopisch mittels Wasserimmersion intakter Augen und an isolierten Ommatidien untersucht. Biochemische Untersuchungen an TRP-eGFP in *trp*⁹ und TRP-eGFP in *wt* haben gezeigt, dass das TRP-eGFP-Fusionsprotein nicht an INAD bindet (Diplomarbeit Heinold, 2005). Dies ist wahrscheinlich eine Konsequenz der Fusion des eGFP an den C-Terminus. Die INAD (Inactivation no afterpotential D)-

Bindungsstelle im TRP-eGFP grenzt direkt an den Start des eGFP an. Es wurde für eine TRP-Deletionsvariante ohne INAD-Bindungsstelle gezeigt, dass die Kanaluntereinheiten in das Rhabdomer transportiert werden, aber nicht langfristig in der microvillären Membran verankert bleiben (Li und Montell, 2000).

Die Rhabdomere der Photorezeptorzellen R1-R6 der hell- und dunkeladaptierten TRP-eGFP-Fliegen fluoreszieren grün (Abb. 4.4 A und B). Eine lichtabhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation des TRP-eGFP ist nicht zu beobachten.

Die eGFP-Fluoreszenz in *trpl*³⁰²-Fliegen ist unabhängig von den verwendeten Lichtbedingungen auf die Rhabdomere beschränkt, die cytoplasmatischen Bereiche der Photorezeptorzellen werden ausgespart (Abb. 4.4 C und D). In der *trp*⁹-Mutante ist sowohl bei den hell- als auch bei den dunkeladaptierten Fliegen die grüne Fluoreszenz diffus in und um die Rhabdomere verteilt (Abb. 4.4 E und F).

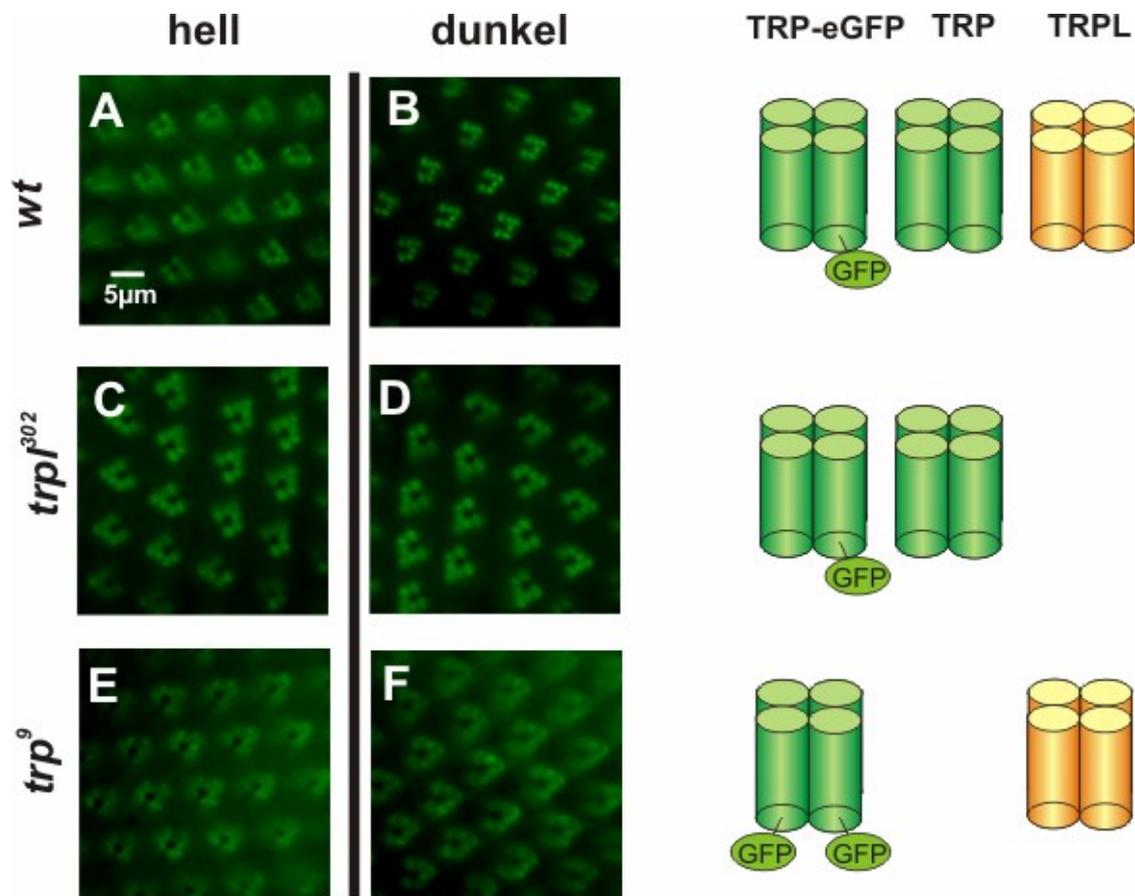


Abb. 4.4 TRP-eGFP ist in *wt*, *trp*⁹ und *trpl*³⁰²-Mutanten sowohl bei licht- als auch bei dunkeladaptierten Fliegen in den Rhabdomeren lokalisiert
 Wasserimmersionsaufnahme TRP-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen
A und B: TRP-eGFP im *wt*-Hintergrund hell- bzw. dunkeladaptiert.
C und D: TRP-eGFP in *trpl*³⁰², hell- bzw. dunkeladaptiert.
E und F: TRP-eGFP in *trp*⁹, hell- bzw. dunkeladaptiert.
Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den in A-F beschriebenen Mutanten. Die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs ermittelt wurden (siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14).
Grün: TRP/TRP-eGFP-Multimer bzw. TRP-Multimer; **Orange:** TRPL-Multimer.

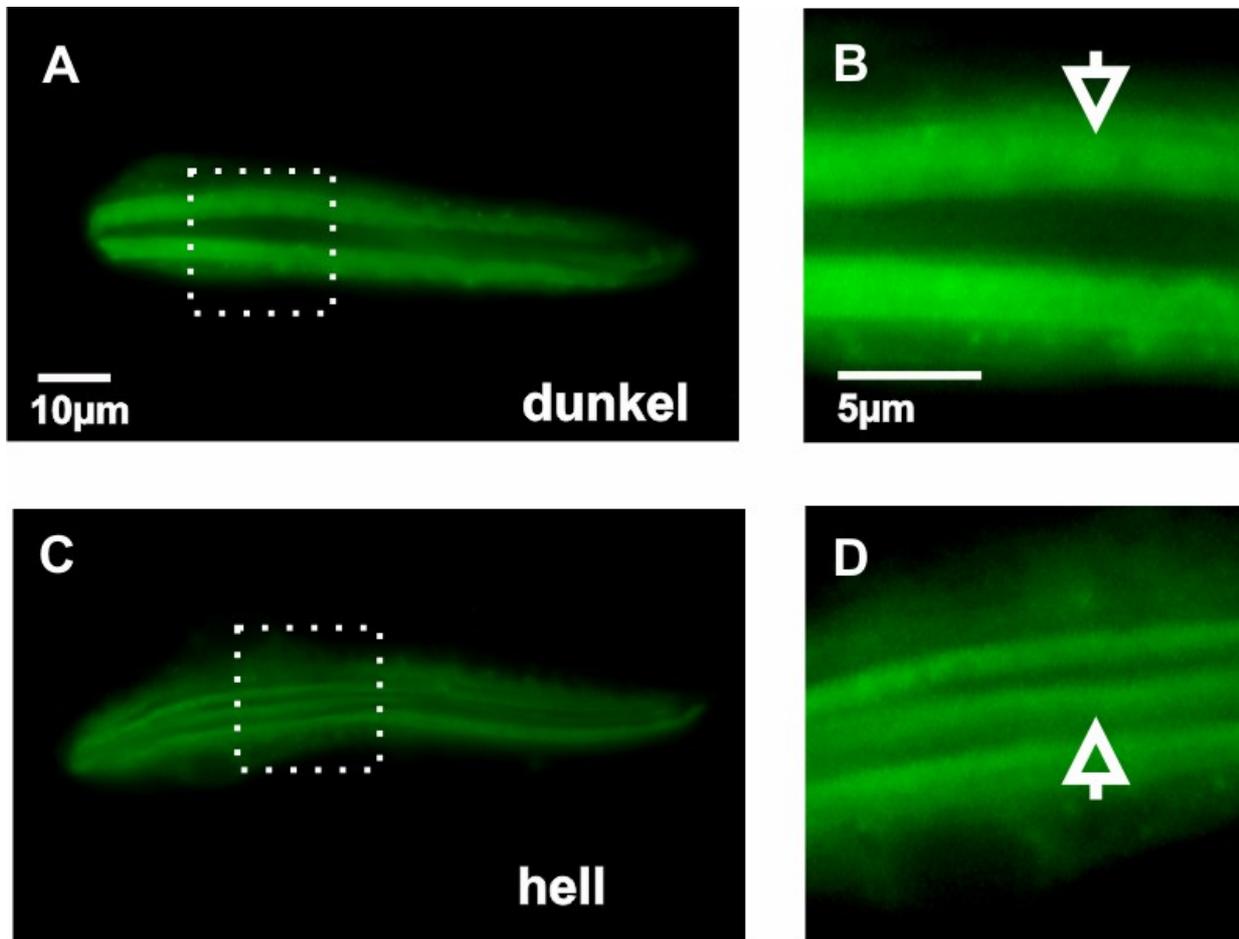


Abb. 4.5 TRP-eGFP ist überwiegend rhabdomerisch in hell- und dunkeladaptierten isolierten Ommatidien

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von isolierten Ommatidien (in Hanks Medium 100x Ölimmersionsobjektiv). Die 1-2 Tage alten transgenen TRP-eGFP; *wt*-Fliegen wurden vor der Präparation je 16h hell- bzw. dunkeladaptiert. Die der Cornea zugewandte Seite der Rezeptorzellen zeigt nach links.

B und D sind vergrößerte Ausschnitte der gestrichelten Quadrate aus A und C. Pfeil in B deutet auf mehrere übereinander liegende Rhabdomere, die intraommatidiale Kavität erscheint dunkel. Der Pfeil in D deutet auf ein Rhabdomer.

Das TRP-eGFP ist in allen untersuchten Mutanten und Lichtbedingungen in den Rhabdomeren angereichert und verhält sich damit weitgehend wie wildtypisches TRP. Dies konnte auch anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen an isolierten Ommatidien bestätigt werden (Abb. 4.5). Die diffuse Verteilung des Proteins in *trp⁹*-Mutanten ist wahrscheinlich eine Folge der Maskierung der INAD-Bindungsstelle durch eGFP. Die Untersuchung der TRP-eGFP-Verteilung in isolierten Ommatidien zeigt, dass der Hauptanteil des Proteins rhabdomerisch ist (Abb. 4.5 B, D Pfeile). In der *trp⁹*-Mutante ist nennenswerte GFP-Fluoreszenz außerhalb der rhabdomerischen Membranen zu beobachten (Abb. 4.6 B

Pfeile). Die Verteilung des TRP-eGFP hängt weder im *wt*, noch in der *trp⁹*-Mutante maßgeblich von den Lichtbedingungen ab. Endogenes TRP trägt zur Anreicherung oder Retention des TRP-eGFP im Rhabdomer bei.

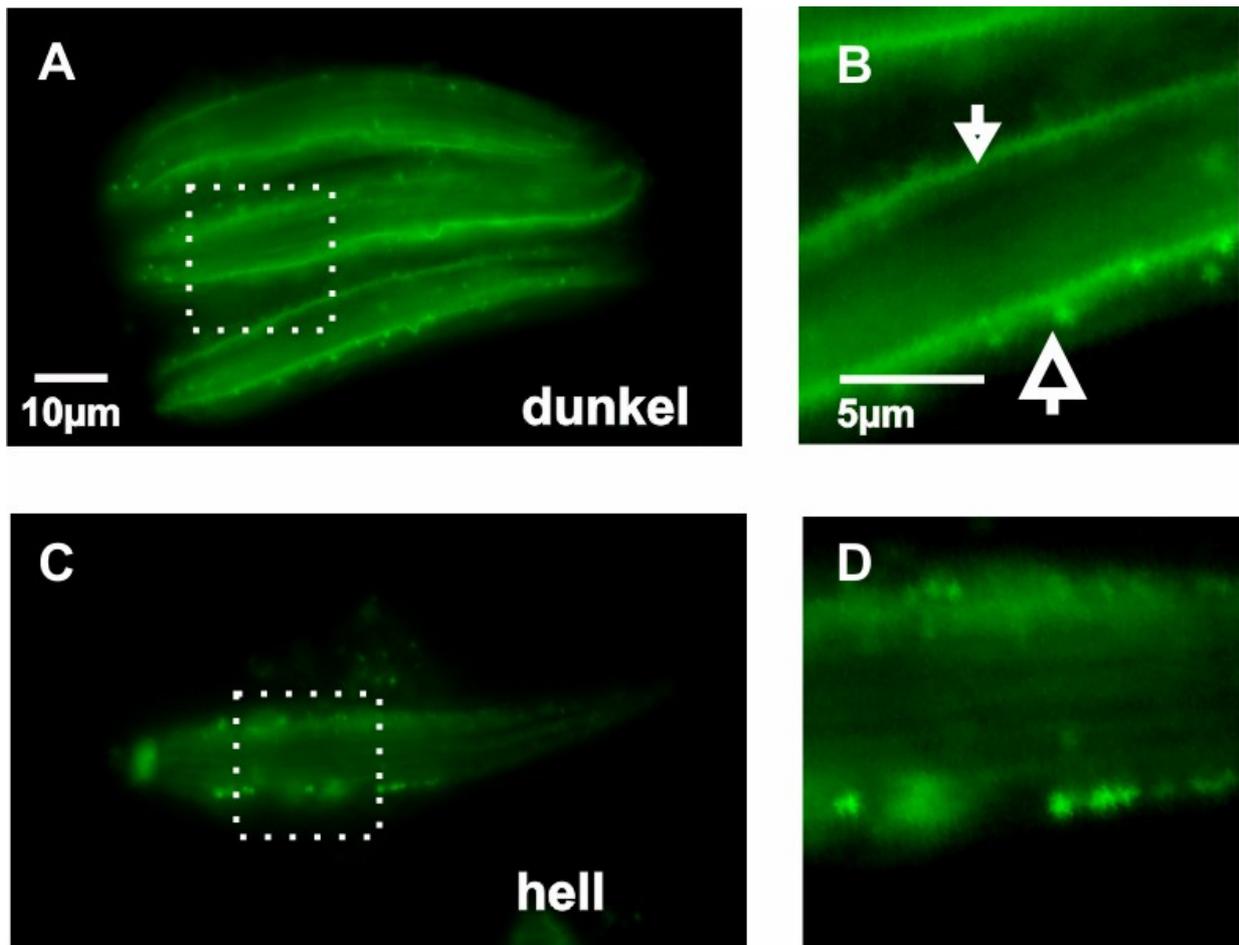


Abb. 4.6 TRP-eGFP benötigt endogenes TRP für die Retention im Rhabdomer
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von isolierten Ommatidien (in Hanks Medium 100x Ölimmersionsobjektiv). Die 1-2 Tage alten transgenen TRP-eGFP; *trp⁹*-Fliegen wurden vor der Präparation je 16h hell- bzw. dunkeladaptiert. Die der Cornea zugewandte Seite der Rezeptorzellen zeigt nach links.
 B und D sind vergrößerte Ausschnitte der gestrichelten Quadrate aus A und C. Die Pfeile in B deuten auf die Grenze zwischen Rhabdomer und Zellkörper.

4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung der TRP-eGFP-Funktion in der Retina transgener *Drosophila*

Die Funktionalität des TRP-eGFP-Kanals wurde mittels Elektretinographie in der amorphen *trp⁹*-Mutante untersucht. Das *trp⁹*-Allel zeigt eine ausgeprägte transiente Depolarisation der Retina als Antwort auf einen Lichtreiz (Cosens und Manning, 1969; Hardie und Minke, 1992). Die Amplitude der Reizantwort in *trp⁹* ist vergleichbar mit der Amplitude wildtypischer Fliegen. Die Rezeptorzellen in *trp⁹* repolarisieren jedoch noch während des Lichtstimulus (Abb. 4.7).

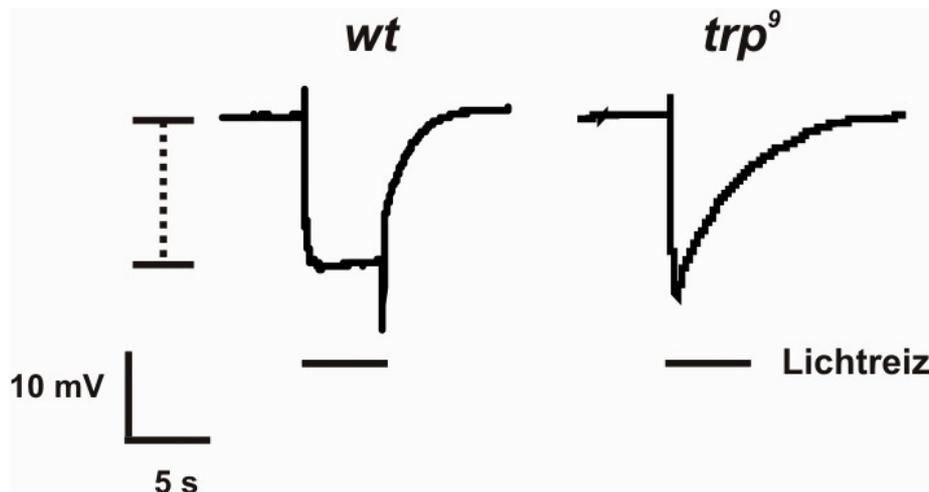


Abb. 4.7 **Typisches Elektretinogramm wildtypischer und *trp⁹*-mutanter Fliegen**
 Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf einen 5s Lichtreiz relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die 1-2 Tage alten *wt*- bzw. *trp⁹*-Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert.
 Gestrichelte Linie: Amplitude des Photorezeptorpotentials. Das Photorezeptorpotential der *trp⁹*-Mutante ist transient; die Rezeptorzellen beginnen während des Stimulus zu repolarisieren.

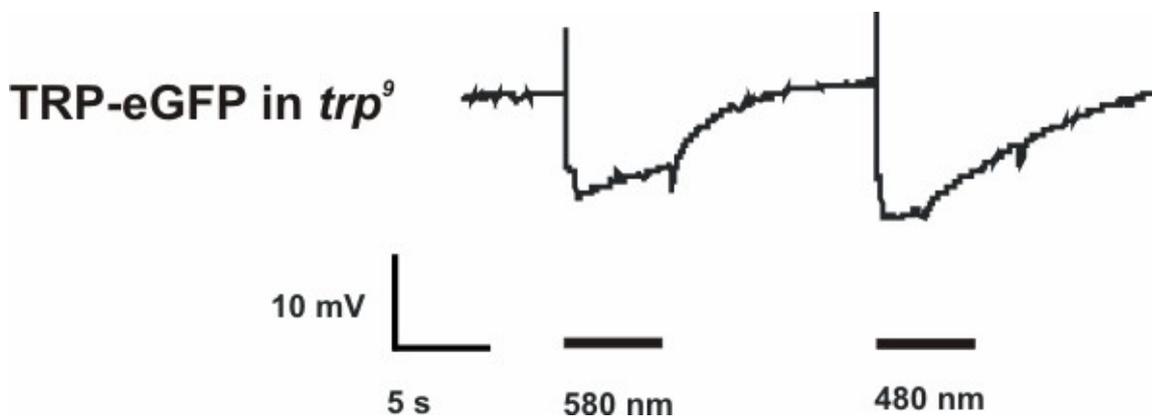


Abb. 4.8 **Elektroretinogramm TRP-eGFP exprimierender Fliegen in der *trp*⁹-Mutante: TRP-eGFP-Expression rettet den „transienten“ Rezeptorpotentialphänotyp der *trp*⁹-Mutante nicht vollständig**

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlänge der verwendeten Stimuli waren 580 nm bzw. 480 nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert. Das ERG der TRP-eGFP; *trp*⁹-Fliege erreicht bei Stimulation mit einem 5s Orangelicht-Stimulus ein „steady-state“ und kehrt nach Beendigung des Stimulus zum Ausgangswert zurück. Die Rezeptorantwort auf erneute 5s Stimulation mit Licht der Wellenlänge 480nm ist transient.

Der Vergleich des Elektroretinogramms (ERG) der *trp*⁹-Mutante mit dem ERG transgener TRP-eGFP; *trp*⁹-Fliegen legt nahe, dass das TRP-eGFP-Protein funktionale Kanäle bildet (Abb. 4.8). Die Photorezeptoren der transgenen Fliegen depolarisieren auf einen 5s Orangelichtpuls und verbleiben depolarisiert bis zum Ende des Stimulus. Eine weitere Belichtung des Auges mit einem 5s Blaulichtpuls führt zu einer transienten Depolarisation. Diese Beobachtungen deuten auf einen funktionalen, aber nicht vollständig wildtypischen Kanal hin. Ursache für diesen Phänotyp und die leichte Fehlverteilung des Proteins auf rhabdomerische und intrazelluläre Kompartimente ist wahrscheinlich die Position der eGFP-Fusion. Die Fusion des eGFP an den C-Terminus des TRP grenzt direkt an das PDZ-Bindungsmotiv an, welches für die Interaktion von TRP mit INAD notwendig ist. Co-IP Experimente aus TRP-eGFP; *trp*⁹-Fliegen zeigen, dass die Wechselwirkung mit dem INAD gestört ist. (Diplomarbeit Heinold, 2005).

4.2.3 In Photorezeptorzellen exprimierte TRP-Kanäle verlassen das Rhabdomer nicht zusammen mit markierten TRPL-Untereinheiten

Die Co-Lokalisation von Proteinen in mikroskopischen Präparaten ist eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für deren physische Wechselwirkung. Umgekehrt ist es außerordentlich unwahrscheinlich, dass Proteine, die nicht co-lokalisieren, physisch dauerhaft miteinander wechselwirken. Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen der TRPL Translokation in *Calliphora* und *Drosophila* haben gezeigt, dass TRP-Untereinheiten im Gegensatz zum TRPL-Untereinheiten nicht in der Lage sind, ihre subzelluläre Lokalisation reizbedingt zu ändern (Bähner *et al.* 2002; Meyer *et al.* 2006; Cronin *et al.* 2006). TRP und TRPL co-lokalisieren zumindest zeitweise nicht miteinander. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Kanäle das Rhabdomer nicht gemeinsam als Bestandteile eines Multimers verlassen.

Studien an spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Übersicht Papazian, 1999; Schulteis *et al.*, 1998), ACh-Rezeptoren (Smith *et al.*, 1987), sekretierten Proteinen (Hurtley und Helenius, 1989; Helenius *et al.*, 1992; Kopito, 1997) und NMDA-Rezeptoren (Hawkins *et al.*, 2004) legen nahe, dass die Assemblierung von Kanaluntereinheiten überwiegend co-translational im ER oder anschließend im Golgi-Apparat erfolgt. Die Bildung der Multimere ist dabei eine notwendige Voraussetzung für den Transport der Proteine zur apikalen Membran. Die Bildung und Auflösung der Multimere erfolgt dementsprechend nicht im Zielkompartiment. Unter der Annahme, dass dies auch für TRP/TRPL zutrifft, müsste TRP im Heteromer mit TRPL zusammen translozieren.

Die Verfügbarkeit von Fliegen, die TRP-eGFP und TRPL-HcRed Fusionsproteine in Photorezeptorzellen R1-R6 co-exprimieren, machte es möglich, das Verhalten des TRP-Proteins in lebenden Fliegen unter den Lichtbedingungen zu untersuchen, unter denen das TRPL das Rhabdomer verlässt. TRPL-HcRed zeigt wildtypisches Wanderungsverhalten als Antwort auf Licht- und Dunkeladaptation (Abb. 4.9 A, B). Das TRP-eGFP Protein ist unabhängig von den Lichtbedingungen immer im Rhabdomer nachweisbar (Abb. 4.9 C, D). TRPL-HcRed liegt in helladaptierten Photorezeptoren in einem intrazellulären Membrankompartiment vor, während TRP-eGFP rhabdomerisch ist (Vgl. Abb. 4.9 B mit D, F Overlay aus B und D). Im dunkeladaptierten Zustand co-lokalisiert TRPL-HcRed mit TRP-eGFP im Rhabdomer. (vgl. Abb. 4.9 A mit C, E Overlay aus A und C). In lichtadaptierten Fliegen sind TRP-eGFP und TRPL-HcRed nicht im gleichen Kompartiment nachweisbar.

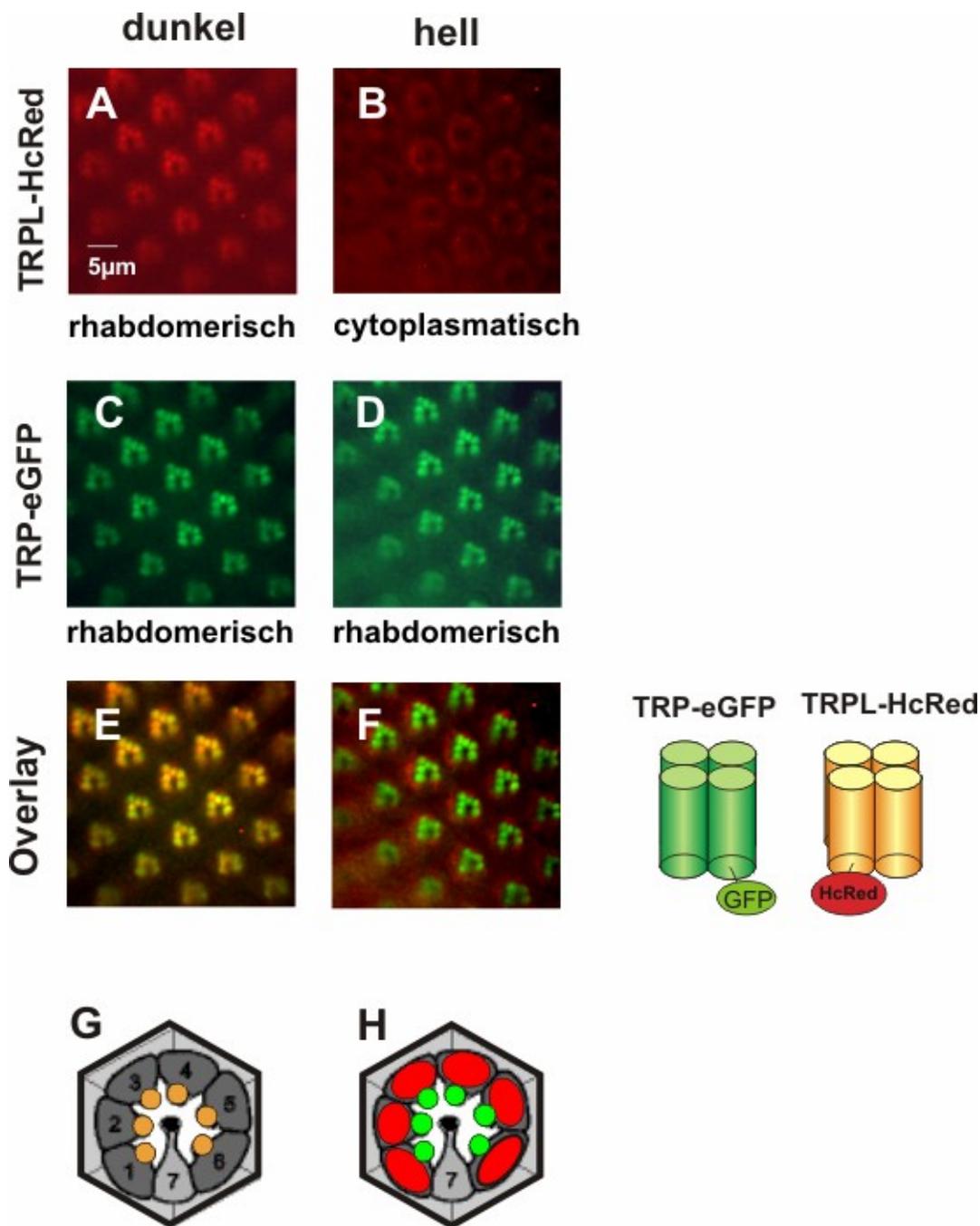


Abb. 4.9 Co-Expression von TRPL-HcRed und TRP/TRP-eGFP in *Drosophila* Photorezeptorzellen. Die Fusionsproteine co-lokalisieren teilweise in den Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen

Wasserimmersionsaufnahmen von *Drosophila*-Augen, die TRP-eGFP und TRPL-HcRed exprimieren.

A und B: TRPL-HcRed im *wt*-Hintergrund hell- bzw. dunkeladaptiert.

C und D: TRP-eGFP hell- bzw. dunkeladaptiert.

E: Overlay aus A und C. **F:** Overlay aus B und D.

G und H: Schematische Darstellung eines Ommatidiums im Querschnitt auf Höhe der Photorezeptorzellen (1-7). Die rhabdomerische Co-Lokalisation von TRP-HcRed und

TRP-eGFP in G ist orange dargestellt. In H ist cytoplasmatisches TRP-HcRed rot und rhabdomerisches TRP-eGFP grün dargestellt.

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den Abb. A-D. **Grün:** TRP/ TRP-eGFP-Multimer bzw. TRP-Multimer; **Orange:** TRPL-Multimer.

4.2.4 Die Störung der Rab11-Funktion unterbindet den Transport von TRP-eGFP in das Rhabdomer

Der Mechanismus des apikalen Transportes der TRP-Kanäle in Photorezeptorzellen ist weitgehend unbekannt. Erste Erkenntnisse über die Beteiligung der monomeren GTPase Rab 11 am apikalen Transport von TRP-Kanälen liegen für humane TRPV5/6-Kanäle (van de Graaf *et al.*, 2006) und das *Drosophila*-TRP-Protein vor. Die Störung der Rab11-Funktion /Expression durch ein dominant-negatives Rab11 bzw. ein RNAi-Konstrukt unterbindet den apikalen Transport des TRP (Sato *et al.*, 2003). Die Funktion des Rab11 beim Transportprozess ist nicht bekannt. Die Anreicherung des Rab11 in Endosomen spricht für den Transport des TRP-Proteins in die apikale Membran über das sog. SAC (Sub Apical Compartment) (Übersicht Hoekstra *et al.*, 2004).

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von TRPL-HcRed TRP-eGFP exprimierenden Fliegen (Abb. 4.9) spricht gegen den gemeinsamen Export der Kanaluntereinheiten aus den Rhabdomeren. Es schließt jedoch den gemeinsamen Transport von TRP und TRPL in das Rhabdomer nicht aus. In diesem Fall würde die Störung der Rab11 Funktion den apikalen TRP- und TRPL-Transport behindern.

Die Wirkung des Rab11-Proteins auf den apikalen Transport von TRPL wurde durch Co-Expression der Rab11-RNAi bzw. Rab11 DN (dominant-negative)-Konstrukte mit TRPL-eGFP in Photorezeptorzellen untersucht.

4.2.5 Die Expression einer dominant-negativen Rab11-Variante hat keinen Einfluss auf den Transport von TRPL in das Rhabdomer

Der TRPL-Transport in das Rhabdomer wird in dunkeladaptierten Fliegen von der Expression eines Rab11-DN/RNAi-Transgens nicht behindert (Abb. 4.10). Das TRPL-eGFP verbleibt im lichtadaptierten Zustand im Rhabdomer. Die Retention der TRPL im Rhabdomer lichtadaptierter Fliegen ist wahrscheinlich eine indirekte Wirkung der Rab11-Transgene auf den auf den Transport von TRP und Rhodopsin (Sato *et al.*, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass TRP und Rhodopsin notwendig für den Export des TRPL aus dem Rhabdomer sind (Meyer *et al.*, 2006; Cronin *et al.*, 2006).

Aus der gegenteiligen Wirkung der Rab11-Transgene auf den subzellulären Transport von TRP und TRPL kann man schließen, dass die beiden Proteine durch unterschiedliche Mechanismen in das Rhabdomer transportiert werden.

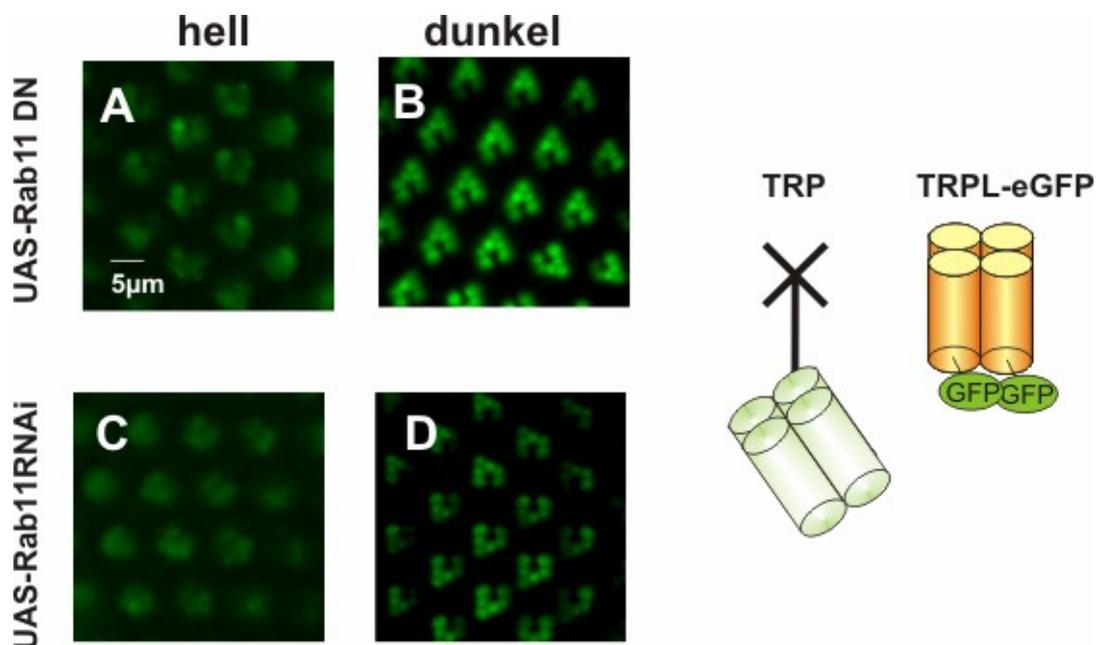


Abb. 4.10 TRPL-eGFP-Transport in das Rhabdomer benötigt keine Rab11 Funktion. Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen
A und B: TRPL-eGFP, Co-Expression einer dominant-negativen Rab11-Variante unter Kontrolle des Rh1-Promotors, hell- bzw. dunkeladaptiert.
C und D: TRPL-eGFP, Co-Expression eines gegen Rab11 gerichteten RNAi-Transgens unter Kontrolle des Rh1-Promotors, hell- bzw. dunkeladaptiert.
Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den A-D beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).
Grün: TRP-Multimer, **Hellgrün:** intrazelluläres TRP-Multimer; **Orange:** TRPL-Multimer.

4.3 Bestimmung der Bindungspartner von TRP-eGFP und TRPL-eGFP mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen

Durch Co-Immunopräzipitationen sollte geprüft werden, ob die TRP- und TRPL-eGFP-Fusionsproteine in Rezeptorzellen mit ihrem endogenen Pendant oder mit der paralogen Protein-Untereinheit multimerisieren. Die Bindungspartner der epitopmarkierten TRP bzw. TRPL sollten mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers aus nativen Membranextrakten transgener Fliegen co-präzipitiert werden. In Vorversuchen wurden Co-Immunopräzipitationen aus Membranextrakten wildtypischer Fliegen mit dem α -GFP-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.11 A, B). Diese Fliegen exprimieren kein eGFP-Epitop und dienen dazu, Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen endogene *Drosophila*-Proteine auszuschließen.

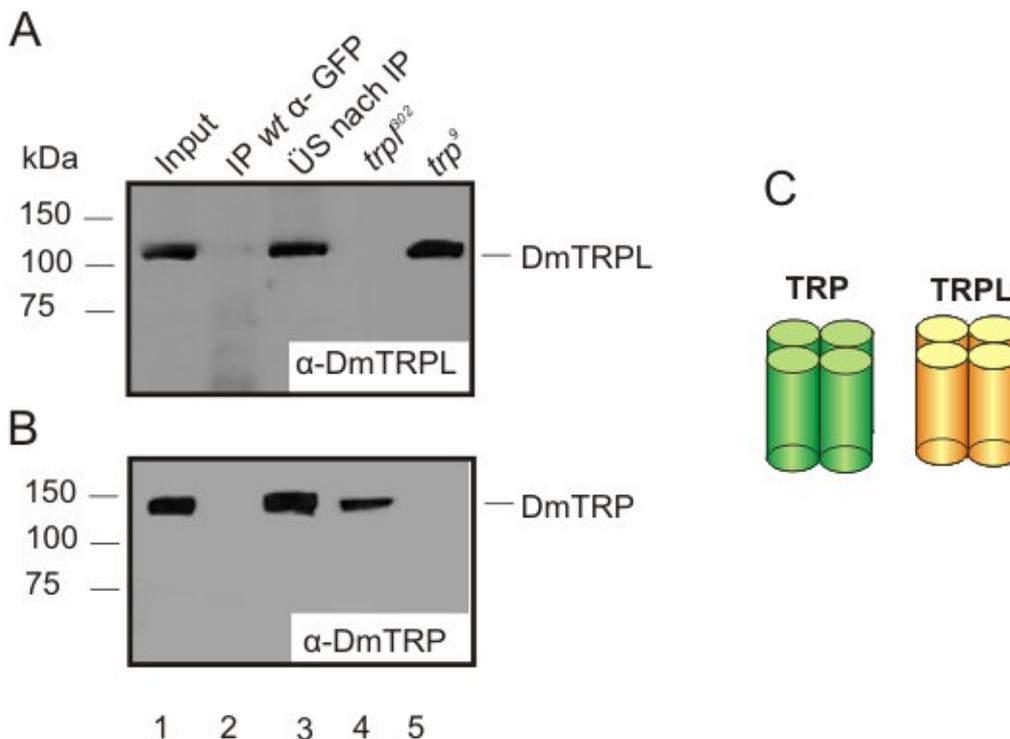


Abb. 4.11 Co-Immunopräzipitation von Proteinen aus Köpfen der Fliegenlinie *wt* durch einen α -GFP-Antikörper (A und B)

Die Extraktion der Proteine erfolgte mit dem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP). Der monoklonale α -GFP-Antikörper wurde an eine Protein G-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt:

Input: Es wurde das Proteinextrakt aus 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen geladen. IP

(Präzipitat): Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus 500 *Drosophila*-Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aufgetragen. ÜS nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes entsprechend 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen

nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die nachgewiesenen Proteinbanden mit α -DmTRPL und α -DmTRP-Antikörpern dienen TritonX-100-Proteinextrakte aus je 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen von *trpl*³⁰²- und *trp*⁹-Mutanten.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 8%igen SDS-Gel. Die Extrakte wurden mittels Western Blot-Analysen überprüft. Es handelt sich bei A und B um zwei verschiedene Blots.

C: In *wt*-Fliegen vorhandene TRPs. **Grün:** TRP; **Orange:** TRPL.

Aus dem TritonX-100-Proteinextrakt (und RIPA-Extrakt, Daten nicht gezeigt) der Köpfe von *wt*-Fliegen wurde durch den α -GFP-Antikörper eine geringe Menge (Präzipitat aus 500 Köpfen) an endogenem TRPL, aber kein endogenes TRP präzipitiert (Abb. 4.11 A und B, Spur 2). Die in Spur 1 und 3 detektierten endogenen TRPL-Banden entsprechen einer TRPL-Menge aus 5 Köpfen und sind um ein Vielfaches stärker als die TRPL-Menge, die der Antikörper aus 500 Köpfen präzipitiert.

Um zu klären, mit welcher Kanaluntereinheit die Epitop-markierten TRP bzw. TRPL Ionenkanäle *in vivo* assoziiert sind, wurden die einzelnen Fusionsproteine im *wt*-Hintergrund exprimiert. In den Photorezeptorzellen stehen den rekombinanten Proteinen endogenes TRP und TRPL als Bindungspartner zu Verfügung. Dieser Ansatz bietet im Gegensatz zu heterologen Expressionssystemen (Harteneck *et al.*, 1995; Obukhov *et al.*, 1996; Hardie *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Parnas und Minke, 2007) den Vorteil einer vollständig physiologischen Umgebung für die Assemblierung von Multiproteinkomplexen. Die Kanal-eGFP-Fusion kann auf Immunoblots sowohl mit einem TRP/TRPL spezifischen Antikörper (oder mit dem beschriebenen α -GFP-Antikörper) detektiert werden. Die eGFP-markierte Kanaluntereinheit kann von endogenen Kanaluntereinheiten aufgrund des Größenunterschiedes unterschieden werden (Meyer *et al.*, 2006).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Co-Immunopräzipitation von Membranproteinen ist die Extrahierbarkeit der nativen Proteinkomplexe mit Detergenzien. Die Auswahl des Detergenz ist maßgeblich für die Qualität der IP verantwortlich. Die unzureichende Extraktion einzelner Komponenten oder zu harsche Extraktionsbedingungen sind die Hauptquelle für falsch-positive und falsch-negativ Ergebnisse. Vollständig solubilisierte Membranproteine befinden sich nach UZ (10⁵g, 1h) im Überstand. Vesikel und „Membranschollen“ werden dabei pelletiert. Es ist zweckmäßig, Extrakte zu verwenden, die keine Vesikel enthalten. Zwei Proteine, die in einem Vesikel enthalten sind, können sonst „co-präzipitiert“ werden, ohne direkt miteinander assoziiert zu sein. Anfängliche Versuche zielten auf vollständige Extraktion und Solubilisierung von TRPL aus Kopfmembranen ab. Dabei wurde ein Extraktionspuffer aus (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1,5 % NP-40, 0,2 % Dodecylmaltosid, 0,1 % SDS-„RIPA“-Extraktionspuffer) verwendet. Die Membranextrakte wurden nach der Extraktion

ultrazentrifugiert und für die IP verwendet. Durch den α -GFP-Antikörper konnte aus dem Proteinextrakt der TRPL-eGFP-Fliegen zum einen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa, und zum anderen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa präzipitiert werden (Abb. 4.12 A, Spur 3). Die Proteinbande bei ca. 150 kDa entspricht TRPL-eGFP, welches ein errechnetes Molekulargewicht von 155 kDa hat. Die Proteinbande bei ca. 130 kDa entspricht endogenem TRPL (128 kDa). Aus der Abbildung 4.12 B, Spur 2 ist erkennbar, dass kein endogenes TRP (142 kDa) präzipitiert wurde, obwohl es im Proteinextrakt enthalten ist (Abb. 4.12 B, Spur 1).

Die Immunopräzipitation mit RIPA-Extrakten aus TRPL-eGFP; *wt*-Fliegen legt nahe, dass TRPL-eGFP *in vivo* exklusiv an endogenes TRPL-Protein gebunden vorliegt, und mit endogenem TRP keine Interaktion eingeht. (Abb. 4.12; Schema)

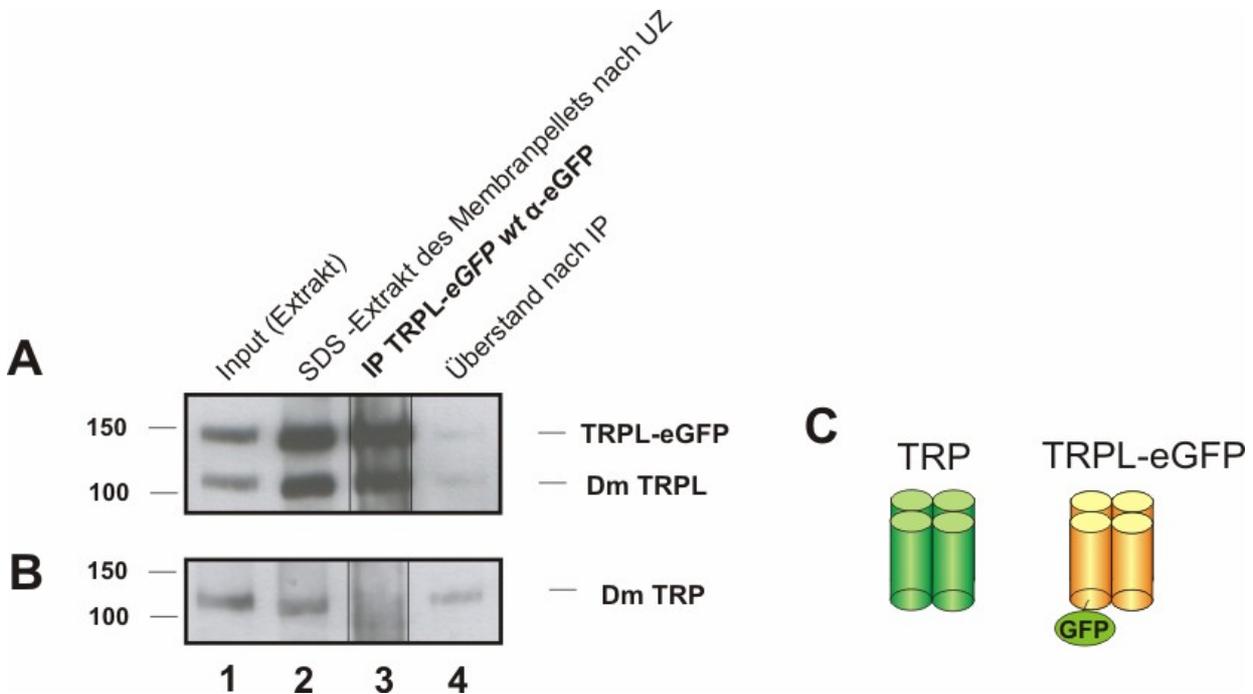


Abb. 4.12 TRPL-eGFP co-präzipitiert endogenes TRPL aus Kopfmembranextrakten einer TRPL-eGFP Fliegenlinie

Die Extraktion der Proteine aus *trpl-eGFP*; *wt*-Fliegen erfolgte mit dem modifizierten RIPA-Extraktionspuffer. Der monoklonale α -GFP-Antikörper wurde an eine Protein A/G-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: Input (extrahierte Membranproteine vor IP): Es wurde der Proteinextrakt aus 5 *Drosophila*-Köpfen geladen. IP (Präzipitat): Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus 250 *Drosophila*-Köpfen inkubiert. SDS-Extrakt: Das Pellet wurde nach der UZ in SDS-

Probenpuffer resuspendiert. Das im Pellet nachgewiesene TRPL/TRPL-eGFP (Spur 2 A) und TRP (Spur 2 B) stellt den nicht solubilisierten Anteil an TRPC im Extrakt dar. ÜS nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes entsprechend 5 *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Die Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot-Analysen überprüft. Bei B handelt es sich um den gleichen Blot wie bei A. Die gebundenen Ak aus A wurden entfernt und der Blot wurde mit einem α -TRP inkubiert.

Die Co-IP des TRPL-eGFP wurde unter Verwendung eines TritonX-100/Saponin (TXSEP) Extraktionspuffer ohne Ultrazentrifugation wiederholt. Das eGFP-Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines monoklonalen α -GFP-Antikörpers aus TritonX-100-Proteinextrakten aus Köpfen von TRPL-eGFP-Fliegen präzipitiert (Abb. 4.13). Diese vereinfachte Methode kam zum gleichen Ergebnis wie die Co-Immunopräzipitation mit ultrazentrifugierten RIPA-Extrakten und wurde für alle nachfolgenden Immunopräzipitationen verwendet.

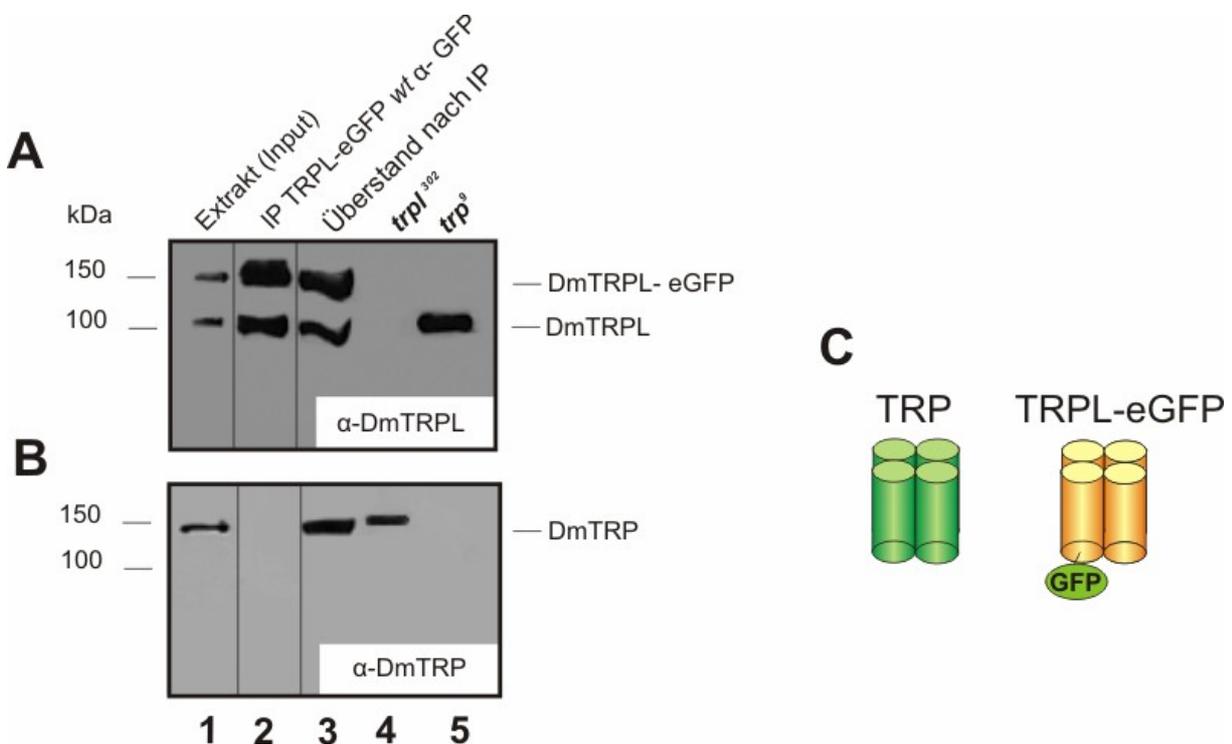


Abb. 4.13 TRPL-eGFP co-präzipitiert endogenes TRPL aus Kopfmembranextrakten einer TRPL-eGFP Fliegenlinie

Die Extraktion der Proteine aus TRPL-eGFP, *wt* erfolgte mit einem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP). Der monoklonale α -GFP-Antikörper wurde an eine Protein G-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: Input: Es wurde das Proteinextrakt aus 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*- Köpfen geladen. IP (Präzipitat): Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus 500 *Drosophila*-

Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aufgetragen. ÜS nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes entsprechend 5 **(A)** bzw. 3 **(B)** *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die spezifisch detektierten Proteine mit α -DmTRPL **(A)** bzw. α -DmTRP-Antikörpern **(B)** dienten TritonX-100-Extrakte aus je 5 **(A)** bzw. 3 **(B)** *Drosophila*-Köpfen von *trp*³⁰²- und *trp*⁹- Mutanten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 8%igen SDS-Gel. Die Überprüfung der Extrakte erfolgte mittels Immunoblot-Analyse. Es handelt sich bei A und B um zwei verschiedene Blots.

Abb. C fasst das Ergebnis aus Abb. A und B schematisch zusammen. TRPL-eGFP bildet mit endogenem TRPL Multimere.

Grün: TRP-Multimer; **Orange:** TRPL-eGFP/ TRPL-Multimer.

Durch den α -GFP-Antikörper konnte mit der vereinfachten Methode ohne Ultrazentrifugation dem aus TritonX-100-Extrakten TRPL-eGFP-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa, und endogenes TRPL mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa präzipitiert werden (Abb. 4.13 A, Spur 2). Anhand dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass TRPL-eGFP nicht als Heteromultimer mit endogenem TRP vorliegt, sondern nur mit endogenem TRPL (Abb. 4.13 C; Schema) assembliert ist.

4.3.1 TRP-eGFP bildet exklusiv Multimere mit endogenem TRP

Zur Bestimmung der Bindungspartner von TRP-eGFP wurde ebenfalls eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Durch den monoklonalen α -GFP-Antikörper wurde das TRP-eGFP-Fusionsprotein aus Proteinextrakten von TRP-eGFP-Fliegen präzipitiert. Diese Fliegen exprimieren neben TRP-eGFP auch endogenes TRP und endogenes TRPL.

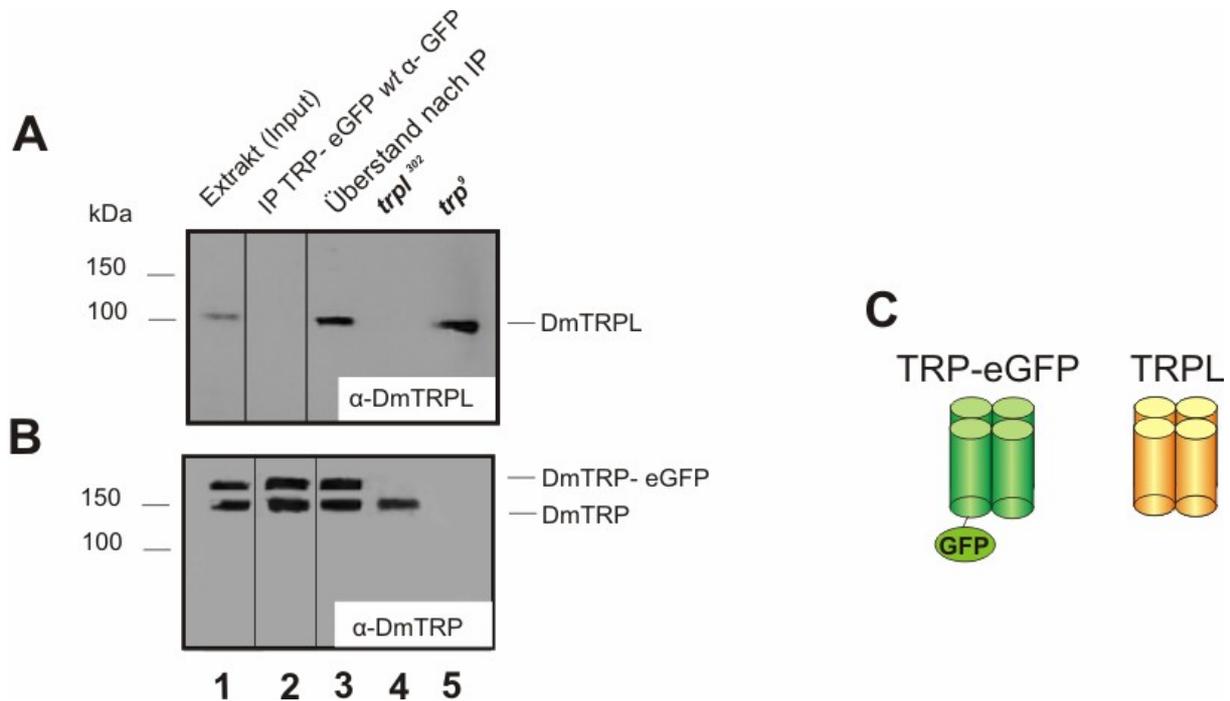


Abb. 4.14 TRP-eGFP co-präzipitiert endogenes TRP aus Kopfmembranextrakten einer TRP-eGFP Fliegenlinie

Die Extraktion der Proteine aus TRP-eGFP, *wt* erfolgte mit dem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP). Der monoklonale α -GFP-Antikörper wurde an eine ProteinG-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: Input: Es wurde das Proteinextrakt aus 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen geladen. IP (Präzipitat): Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus 250 *Drosophila*-Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aufgetragen. ÜS nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes entsprechend 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die mit α -DmTRPL (**A**) und α -DmTRP-Antikörpern (**B**) detektierten Proteinbanden dienen TritonX-100-Extrakte aus je 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen von *trpl*³⁰²- und *trp*⁹-Mutanten. Die Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot-Analysen überprüft. Es handelt sich bei A und B um zwei verschiedene Blots. **Abb. C** fasst das Ergebnis aus Abb. A und B schematisch zusammen. TRP-eGFP bildet mit endogenem TRP Multimere. **Grün**: TRP-eGFP/ TRP-Multimer; **Orange**: TRPL-Multimer.

Aus dem Proteinextrakt der Köpfe von TRP-eGFP-Fliegen konnte durch den α -GFP-Antikörper TRP (150 kDa) und TRP-eGFP (ca. 170 kDa) präzipitiert werden (Abb. 4.14 B, Spur 2). Beide Banden konnten auch in Spur 1 und 3 nachgewiesen werden. Aus der Abb. 4.14 A Spur 2 ist erkennbar, dass kein endogenes TRPL (128 kDa) co-präzipitiert wurde, obwohl es im Proteinextrakt enthalten war (Abb. 4.14 A, Spur 1). Immunpräzipitationen des TRP mit einem polyklonalen α -TRP-Ak aus ultrazentrifugierten RIPA-Extrakten von TRPL-eGFP-Fliegen lieferten ebenfalls keine Hinweise auf TRP/TRPL-Heteromere (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass TRP-eGFP mit endogenem TRPL nicht physisch wechselwirkt. TRP-eGFP bindet *in vivo* exklusiv an endogenes TRP (Abb. 4.14 C; Schema).

4.3.2 TRPL-eGFP Untereinheiten liegen *in vivo* als Homodimere und Homotetramere vor

Die Assemblierung der Kanäle und die lichtabhängige Wanderung des TRPL-Kanals sind wahrscheinlich eng miteinander verknüpft. Das Verständnis der Mechanismen, die der Multimerisierung zu Grunde liegen, kann Einblicke in den Wanderungsmechanismus liefern. Die Ergebnisse aus den Co-Immunpräzipitationen epitop-markierter TRP und TRPL-Untereinheiten (Abb. 4.12, 4.13, 4.14) sprechen gegen das Vorhandensein von TRP/TRPL-Heteromultimeren in Photorezeptoren. Um direkte Hinweise auf mögliche TRPL-Homomultimere zu erhalten, wurden native Membranproteinextrakte aus TRPL-eGFP (in der *trp*³⁰²-Mutante) exprimierenden Fliegen einer nativen Gelelektrophorese unterzogen. Diese Methode wurde von Kedei und Mitarbeitern verwendet, um die tetramere Struktur der VR1 (TRPV1)-Kanäle (Kedei *et al.*, 2001) nachzuweisen. Die Membranfraktion aus *Drosophila*-Köpfen (über Nacht dunkeladaptiert, 2 Tage alt) wurde mit dem sehr schonenden ionischen Detergens PFO (Perfluorooktanoat) extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend auf einem nativen Gel aufgetrennt und geblottet. PFO im Gel verhindert das Ausfallen der nativen Proteinkomplexe während der Elektrophorese. Die Trennleistung nativer Gele ist geringer als die denaturierender Gele; die Proteinbanden erscheinen daher verbreitert. Die Proteinkomplexe wurden auf dem Immunoblot anhand des eGFP-Epitops mit dem monoklonalen α -GFP-Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper ist spezifischer als der verwendete polyklonale α -TRPL-III-Antikörper (Meyer *et al.* 2006). TRPL-eGFP multimerisiert mit endogenem TRPL (siehe Abb. 4.12, 4.13). Die TRPL/TRPL-eGFP Multimere würden unterschiedliche Verhältnisse von endogenen zu ektopisch exprimierten TRPL Untereinheiten enthalten. Diese Multimere wären auf dem nativen Gel als verbreiterte Bande bzw.

Bandenleiter zu sehen. Diese Komplikation wurde durch die Expression des TRPL-eGFP in der *trpl*³⁰²-Mutante umgangen.

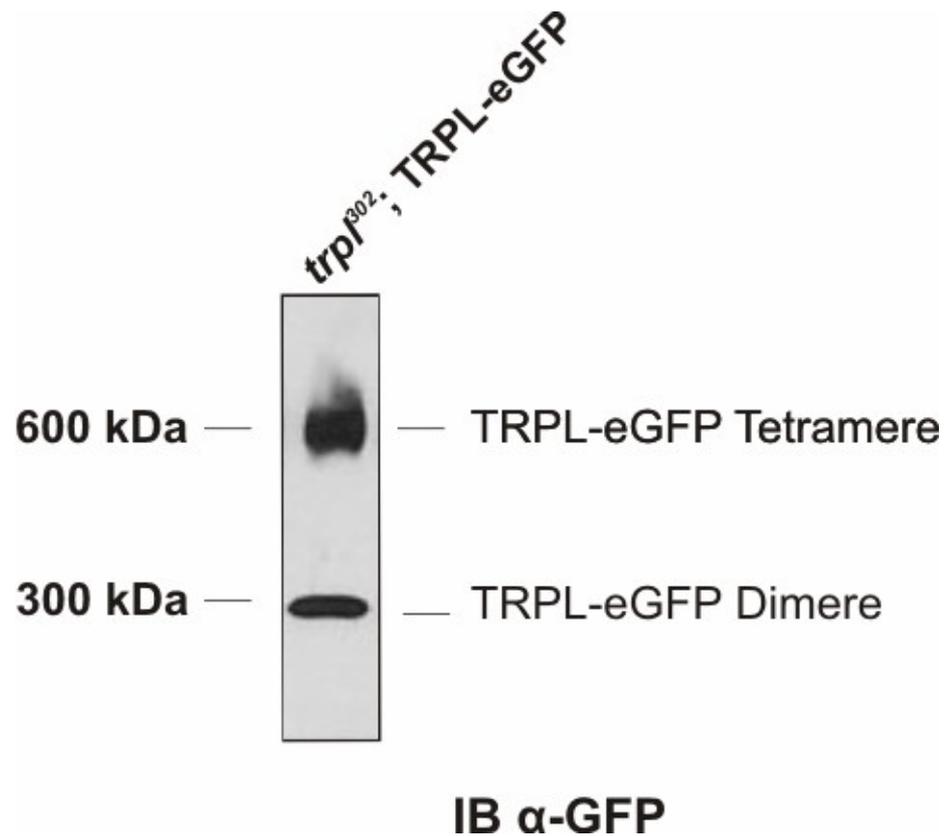


Abb. 4.15 TRPL-eGFP bildet *in vivo* Homotetramere und Homodimere.

Immunoblot von Proteinen eines nativen Membranextraktes aus einer TRPL-eGFP exprimierenden Fliegenlinie ohne endogenes TRPL. Die Extraktion der Proteine aus den Köpfen von TRPL-eGFP; *trpl*³⁰² erfolgte mit PFO-Extraktionspuffer. Die Proteinkomplexe wurden auf einem nativen 4%-PFO-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. TRPL-eGFP wurde mit α -GFP-Antikörpern nachgewiesen. Auf die Spur wurden die Proteine von 6 Köpfen geladen. Links ist die Position von Molekulargewichtsstandards angegeben.

Bei dem Experiment (Abb. 4.15) konnten TRPL-eGFP-Multimere in den nativen Membranproteinextrakten als 2 Proteinkomplexe unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Durch Vergleich mit einem Mw-Standard (siehe Material und Methoden) ließ sich die Größe der Proteinbanden zu ca. 600 kDa und ca. 300 kDa bestimmen. Diese Werte kommen

den errechneten Mw von TRPL-eGFP-Tetrameren (620 kDa) und Dimeren (310 kDa) sehr nahe. Das ermittelte Molekulargewicht der TRPL-eGFP Multimere legt nahe, dass TRPL-eGFP *in vivo* als Homotetramere und Homodimere vorliegen und mit keinem weiteren rhabdomerischen Protein eine stabile und permanente Interaktion eingehen.

4.3.3 Untersuchung der Wirkung der N- und C-Termini von TRPL auf die Assemblierung der Kanaluntereinheiten durch Expression von TRPL/TRP-Chimären in Photorezeptoren

Die Co-IP-Experimente mit epitop-markierten TRP und TRPL und die native Gelelektrophorese von TRPL-eGFP Multimeren legen nahe, dass TRP und TRPL überwiegend als Homomultimere vorliegen. Aus den Arbeiten von Xu und Mitarbeitern (Xu *et al*, 1998; Xu *et al*, 2000) geht hervor, dass dem N-Terminus und der Transmembranregion dieser Ionenkanäle bei der Multimer-Bildung eine wesentliche Bedeutung zukommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei eGFP-markierte TRP/ TRPL-Chimären konstruiert (Abb. 4.16). Entweder der C-Terminus, (Chimäre 1; As 1-674 des TRP und den As 681-1124 des TRPL) oder der N-Terminus (Chimäre 2; As 1-335 des TRPL und den As 328-1275 des TRP), oder beide Termini (Chimäre 3; As 1-335 des TRPL mit den As 328-1275 des TRP, und den As 681-1124 des TRPL, die Zahlen beziehen sich auf die Position im wildtypischen TRP bzw. TRPL-Protein) des TRP-Proteins wurden durch die entsprechende Region des TRPL-Proteins ersetzt. Alle drei chimären Proteine sind am C-Terminus eGFP-markiert. Die eGFP-Markierung diente als antigene Determinante für die Immunopräzipitation aus Proteinextrakten der transgenen Fliegen. Die Chimären 1 und 3 werden von α -TRPL-III-Antikörper erkannt, die Chimäre 2 wird von α -TRP-Antikörper erkannt (Daten nicht gezeigt, Antikörper siehe Material und Methoden).

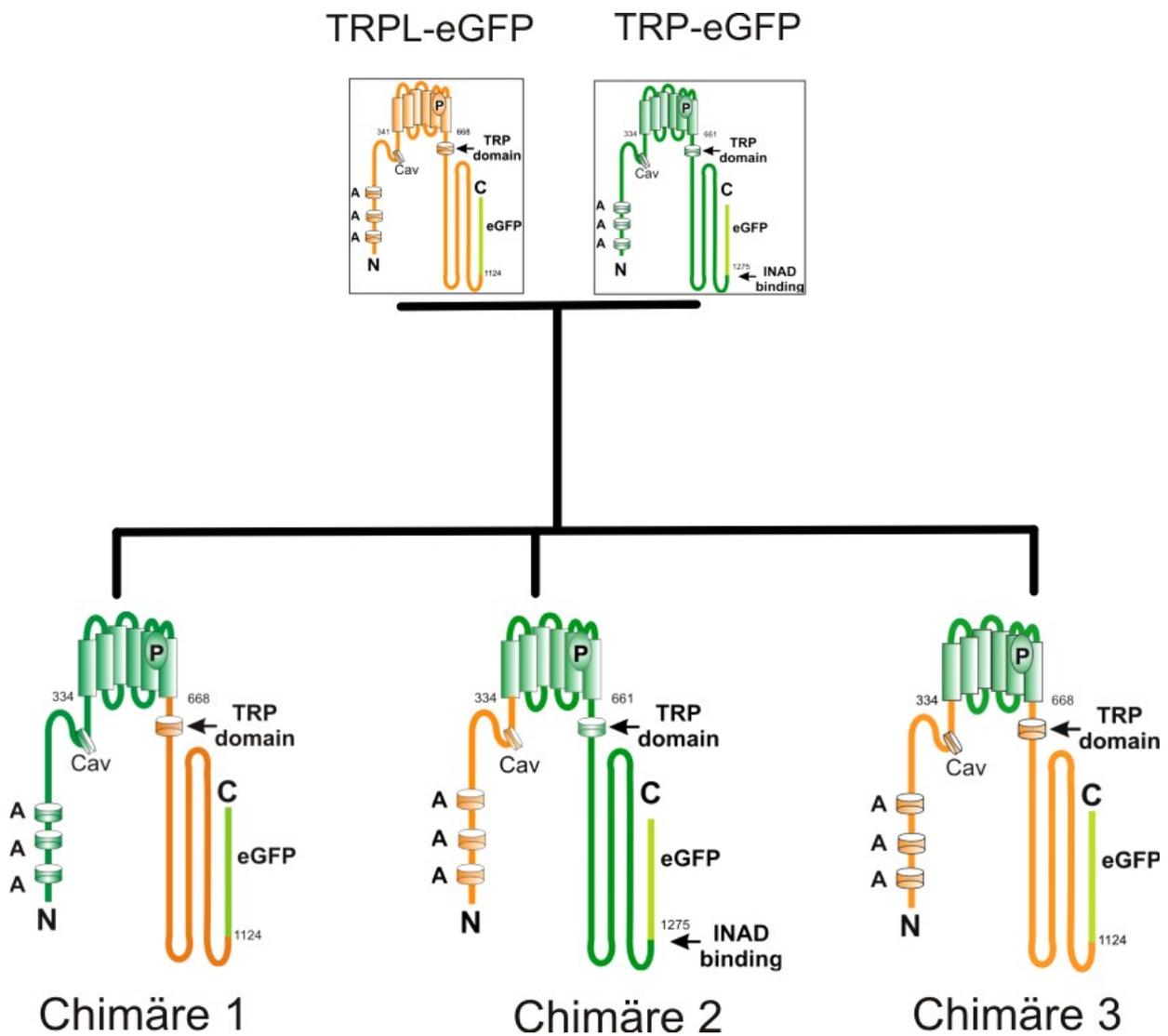


Abb. 4.16 Schematische Darstellung der Chimären-Fusionsproteine 1, 2 und 3 aus TRP und TRPL

N: N-Terminus; **A:** Ankyrin-Wiederholungen; **Cav:** Caveolinbindestelle; **P:** Porenregion; **C:** C-Terminus; **INAD-binding:** INAD- (InaD: “inactivation no after potential”)- Bindestelle; **eGFP;** TRP domain; **Grün:** Bereiche des TRP-Kanals, **Orange:** Bereiche des TRPL-Kanals; **Hellgrün:** eGFP. Die Zahlen geben die Position der Motive im TRP bzw. TRPL-Protein an.

4.3.3.1 Bestimmung der Bindungspartner von Chimäre 1, Chimäre 2 und Chimäre 3 mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen

Wie für TRP-eGFP und TRPL-eGFP wurden mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen die Bindungspartner der chimären TRP/TRPL-Fusionsproteine identifiziert. Die Fliegenlinien exprimierten je eines der chimären Proteine sowie endogenes TRP und TRPL. Das Fusionsprotein wurde durch einen monoklonalen α -GFP-Antikörper präzipitiert. Die co-präzipitierten TRP/TRPL-Untereinheiten wurden auf dem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Anhand der co-präzipitierten Proteine konnten für die Assemblierung der Multimere hinreichenden Domänen ermittelt werden.

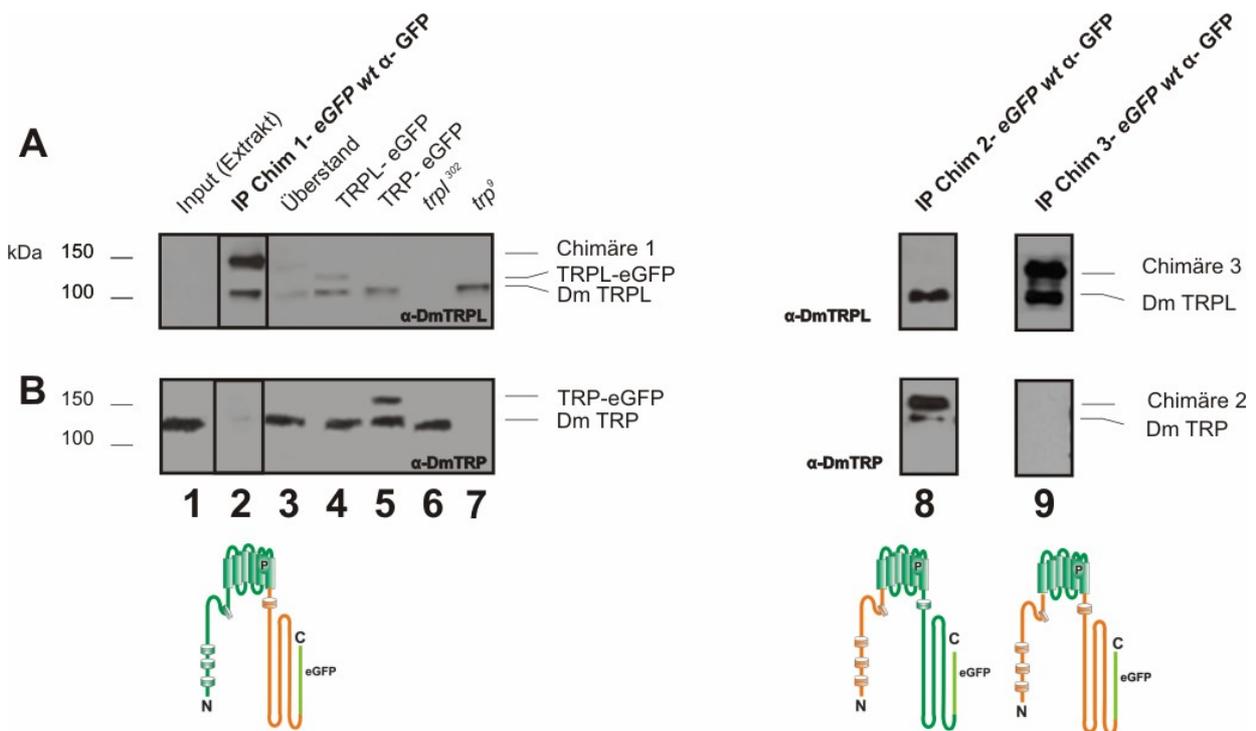


Abb. 4.17 Co-Immunopräzipitation der Bindungspartner der drei TRP/TRPL-Chimären (Spur 2, 8, 9) Proteinen durch einen α -GFP-Antikörper aus Köpfen transgener Fliegen. Alle chimären Proteine co-präzipitieren endogenes TRPL (Abb. A Spur 2, 8, 9). Die Chimäre 2 (Spur 8 A und B) co-präzipitiert endogenes TRP und TRPL.

Die Extraktion der Proteine erfolgte mit dem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP) und der α -GFP-Antikörper wurde an eine ProteinG-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: **Input:** Es wurde das Proteinextrakt aus 5 (A) bzw. 3 (B) *Drosophila*-Köpfen geladen. **IP (Präzipitat):** Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus den Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aus 500 *Drosophila*- Köpfen aufgetragen. **ÜS nach IP:** Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes aus 5 (A) bzw. 3 (B) *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation

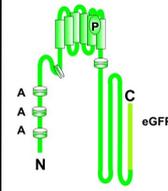
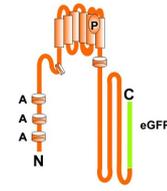
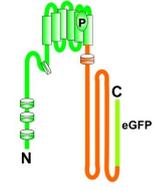
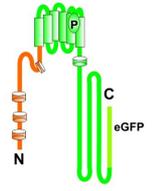
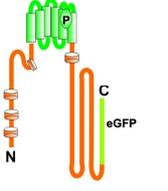
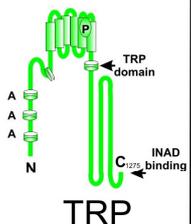
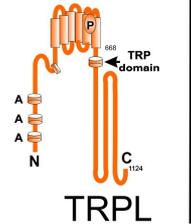
abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die mit α -DmTRPL (**A**) und α -DmTRP-Antikörpern (**B**) spezifisch nachgewiesenen Proteine dienen Proteinextrakte aus je 5 (**A**) bzw. 3 (**B**) *Drosophila*-Köpfen von TRPL-eGFP, TRP-eGFP, *trp*³⁰²- und *trp*⁹-Mutanten. Die Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt. Es handelt sich bei A und B um zwei verschiedene Blots.

Die Immunopräzipitation in Spur 2 (Abb. 4.17 A) zeigt, dass aus einem TritonX-100-Proteinextrakt der Köpfe von Chimäre 1 durch den verwendeten monoklonalen α -GFP-Antikörper zwei Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht präzipitiert wurden. Das größere Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa entspricht dem Chimäre1-Protein (theoretisch 156 kDa). Die Proteinbande mit ca. 100 kDa entspricht dem endogenen TRPL mit einem errechneten Molekulargewicht von 128 kDa. Bei dem Immunoblot mit dem α -DmTRP-Antikörper konnte in Spur 1 und 3 (Abb. 4.17 B) eine deutliche Bande an endogenem DmTRP (ca. 150 kDa, theoretisch 142 kDa) detektiert werden. In Spur 2 (Abb. 4.17 B) hingegen konnte im Vergleich zu den Spuren 1 und 3 (Extrakt aus je 3 *Drosophila*-Köpfen) nur eine sehr geringe Menge (Eluat aus 500 Köpfen) an endogenem TRP-Protein nachgewiesen werden. In Vorversuchen ließen sich mit dem monoklonalen α -GFP-Antikörper vergleichbare Mengen TRP aus Extrakten wildtypischer Fliegen präzipitieren. Da diese Fliegen kein eGFP exprimieren, ist die geringe Menge TRP im Präzipitat auf unspezifische Bindung des TRP an die ProteinG-beads zurückzuführen. Die Interaktion der Chimäre 1 mit endogenem TRPL (Abb. 4.17 C; Schema) zeigt, dass der C-Terminus des TRPL ausreicht, um die Interaktion mit endogenem TRPL-Protein zu vermitteln.

Aus dem Proteinextrakt der Köpfe von Chimäre 2-Fliegen konnten durch den α -GFP-Antikörper drei Proteine präzipitiert werden (Abb. 4.17 A und B, Spur 8). Das präzipitierte Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa entspricht endogenem TRPL, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 128 kDa hat. Mit einem α -TRP-Antikörper konnte neben dem Chimäre 2-Konstrukt bei ca. 170 kDa auch endogenes TRP (Abb. 4.17 B, Spur 8; 142 kDa) nachgewiesen werden. Mit Chimäre 2 co-präzipitiert somit sowohl endogenes TRPL als auch TRP (Abb. C, Schema). Der N-Terminus des TRPL ist wie der C-Terminus für die Wechselwirkung mit endogenem TRPL ausreichend. Die Chimäre 2 hat in 3 von 5 Versuchen geringe Mengen endogenes TRP co-präzipitiert (aus TritonX-100 und ultrazentrifugierten RIPA-Membranextrakten). Anhand dieses Experiments ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob die Chimäre 2 ein gemischtes Heteromer mit TRPL und TRP bildet, oder ob es sich um separate Komplexe von TRP und TRPL mit Chimäre 2 handelt. Die Chimäre 2 stimmt zu 89,1% mit dem TRP-eGFP überein. Dass die Chimäre 2 in erster Linie TRPL co-präzipitiert, zeigt, dass der N-Terminus des TRPL eine stärkere Affinität zu anderen TRPL-Untereinheiten hat als der C-Terminus und die Transmembranbereiche zu den TRP-Untereinheiten.

Durch den α -GFP-Antikörper konnte aus dem Proteinextrakt der Köpfe von Chimäre 3-Fliegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa und eines mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa präzipitiert werden (Abb. 4.17 A, Spur 9). Die Proteinbande bei ca. 150 kDa entspricht der Chimäre 3, welche ein errechnetes Molekulargewicht von 156 kDa hat; diejenige bei ca. 130 kDa entspricht TRPL. Die Abbildung 4.17 B Spur 9 zeigt, dass kein endogenes DmTRP (142 kDa) präzipitiert wurde. Wie nach den Co-IPs der Chimären 1 und 2 erwartet, interagiert Chimäre 3-eGFP nur mit TRPL.

Die vorliegenden Ergebnisse der Co-IP der chimären TRP/TRPL-Proteine sind unter Tab. 4.1 zusammengefasst. Sie zeigen, dass N- und C-Termini von TRPL mit großer Affinität die Homomultimerbildung von TRPL vermitteln. Dies erklärt hinreichend das Vorhandensein von TRPL/TRPL-eGFP-Multimeren bei 10fachem Überschuss an TRP-Untereinheiten. Diese Eigenschaft wird beim Austausch jedes einzelnen der TRP-Termini gegen einen der TRPL-Termini auf das Fusionsprotein übertragen. Aus diesen Experimenten geht ebenfalls hervor, dass die Transmembrandomänen nicht zur Auswahl der Interaktionspartner beitragen, da in allen Chimären die Transmembranbereiche von TRP stammen.

Wechselwirkung	TRP-eGFP	TRPL-eGFP	Chimäre 1	Chimäre 2	Chimäre 3
% Identität					
	+	-	-	+	-
83,6	47,1	68,4	89,1	58,4	
	-	+	+	+	+ +
30,8	81,7	75,8	57,7	87,7	

Tab. 4.1 N- und C-Termini des TRPL sind ausreichend, um Wechselwirkung mit dem endogenen Homologen zu vermitteln

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Co-IP der TRPL-eGFP und TRP-eGFP sowie der Chimären-Kanäle und die Ähnlichkeit der Kanäle zueinander in %-Identität. Die Gesamt-Identität zwischen den Kanälen lässt keine Vorhersage über ihr Multimerisierungsverhalten zu.

4.3.3.2 Deletionen in den N- und C-Termini des TRPL-eGFP verhindern den rhabdomerischen Transport der Fusionsproteine, aber nicht die Wechselwirkung mit endogenem TRPL

Die Co-IPs der chimären TRP/TRPL-Kanäle haben gezeigt, dass der N- und der C-Terminus **ausreichend** sind, um TRPL-Bindung zu vermitteln. Mit Deletionsvarianten des TRPL-eGFP-Kanals wurde zusätzlich untersucht, ob N- und C-Termini **notwendig** für die Homomultimerbildung sind. Für die Untersuchung der Motive, die an der Assemblierung oder Translokation des TRPL-Kanals beteiligt sind, wurden Regionen mit Homologie zu bekannten Sortiersignalen oder Domänen, die Protein-Protein-Wechselwirkung vermitteln, deletiert. Eine Gemeinsamkeit aller TRP-Kanäle ist die variable Anzahl von Ankyrin-Repeats im N-Terminus.

Anhand der veröffentlichten Ankyrin-Repeat-Konsensussequenz (Mosavi *et al.*, 2002) wurde die Lage der Ankyrin-Repeats in TRPL bestimmt.

Um den Einfluss der N- und C-Termini auf Assemblierung und Wanderung des TRPL zu untersuchen, wurden die in Abb. 4.18 dargestellten Deletionsvarianten in den Photorezeptorzellen von *Drosophila* exprimiert. Die Charakterisierung der Deletionsproteine erfolgte biochemisch, mikroskopisch und elektrophysiologisch. Im Gegensatz zu den beschriebenen chimären Proteinen erlaubt die Untersuchung von Deletionsvarianten die Eingrenzung von Motiven auf wenige Aminosäuren.

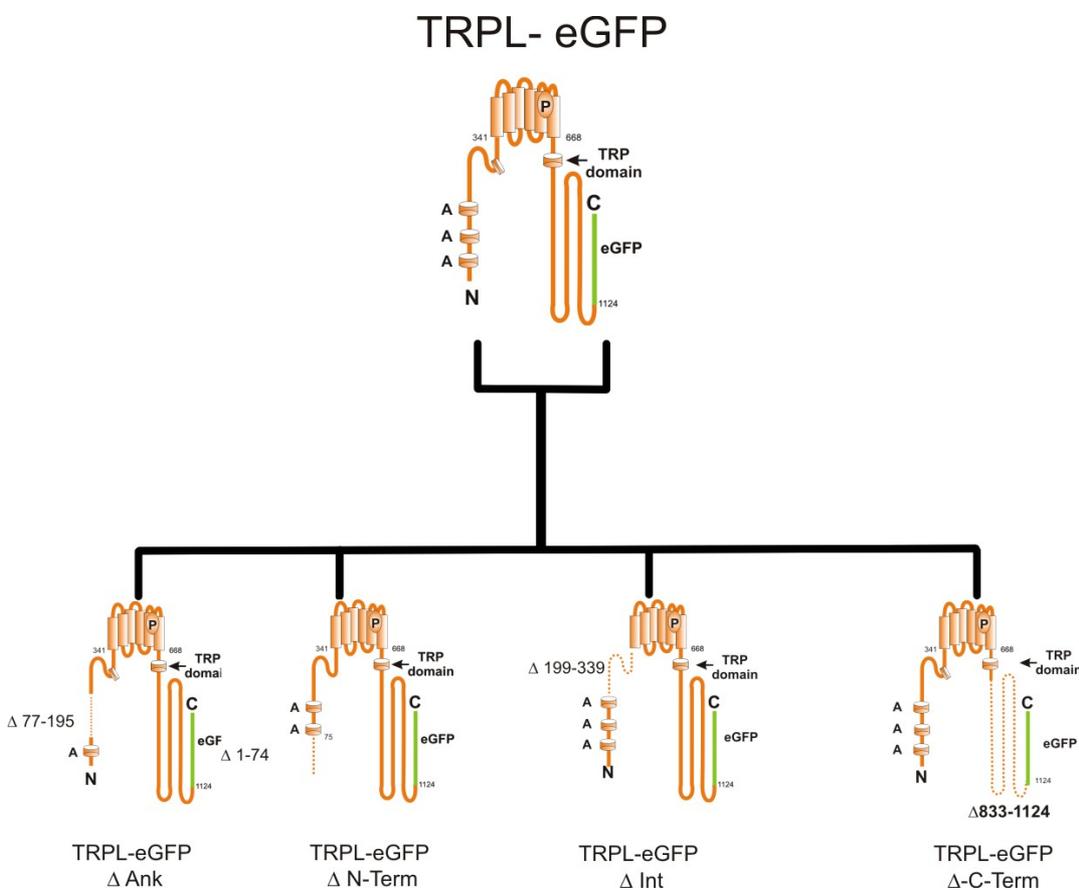


Abb. 4.18 Schematische Darstellung der TRPL-eGFP Deletionsvarianten :

N: N-Terminus; **A:** Ankyrin-Wiederholungen; **Cav:** Caveolinbindestelle; **P:** Porenregion; **C:** C-Terminus; **INAD-binding:** INAD-Bindestelle Die gepunkteten Linien geben den deletierten Bereich an.

Die Wasserimmersionsmikroskopie der Deletionsvarianten von TRPL-eGFP legte nahe, dass keines der Proteine in das Rhabdomer transportiert wurde (Abb. 4.18). Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Δ Ank/ Δ N/ Δ C/ Δ Int-Konstrukte (für Δ N und Δ Int

Daten nicht gezeigt) mittels ERG in den Retinae transgener Fliegen bestätigte die Vermutung, dass die Deletionsproteine nicht in das Rhabdomer transportiert wurden, oder, sofern geringe Mengen im Rhabdomer vorhanden waren, diese keine funktionierenden Kanäle bildeten. Alle Deletionsvarianten konnten anhand der eGFP-Fluoreszenz in einem cytoplasmatischen Kompartiment der Photorezeptorzellen nachgewiesen werden. Die Proteine waren ebenfalls auf Immunoblots mit Antikörpern gegen eGFP oder TRPL (ΔC -TRPL-eGFP, kann nur mit α -eGFP-Ak nachgewiesen werden, da die antigene Determinante des α -TRPL III-Ak deletiert ist) nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Anhand der mikroskopischen und biochemischen Daten war es nicht möglich zu unterscheiden, ob die Deletionsvarianten des TRPL nicht korrekt gefaltet sind oder ob Assemblierungs-/Transportprozesse betroffen sind.

Wie unter 4.2.3 erläutert wurde, ist Multimerisierung für die bisher untersuchten Kanäle eine Voraussetzung für den Transport in das Zielkompartiment. Dadurch ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob der Transport-Defekt eine Folge der Deletion einer Region ist, die für den Transport oder für die Assemblierung der Untereinheiten notwendig ist. Das Δ Ank- und ΔC -TRPL-eGFP wurde im Gegensatz zu dem $\Delta N/\Delta$ Int-TRPL-eGFP eingehender untersucht, weil für diese Konstrukte die Menge an rekombinantem Protein deutlich größer war.

4.4 Das ΔC -TRPL-eGFP Protein transloziert nicht in die Rhabdomere dunkeladaptierter Fliegen

Beim Deletionskonstrukt ΔC -TRPL-eGFP (Abb. 4.18) wurden die Aminosäuren 833 bis 1124 entfernt. In diesem Bereich befinden sich eine Calmodulin-Bindestelle (ab ca. As 850-900) und eine prolinreiche Region (As 1117-1120). Die Calmodulin-Bindestelle dient der Ca^{2+} -vermittelten Schließung des Kanals (Warr und Kelly, 1996; Scott *et al.*, 1997). Bei der prolinreichen Region könnte es sich um ein Sequenzmotiv handeln, das bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielt (Kay *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde durch die Deletion ein mögliches ER-Retentionsmotiv PKHR (As 1120-1123) entfernt. Durch die Deletion wird zusätzlich (ca. ab As 902 bis 919) eine mögliche coiled coil-Domäne entfernt (COILS:http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Coiled-coil-Domänen wurden als mögliche Assemblierungsmotive in zahlreichen TRP-Kanälen nachgewiesen (Tsuruda *et al.*, 2006).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der ΔC -TRPL-eGFP-Lokalisation zeigt, dass das Protein unabhängig von den Lichtbedingungen im intrazellulären Membrankompartiment angereichert ist (Abb. 4.19 A-D). Die Rhabdomere bleiben von der eGFP-Fluoreszenz ausgespart. Die Untersuchung von ΔC -TRPL-eGFP-Puppen zeigt, dass die TRPL-Variante zu keinem Entwicklungszeitpunkt nach Beginn der Expression rhabdomerisch lokalisiert ist. Die Verteilung des in den Zellkörpern der Photorezeptoren vorhandenen ΔC -TRPL-eGFP ist insbesondere im *wt*-Hintergrund oftmals inhomogen. (Abb. 4.19 F)

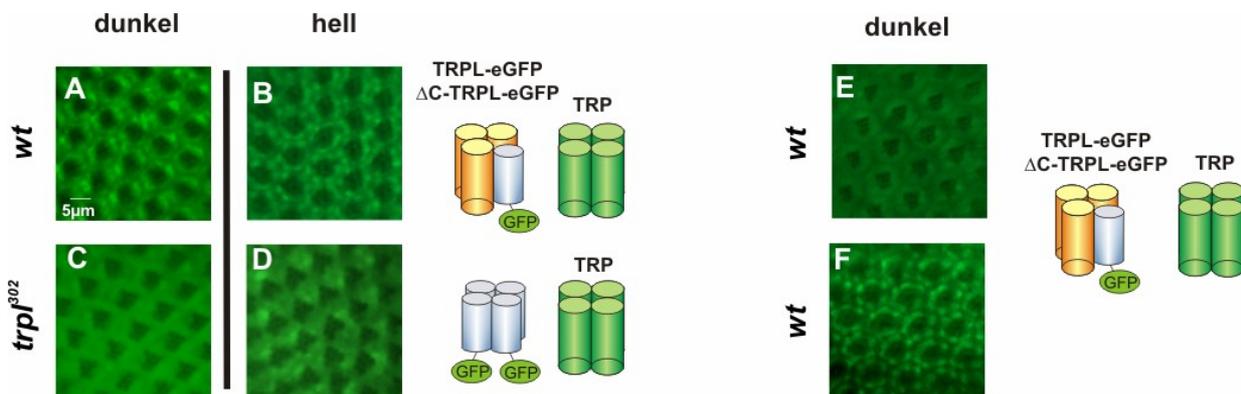


Abb. 4.19 ΔC -TRPL-eGFP ist in *wt* und *trpl³⁰²*-Mutanten nicht rhabdomerisch

Wasserimmersionsaufnahme ΔC -TRPL-eGFP-exprimierender *Drosophila*-Augen

A und B: ΔC -TRPL-eGFP im *wt*-Hintergrund hell- bzw. dunkeladaptiert.

C und D: ΔC -TRPL-eGFP in *trpl³⁰²*, hell- bzw. dunkeladaptiert.

E und F: ΔC -TRPL-eGFP-Lokalisation in 2 Puppen 0-24h vor dem Schlüpfen, dunkeladaptiert.

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den in A-F verwendeten Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden)

Blau: ΔC -TRPL-eGFP; **Orange:** TRPL, **Grün:** TRP-Tetramer.

4.4.1 Das ΔC -TRPL-eGFP Protein akkumuliert in einem intrazellulären Kompartiment und stört die Funktion endogener Kanäle

Die mikroskopische Untersuchung von ΔC -TRPL-eGFP in isolierten Ommatidien zeigt, dass das rekombinante Protein um die Kerne der Photorezeptorzellen (Abb. 4.20 oberer Pfeil in A; B) angereichert ist. In einzelnen Ommatidien ist die Verteilung des ΔC -TRPL-

eGFP nicht homogen über das Cytoplasma der Zellen verteilt, sondern bildet distinkte Strukturen (Abb. 4.20 A unterer Pfeil). Darüber hinaus zeigen Δ C-TRPL-eGFP exprimierende Fliegen vereinzelt deutliche Defekte im ERG (Abb. 4.20 C Fliege Nr. 5). Das mikroskopische Erscheinungsbild der Photorezeptorzellen spricht jedoch gegen eine starke Toxizität des Δ C-TRPL-eGFP.

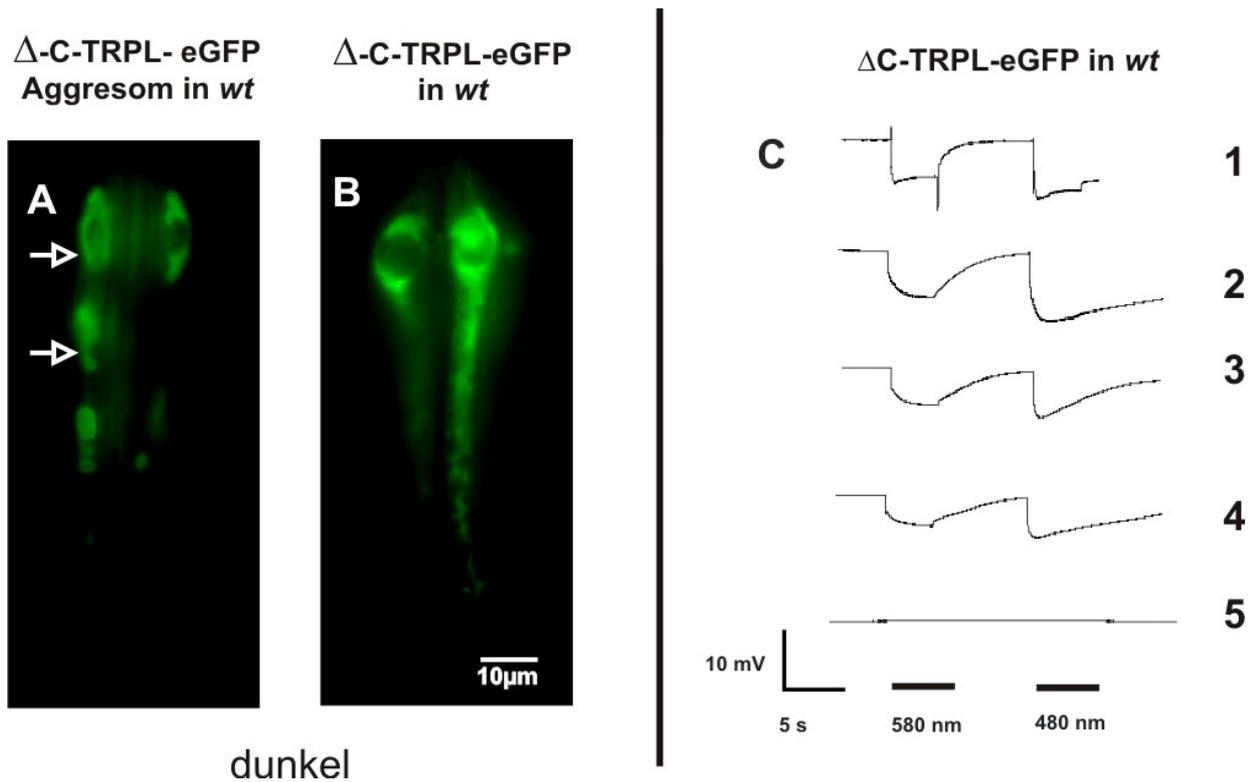


Abb. 4.20 Δ C-TRPL-eGFP bildet Aggregate im Cytoplasma der Photorezeptoren, die zu elektrophysiologischen Defekten in den Photorezeptoren führen
 Ölimmersionsaufnahmen von isolierten Ommatidien (in Hanks Medium 100x Ölimmersionsobjektiv). Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 15-20 Stunden dunkeladaptiert. eGFP-Fluoreszenz von Δ C-TRPL-eGFP; *wt* in den Photorezeptorzellen dunkeladaptierter, transgener Fliegen.
A und B: Zwei unterschiedliche Δ C-TRPL-eGFP exprimierende Photorezeptorzellen dunkeladaptiert. Das Fusionsprotein bildet Aggregate im Cytoplasma. Diese traten vermehrt um die Zellkerne der Photorezeptorzellen auf (**A**).
 Homogene Verteilung des Δ C-TRPL-eGFP im Cytoplasma eines Ommatidiums (**B**).
C: Elektroretinogramme 5 verschiedener Δ C-TRPL-eGFP exprimierender Fliegen. 1-5 zeigt Defekte zunehmender Ausprägung anhand des Verlustes der Fähigkeit auf einen Lichtreiz zu reagieren.

4.4.2 Expression zusätzlicher TRPL-Kanäle führt zum Anreicherung des ΔC -TRPL-eGFP Proteins in den Rhabdomeren dunkeladaptierter Fliegen

Heterolog exprimierte hTRPC1-Kanäle sind nicht in der Lage, autonom zur Plasmamembran zu translozieren. Die Untereinheiten akkumulieren im ER der Zellen. Bei zusätzlicher Expression von mTRPC4 β sind beide Proteine an der Plasmamembran lokalisiert. Die Translokation des TRPC β war nur durch gleichzeitige Expression von mTRPC4 β , nicht aber durch Co-Expression der verwandten hTRPC3-Untereinheiten zu erreichen. Ein vergleichbarer Effekt konnte für hTRPC6^{A131}-Kanäle erreicht werden, wenn diese zusammen mit TRPC3 oder TRPC6 exprimiert wurden (Hofmann *et al.*, 2002). Dieses Phänomen wurde als „Co-trafficking“ bezeichnet und in Verbindung mit biochemischen und elektrophysiologischen Daten als Hinweis für physische Wechselwirkung der Kanaluntereinheiten gedeutet (Hofmann *et al.*, 2002).

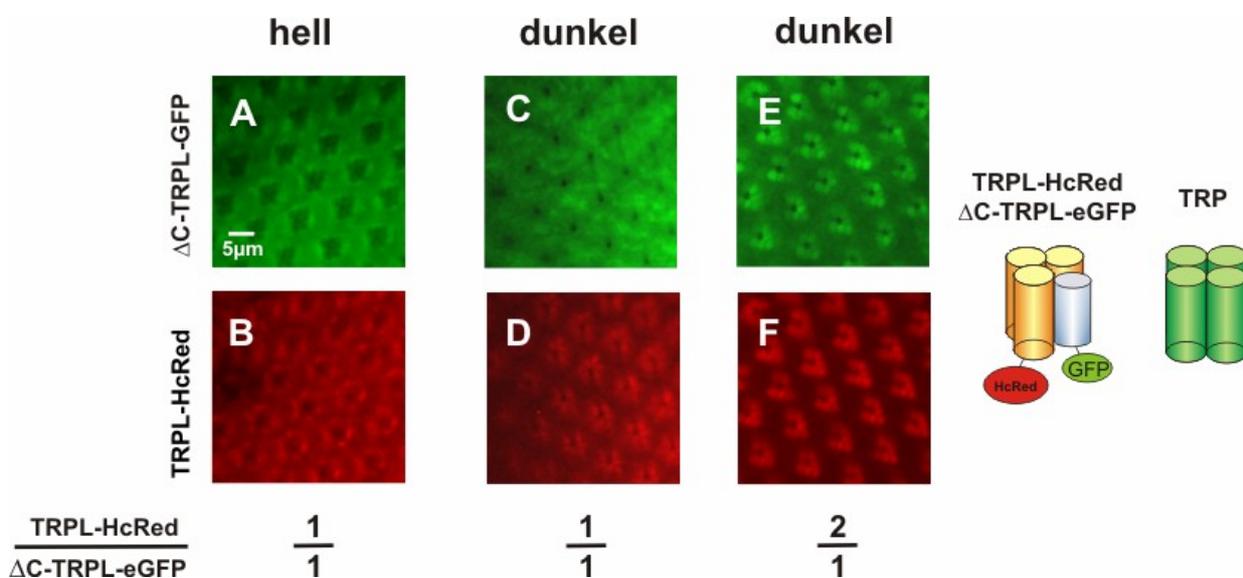


Abb. 4.21 Co-Expression von ΔC -TRPL-HcRedTRP/TRPL-eGFP in *Drosophila* Photorezeptorzellen. Die Fusionsproteine co-lokalisieren abhängig von der Kopienzahl des TRPL-HcRed-Transgens in den Rhabdomeren

Wasserimmersionsaufnahme ΔC -TRPL-eGFP, TRPL-HcRed co-exprimierender *Drosophila*-Retinae. In helladaptierten Fliegen ist das ΔC -TRPL-eGFP-Protein in einem intrazellulären Speicher-Kompartiment (A). In dunkeladaptierten Fliegen verteilt sich das ΔC -TRPL-eGFP-Protein auf die Rhabdomerischen und intrazellulären Kompartimente (C). Das TRPL-HcRed ist in dunkelaptierten Fliegen in den Rhabdomeren angereichert (B) und transloziert in helladaptierten Fliegen in ein intrazelluläres Speicherkompartiment (D). Die Expression zusätzlicher TRPL-HcRed Untereinheiten (E und F) führt zu deutlicher Co-Lokalisation des ΔC -TRPL-eGFP mit

TRPL-HcRed in den Rhabdomeren. Brüche unterhalb der Bilder geben das Verhältnis der Kopienzahl der TRPL-HcRed und Δ C-TRPL-eGFP-Transgene an-

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den A-F beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).

Blau: Δ C-TRPL-eGFP; **Orange:** TRPL-HcRed, **Grün:** TRP-Tetramer.

Obwohl Δ C-TRPL-eGFP-Untereinheiten in einem *wt*-Hintergrund nicht zum Rhabdomer transportiert werden, kann eine Anreicherung dieser Kanäle im Rhabdomer dunkeladaptierter Fliegen erreicht werden, wenn zusätzliche TRPL-HcRed Kanäle co-exprimiert werden (Abb. 4.21 A-F). In helladaptierten Fliegen sind TRPL-HcRed und Δ C-TRPL-eGFP nicht im Rhabdomer zu finden. Die Anreicherung von Δ C-TRPL-eGFP im Rhabdomer nimmt mit der Kopienzahl des TRPL-HcRed-Transgens zu (Abb. 4.21 E oben). Diese „Rettung“ des Transportdefektes ist somit von der Menge und dem wildtypischen Wanderungsverhalten des TRPL-HcRed abhängig. Die Co-Expression der anderen in Abb. 4.18 dargestellten TRPL-Deletionsvarianten mit TRPL-HcRed führte nicht zum „Co-trafficking“ dieser Untereinheiten an die Plasmamembran (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Δ C-TRPL-eGFP entweder nicht in der Lage Wechselwirkungen mit sich selbst einzugehen, oder die Deletion umfasst ein Sequenzmotiv, welches für den Transport notwendig ist. Um zu unterscheiden, ob es sich um einen Transport- oder Assemblierungsdefekt handelt, wurde zusätzlich eine IP des Δ C-TRPL-eGFP mit einem α -GFP-Antikörper durchgeführt. Die verwendeten Fliegen exprimierten neben dem Δ C-TRPL-eGFP endogenes TRP und TRPL-Protein. Das Δ C-TRPL-eGFP co-präzipitiert endogenes TRPL-Protein (Bande Abb. 4.22 A, das von α -TRPL-III-Ak erkannte Epitop ist im Δ C-TRPL-eGFP nicht vorhanden).

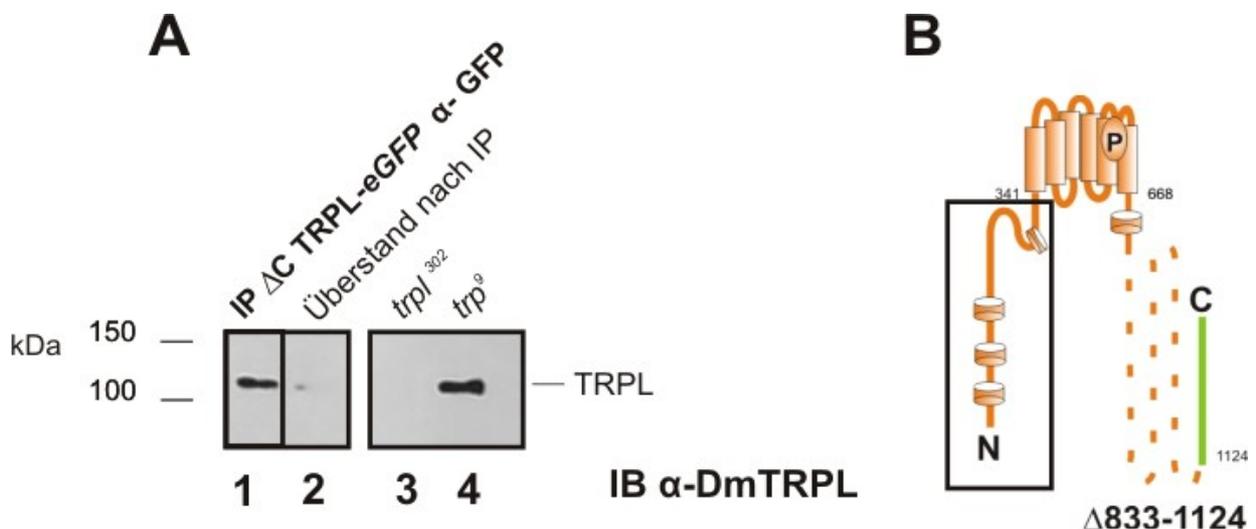


Abb. 4.22 Co-Immunopräzipitation von Proteinen aus Köpfen einer ΔC -TRPL-eGFP exprimierenden Fliegenlinie in *wt*-Hintergrund durch einen α -GFP-Antikörper (A) sowie schematische Darstellung des ΔC -TRPL-eGFP Proteins (B): endogenes TRPL wird co-präzipitiert, der N-Terminus und die TM-Region des TRPL sind ausreichend, um *in vivo* endogenes TRPL zu binden.

Die Extraktion der Proteine erfolgte mit dem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP) und der α -GFP-Antikörper wurde an eine ProteinG-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: Input: Es wurde das Proteinextrakt aus 5 *Drosophila*-Köpfen geladen. IP (Präzipitat): Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus den Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aus 500 *Drosophila*-Köpfen aufgetragen. Überstand nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes aus 5 *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die mit α -DmTRPL-Antikörpern spezifisch nachgewiesenen Proteine dienen Proteinextrakte aus je 5 *Drosophila*-Köpfen von TRPL-eGFP, TRP-eGFP, *trpl*³⁰²- und *trp*⁹-Mutanten. Die Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt.

ΔC -TRPL-eGFP wird lichtabhängig mit TRPL-HcRed in die Rhabdomere co-transportiert. Die Effektivität des Co-Transportes ist proportional zur Menge an verfügbaren TRPL-HcRed. Die Voraussetzung für die Wechselwirkung mit TRPL-HcRed ist, dass das ΔC -TRPL-eGFP gefaltet vorliegt. Die Co-IP des TRPL mit ΔC -TRPL-eGFP zeigt, dass der intakte N-Terminus in Verbindung mit der Transmembranregion des TRPL für die Wechselwirkung der Untereinheiten ausreichend und der C-Terminus nicht notwendig ist.

Die Licht- und Dosisabhängigkeit des Co-Transportes legen nahe, dass ΔC -TRPL-eGFP mit TRPL-HcRed als Heteromer transportiert wird. Dieser Phänotyp deutet auf die Deletion eines Motivs hin, das für den TRPL-Transport und nicht für die Assemblierung notwendig ist. Die Menge an endogenem TRPL-Protein ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um den Import in das Rhabdomer zu vermitteln. Obwohl das endogene TRP-Protein in 10fach höherer

Konzentration vorliegt als TRPL, wird Δ C-TRPL-eGFP nur in Verbindung mit zusätzlichem TRPL-HcRed in das Rhabdomer transportiert. Wie die Immunopräzipitations-Experimente der Chimäre 2 sprechen diese Beobachtungen für Wechselwirkung der TRPL-Untereinheiten im N-Terminus. Die Bildung von Δ C-TRPL-eGFP-Aggregaten legt nahe, dass die deletierte Region auch ein oder mehrere Motive, für den Abbau des TRPL, enthält. Das Co-trafficking des Δ C-TRPL-eGFP durch TRPL-HcRed ist ein Hinweis auf die Assemblierung der Kanal-Untereinheiten zu Multimeren im intrazellulären Kompartiment.

4.5 Δ Ank-TRPL-eGFP wird nicht in das Rhabdomer transportiert und stört die Funktion endogener TRPL-Untereinheiten

Die Beteiligung der Ankyrin-Repeats an der Assemblierung von TRP-Kanälen wurde für humane TRPV6 (Erlor *et al.*, 2004) TRPV1 (Hellwig *et al.*, 2006) und mTRP1 β -Kanäle (Engeleke *et al.*, 2002). gezeigt. TRPV6-Untereinheiten mit einer Deletion im dritten Ank-Repeat bilden keine funktionalen Kanäle. Die Eigenschaft der Ank3 Region, homophile Bindungen mit TRPV N-Termini zu fördern, konnte auch anhand chimärer Proteine aus Ank3/Ank4 und einer Calcium-Kanal γ 1-Untereinheit gezeigt werden (Erlor *et al.*, 2004).

Beim Δ Ank-TRPL-eGFP-Deletionskonstrukt (Abb. 4.18) wurden die den Aminosäuren 76 bis 196 entsprechenden Basen entfernt. In diesen Bereich liegen zwei Ankyrin-Repeats (Abb. 4.23 B). Die Ankyrin-Wiederholungen wurden durch den Vergleich mit der Konsensussequenz der Ankyrin-Repeats von Mosavi *et al.* 2002 ermittelt (siehe Abb. 4.22 und Abb. 4.23 B). Die 3 Bereiche größter Übereinstimmung zwischen dem N-Terminus des TRPL und der Konsensussequenz für Ankyrin-Repeats wurden als Ankyrin-Repeats gedeutet. Diese erwiesen sich in Homologievergleichen mit der Konsensussequenz als am stärksten konserviert (siehe Abb. 4.22).

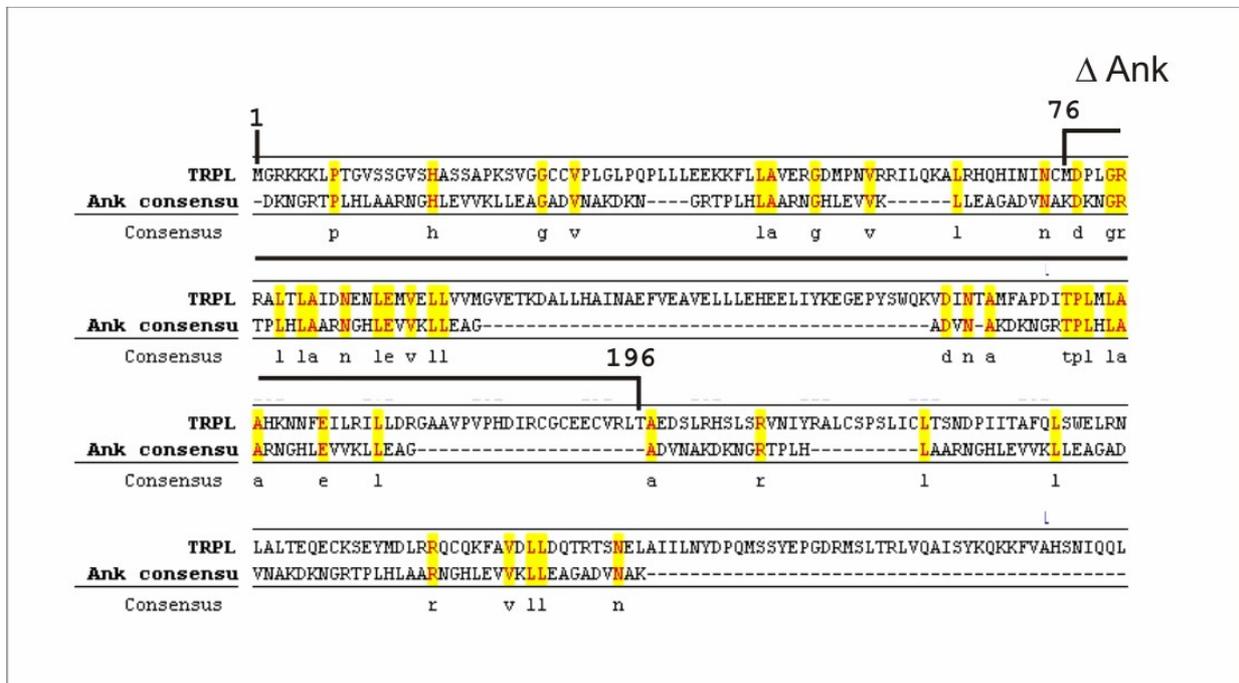


Abb. 4.22 **Alignment des TRPL-N-Terminus gegen die Konsensussequenz des Ankyrin-Repeats**

Folgende Bereiche/Motive sind gezeigt: Schwarzer Balken entspricht der deletierten Region. Zahlen geben die Aminosäureposition in TRPL an. Der gezeigte Ausschnitt der TRPL-Sequenz entspricht den ersten 275 Aminosäuren des N-Terminus. Gelbe Kästen geben identische Aminosäuren in der betreffenden Position an. Das Alignment wurde mit dem Sequenzanalyse Programm Jellyfish (LabVelocity) unter Verwendung der Gonnet-Matrix mit Standard Parametern verwendet. Die Konsensussequenz für ein Ankyrin-Repeat (Mosavi *et al.*, 2002) wurde fünfmal aneinander gefügt, um das Auffinden mehrerer Ankyrin-Repeats im TRPL-N-Terminus zu ermöglichen.

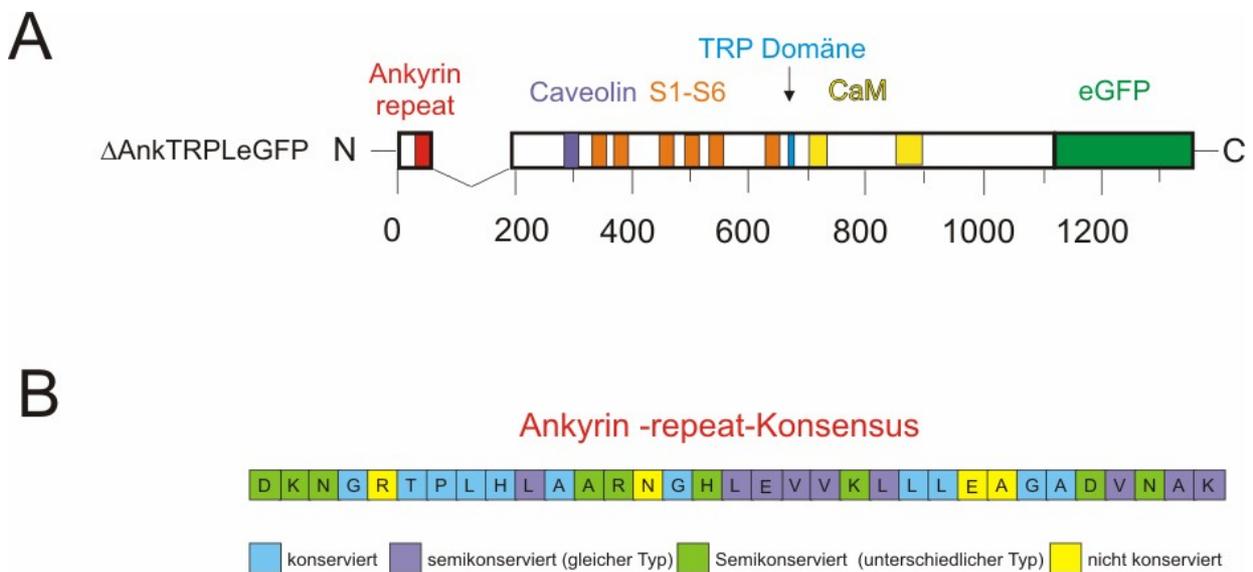


Abb. 4.23 A Maßstabgetreue Abbildung des Δ -Ank-TRPL-eGFP

Folgende Bereiche/Motive sind gezeigt: **N**: N-Terminus; **C**: C-Terminus; Ankyrin-repeat mit angrenzender Deletion; **Cav**: mögliche Caveolinbindestelle; S1-S6-Transmembrandomänen, TRP-Domäne, CaM-Calmodulinbindungsstellen; eGFP-Fusion an C-Terminus

B, Konsensussequenz der Ankyrin-Wiederholungen (verändert nach Mosavi *et al.*, 2002)

Konsensussequenz der Ankyrin-Wiederholungen dargestellt im Ein-Buchstaben-Aminosäurecode. Die Farbe der Kästchen gibt die durchschnittliche Häufigkeit der Aminosäurereste an der bezeichneten Position im Ankyrin-Repeat an. Positionen, die in über 50% der Fälle mit einer bestimmten einer Aminosäure belegt sind, werden als **konserviert** bezeichnet. Positionen, bei denen zwei Aminosäurereste gehäuft vorkommen, werden als **semikonserviert vom gleichen Typ** oder **semikonserviert unterschiedlichen Typs** bezeichnet, abhängig davon, ob die möglichen Aminosäuren gleiche physikalische Eigenschaften haben oder nicht. Die häufigste Aminosäure wurde eingetragen. Positionen ohne Präferenz für eine Aminosäure wurden als **nicht konserviert** bezeichnet.

4.5.1 Das Δ Ank-TRPL-eGFP Protein transloziert nicht in die Rhabdomere dunkeladaptierter Fliegen

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Δ Ank-TRPL-eGFP-Lokalisation zeigt, dass das Protein unabhängig von den Lichtbedingungen im intrazellulären Membrankompartiment angereichert ist (Abb. 4.24 A-B, C-D). Die Rhabdomere bleiben wie schon für das Δ C-TRPL-eGFP von der eGFP-Fluoreszenz ausgespart. Die intrazelluläre Verteilung der rekombinanten Proteine erscheint homogener als die Verteilung des Δ C-TRPL-eGFP.

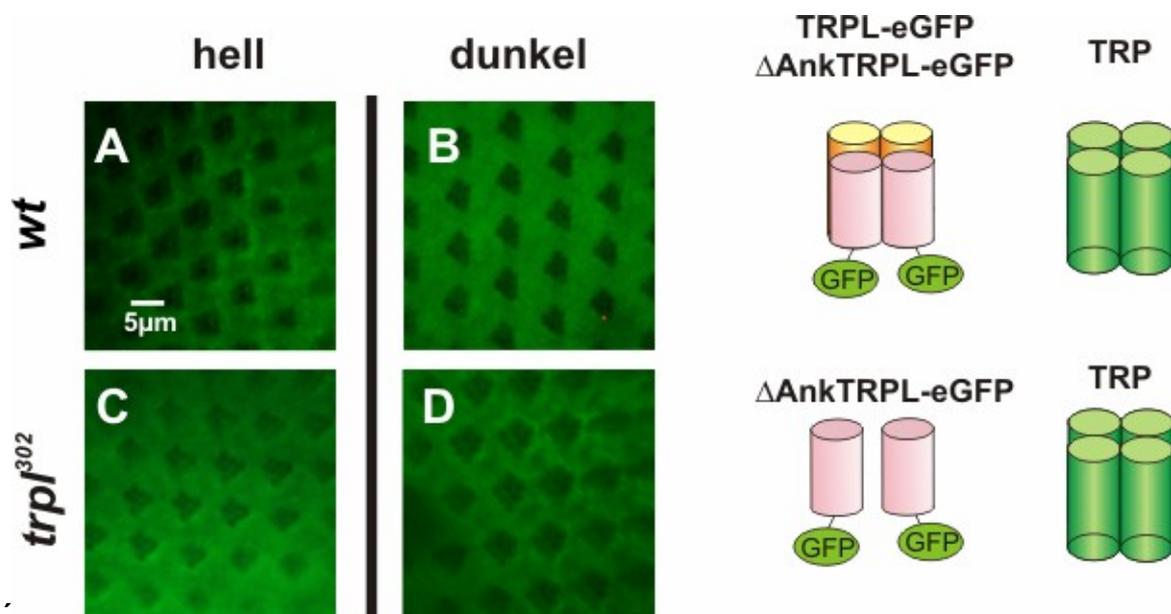


Abb. 4.24 **Ank-TRPL-eGFP ist in *wt* und *trpl*³⁰²-Mutanten nicht rhabdomerisch**
 Wasserimmersionsaufnahme Δ Ank-TRPL-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen
A und B: Δ Ank-TRPL-eGFP im *wt*-Hintergrund hell- bzw. dunkeladaptiert.
C und D: Δ C-TRPL-eGFP in *trpl*³⁰², hell- bzw. dunkeladaptiert.
Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPL-Kanäle in den A-D beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).
Rosa: Δ Ank-TRPL-eGFP-Monomere; **Orange:** TRPL-Monomer

4.5.2 Endogene TRPL-Untereinheiten co-präzipitieren mit Δ Ank-TRPL-eGFP

Wie bereits zuvor für das Δ C-TRPL-eGFP diskutiert wurde, kann die Ursache für die intrazelluläre Anreicherung des Δ Ank-TRPL-eGFP entweder im Verlust der Fähigkeit zur Multimerisierung, oder in der Deletion eines Transportmotivs liegen. Zur Unterscheidung der beiden Möglichkeiten wurde eine IP des Δ Ank-TRPL-eGFP mit einem α -GFP-Ak durchgeführt. Die verwendeten Fliegen exprimierten neben dem Δ Ank-TRPL-eGFP endogenes TRP und TRPL-Protein. Das Δ Ank-TRPL-eGFP co-präzipitiert endogenes TRPL (Abb. 4.25).

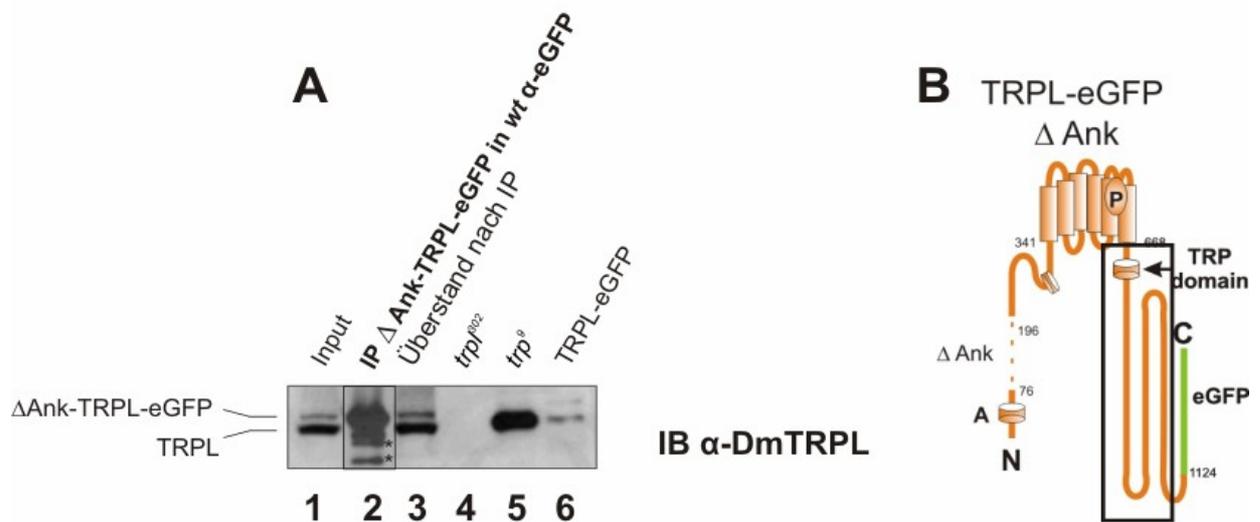


Abb. 4.25 Co-Immunopräzipitation von Proteinen aus Köpfen einer Δ Ank-TRPL-eGFP exprimierenden Fliegenlinie in *wt*-Hintergrund durch einen α -GFP-Antikörper (A) sowie schematische Darstellung des Δ Ank-TRPL-eGFP Proteins (B): endogenes TRPL wird co-präzipitiert, der C-Terminus und die TM-Region des TRPL sind ausreichend, um *in vivo* endogenes TRPL zu binden.

Die Extraktion der Proteine erfolgte aus Köpfen von Δ Ank-TRPL-eGFP mit dem TritonX-100-Extraktionspuffer (TXEP) und der α -GFP-Antikörper wurde an eine ProteinG-Matrix gebunden. Folgende Proben sind dargestellt: Input: Es wurde das Proteinextrakt aus 5 *Drosophila*-Köpfen geladen. IP (Präzipitat) Δ Ank-TRPL-eGFP/TRPL unspezifische Banden sind durch schwarze Sterne gekennzeichnet. Die mit Antikörpern gekoppelte Matrix wurde mit dem Proteinextrakt aus den Köpfen inkubiert. Es wurde das gesamte Eluat aus 500 *Drosophila*-Köpfen aufgetragen. ÜS nach IP: Es wurde ein Aliquot des Proteinextraktes aus *Drosophila*-Köpfen nach der Präzipitation abgenommen und auf das Gel geladen. Als Kontrolle für die mit α -DmTRPL-Antikörpern spezifisch nachgewiesenen Proteine dienten Proteinextrakte aus je 5 *Drosophila*-Köpfen von TRPL-eGFP (Spur 6), und *trpl*³⁰² (Spur 4) *trp*⁹-Mutanten (Spur 5). Die Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt.

4.5.3 Δ Ank-TRPL-eGFP bildet keine funktionalen Kanäle und stört die Kanalfunktion endogener TRPL-Untereinheiten in *wt*-Photorezeptoren

Die elektrophysiologische Untersuchung des Δ Ank-TRPL-eGFP Proteins erfolgte in der *trp/trpl*-Doppelmutante und in *wt*-Fliegen. Eine von zehn *wt*-Fliegen, die zusätzlich das Δ Ank-TRPL-eGFP exprimierten, zeigte Defekte, die für den Phänotyp des amorphen *trpl*³⁰²-Allels typisch sind (Beschreibung des *trpl*³⁰² siehe Abb. 4.30). In etwa 8 von 10 Fällen wurden entweder Oszillationen während der Depolarisation beobachtet, oder Veränderungen der „on“- und „off“-Transienten zu Beginn und zum Ende der Stimulation (Abb. 4.26). In einigen Fällen fehlte der „on“-Transient völlig. Zusätzliches Einbringen **zweier weiterer Kopien** des Δ Ank-Transgens erhöhte den Anteil der Fliegen mit Oszillationen und fehlenden „on“-Transienten auf 5 von 5 untersuchten Fliegen. Dieser dominant-negative Einfluss des Δ Ank-TRPL-eGFP auf endogene TRPL-Kanäle ist in Verbindung mit dem Wanderungsdefekt ein möglicher Hinweis auf die Retention der endogenen TRPL-Kanäle durch Wechselwirkung mit Δ Ank-TRPL-eGFP. Die Expression von Δ Ank-TRPL-eGFP-Untereinheiten in *trpl*³⁰² *trp*⁹-Doppelmutanten zeigen, dass die mutanten Untereinheiten allein keine funktionellen Kanäle bilden (Abb. 4.26, unteres ERG).

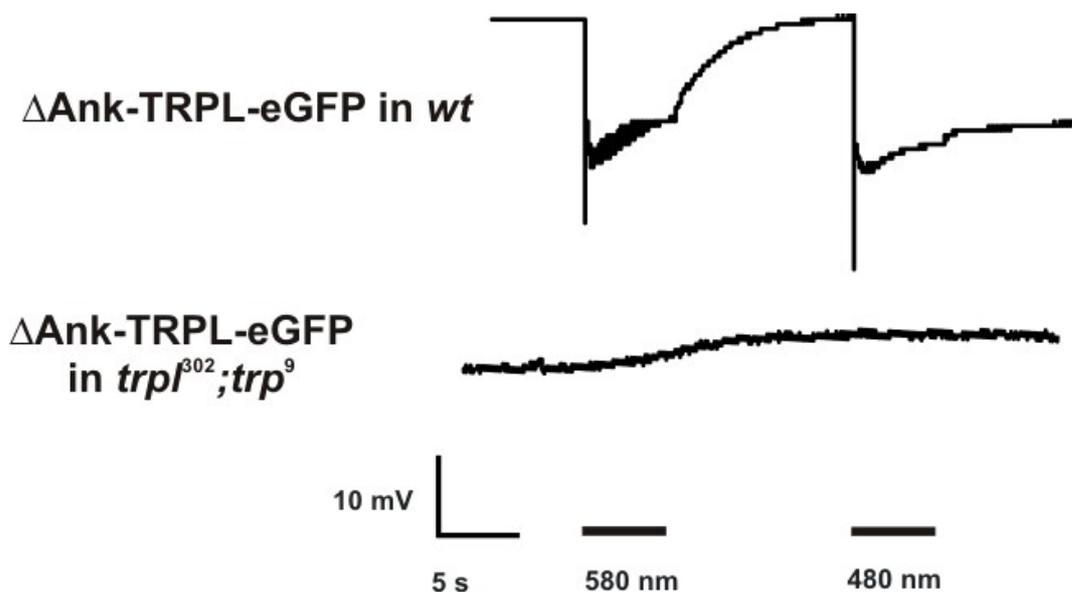


Abb. 4.26 Elektroretinogramm Δ Ank-TRPL-eGFP exprimierender Fliegen im *wt* und in der *trpl*³⁰², *trp*⁹-Doppelmutante: Δ Ank-TRPL-eGFP-Expression in *wt*-Fliegen phänokopiert den *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyp

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlängen der verwendeten Stimuli waren 580nm bzw. 480 nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min.

dunkeladaptiert. Das ERG der wildtypischen Δ Ank-TRPL-eGFP-Fliege zeigt Charakteristika des *trpl*³⁰² Phänotyps. Zu Beginn des Stimulus fehlt der „on“-Transient, der die Antwort von Neuronen im 1. optischen Ganglion (Lamina) darstellt. Das ERG mit einem 5s-Orangelicht-Stimulus erreicht ein „steady-state“ und zeigt Oszillationen, die typisch für den *trpl*³⁰²-Phänotyp sind.

Die Abhängigkeit des dominant-negativen Effektes auf endogene TRPL-Kanäle von der Kopienzahl des Δ Ank-TRPL-eGFP legt nahe, dass die endogenen Kanaluntereinheiten von den nicht translozierenden Untereinheiten im intrazellulären Kompartiment zurückgehalten werden. Keine der ERG-Messungen lieferte einen Hinweis auf eine Beeinflussung des TRP durch Δ Ank-TRPL-eGFP. Die Co-Präzipitation von TRPL mit der Chimäre 1 und der dominant-negative Effekt des Δ -Ank-TRPL-eGFP auf TRPL zeigen, dass Domänen für die Wechselwirkung der TRPL-Untereinheiten auch im C-Terminus lokalisiert sind. Die Retention endogener TRPL-Untereinheiten durch Δ -Ank-TRPL-eGFP legt nahe, dass die Assemblierung der Kanal-Multimere im intrazellulären Kompartiment stattfindet.

4.6 TRPL-eGFP benötigt TRP-vermittelten Calciumeinstrom, um in helladaptierten Fliegen das Rhabdomer verlassen zu können

Um zu klären, ob die Funktion des TRP als Ankerprotein oder ob seine Funktion als Calciumkanal für die Translokation des TRPL entscheidend ist, wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem *trp⁹*-Allel das *trp¹⁴*-Allel untersucht. Das kürzlich in einem EMS-Mutagenese-Screen identifizierte *trp¹⁴*-Allel (Wang *et al.*, 2006) bildet Kationenkanäle mit korrekter Verankerung des Transduktionskomplexes in der mikrovillären Membran. Die Mutation in der Nachbarschaft der TRP-Domäne führt zum Verlust der Ca²⁺-Selektivität des Kanals (Wang *et al.*, 2006). Diese TRP-Variante bietet somit die Möglichkeit, den Einfluss der TRP-Funktion auf TRPL-Wanderung zu untersuchen, ohne die Retention des Transduktionskomplexes zu stören.

Wie in Abb. 4.27 gezeigt wird, befindet sich das TRPL-eGFP Protein sowohl in Fliegen ohne TRP als auch in Fliegen, die die TRP¹⁴-Variante im dunkel- und helladaptierten Zustand im Rhabdomer exprimieren (Abb. 4.27 A, B). Der Transport des TRPL-eGFP in das Rhabdomer wird durch das Fehlen des TRP-Proteins oder durch den Verlust der Calcium-Selektivität nicht beeinflusst (Abb. 4.27 B, D). Der Rücktransport des TRPL-eGFP in das intrazelluläre Speicherkompartiment ist in der *trp¹⁴*- und der *trp⁹*-Mutante in gleicher Weise beeinträchtigt (vgl. Abb. 4.27 A/ A' mit C).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass es sich bei dem Transport des TRPL-eGFP in das intrazelluläre Speicherkompartiment um einen Calcium-abhängigen Prozess handelt.

Der Export-Defekt des TRPL-eGFP in der *trp⁹*-Mutante ist nicht die Folge der fehlerhaften Verankerung des Transduktionskomplexes. Die Ursache für das Verbleiben von TRPL-eGFP im Rhabdomer ist eine Folge des fehlenden Ca²⁺-Einstroms während des Rezeptorpotenzials.

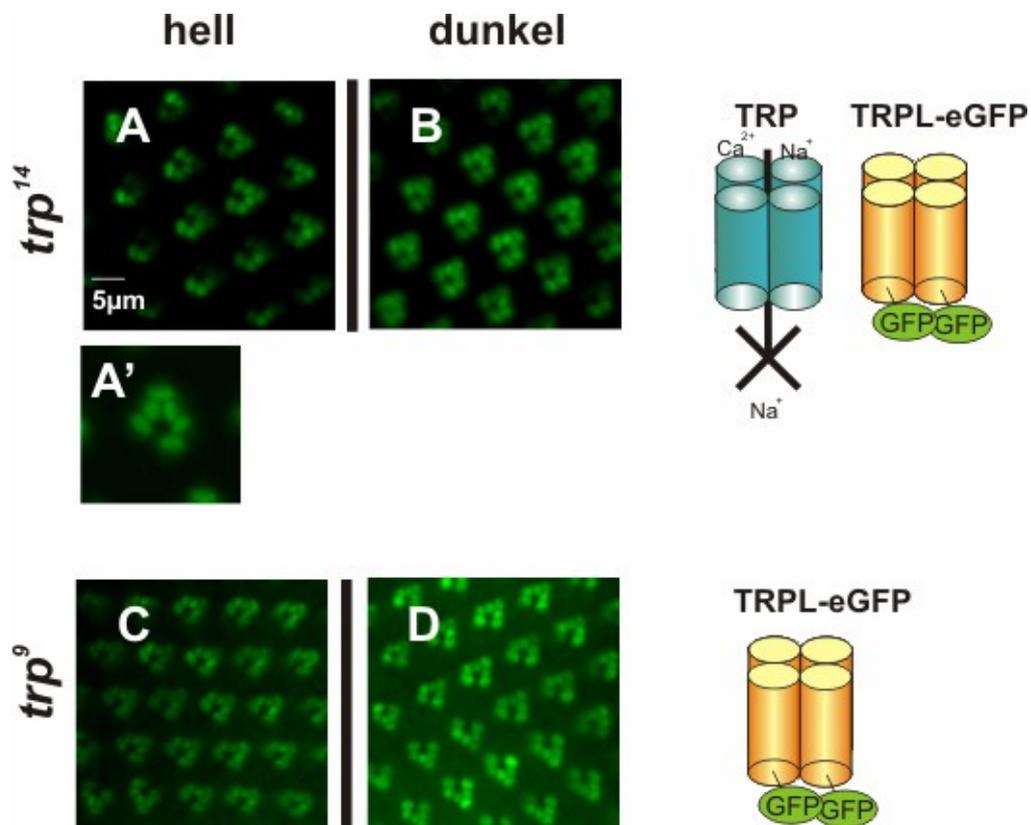


Abb. 4.27 Der Export von TRPL-eGFP aus dem Rhabdomer ist in der *trp¹⁴* und *trp⁹*-Mutante gestört.

Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen

A und B: TRP-eGFP im *trp¹⁴*-Hintergrund hell- bzw. dunkeladaptiert (A': Vergrößerung der Rhabdomere eines Ommatidiums aus A).

C und D: TRP-eGFP in *trp⁹*, hell- bzw. dunkeladaptiert.

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den in A-D beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).

Grün: TRP-Multimer, **Hellblau:** TRP¹⁴-Multimer; **Orange:** TRPL-Multimer.

4.6.1 Untersuchungen der TRPL-Translokation bei TRP-unabhängiger Manipulation der Calciumkonzentration in Photorezeptoren

Um weitere Beweise für die Calcium-Abhängigkeit der TRPL-Internalisierung zu erbringen, wurde die Calcium-Menge in den Photorezeptorzellen TRP-unabhängig *in vivo* verändert. Hierzu wurde die $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Pumpe CalX überexprimiert, bzw. das TRPL-eGFP Verhalten in der hypomorphen *calx^B*-Allel untersucht. Bei der Öffnung der TRP-Kanäle als Antwort auf den Lichtreiz strömen Natrium- und Calcium-Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Rezeptorzellen. Die $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Pumpe CalX entfernt nach dem Ende des Lichtreizes die Calcium-Ionen aus den Photorezeptoren (Schwarz und Benzer, 1997). Es wurden drei $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Pumpen in *Drosophila* beschrieben, CalX sowie die kaliumabhängigen NCKX30C- und NCKX-X-Pumpen. (Hryshko *et al.*, 1996; Ruknudin *et al.*, 1997; Schwarz und Benzer, 1997; Winkfein *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). Die CalX und NCKX30C-Expression wurde in den Augen adulter *Drosophilae* nachgewiesen (Schwarz and Benzer, 1997; Haug-Collet, Wang *et al.*, 2005).

4.6.2 Verringerung des Calcium-Gehaltes der Photorezeptoren durch Überexpression des CalX-Proteins imitiert den Transport-Defekt von TRPL-eGFP in *trp⁹*-und *trp¹⁴*-Mutanten

Die Überexpression des CalX-Proteins in *Drosophila*-Photorezeptoren führt zur Verringerung des Calcium-Gehaltes (Wang *et al.*, 2006). Ergänzend zu den Versuchen mit dem *trp¹⁴*-Allel sollte die Wirkung der intrazellulären Calciums-Konzentration auf die Internalisierung des TRPL-eGFP aus den Rhabdomeren untersucht werden. Es wurden eine bzw. zwei Kopien eines CalX-Transgens unter der Kontrolle des Rh1-(*ninaE*)-Promotors mit TRPL-eGFP co-exprimiert (Abb. 4.28 A-C). In Photorezeptoren, die nur eine Kopie des CalX-Transgens exprimieren, wird TRPL-eGFP in lichtadaptierten Fliegen in das intrazelluläre Speicherkompartiment transportiert (Abb. 4.28 A, B). Hingegen ist TRPL-eGFP in Photorezeptorzellen, die zwei Kopien des CalX-Transgens exprimieren, unabhängig von den Lichtbedingungen in den Rhabdomeren lokalisiert (Abb. 4.28 C, D). Die Verringerung der Calcium-Konzentration in Photorezeptoren durch die Überexpression der $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Pumpe CalX unterdrückt den Transport des TRPL-eGFP in das intrazelluläre Speicherkompartiment.

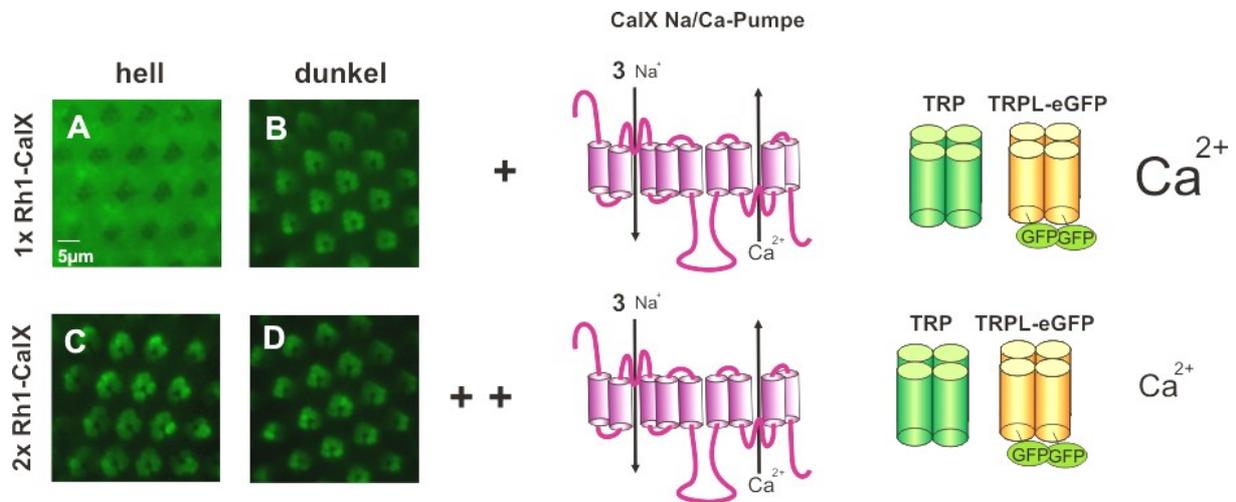


Abb. 4.28 Verringerung der Calcium-Konzentration in Photorezeptoren durch erzwungenen Calcium-Export. TRPL-eGFP bleibt im Rhabdomer hell- und dunkeladaptierter Fliegen bei ektopischer Expression von zwei Kopien eines CaIX-Transgens.

Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen

A und B: TRPL-eGFP, Co-Expression einer Kopie des CaIX-Transgens unter Kontrolle des Rh1-Promotors, hell- bzw. dunkeladaptiert.

C und D: TRPL-eGFP, Co-Expression zweier Kopien des CaIX-Transgens unter Kontrolle des Rh1-Promotors, hell- bzw. dunkeladaptiert. TRPL-eGFP ist in hell- und dunkeladaptierten Fliegen in den Rhabdomeren.

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten CaIX-Pumpe und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den A-D in beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).

Grün: TRP-Multimer, **Lila:** CaIX, TRP; **Orange:** TRPL-eGFP-Multimer.

4.6.3 Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in der *calX^B*-Mutante hat keinen Einfluss auf das Translokationsverhalten des TRPL-eGFP

Der Einfluss erhöhter freier Calcium-Konzentration auf die Lokalisation von TRPL-eGFP wurde in der hypomorphen *calX^B*-Mutante untersucht. TRPL-eGFP ändert seine subzelluläre Lokalisation in der *calX^B*-Mutante in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen. Das TRPL-eGFP ist in dunkeladaptierten Fliegen in den Rhabdomeren (Abb. 4.29 B) und in helladaptierten Fliegen im intrazellulären Speicherkompartiment (Abb. 4.29 A) angereichert. Das Wanderungsverhalten des TRPL-eGFP in der *calX^B*-Mutante entspricht dem Verhalten in *wt*-Fliegen.

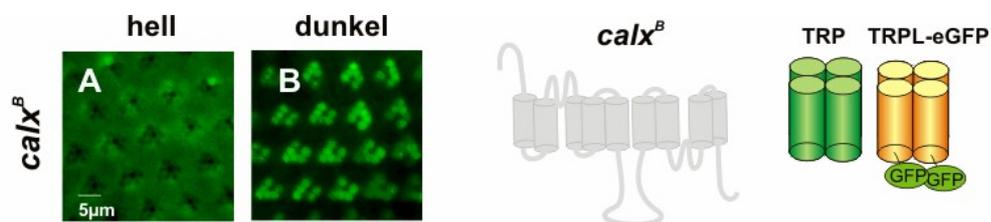


Abb. 4.29 Erhöhung der Calciumkonzentration in der *calX^B*-Mutante hat keinen Einfluss auf den TRPL-eGFP-Transport. TRPL-eGFP ist im Rhabdomer helladaptierter Fliegen und in einem intrazellulären Speicherkompartiment in dunkeladaptierten Fliegen.

Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP exprimierender *Drosophila*-Augen in der *calX^B*-Mutante.

A und B: TRPL-eGFP in *calX^B*, hell- bzw. dunkeladaptiert.

Rechte Seite: Darstellung der ektopisch exprimierten und endogen vorhandenen TRPC-Kanäle in den A-B beschriebenen Mutanten (die Schemata zeigen die Interaktion der Kanaluntereinheiten, wie sie aus Co-IPs siehe Abb. 4.12, 4.13, 4.14 ermittelt wurden).

Grün: TRP-Multimer, **Orange:** TRPL-Multimer, **Grau:** CalX-Protein (geringe Menge)

4.7 Elektrophysiologische Untersuchung der TRP/TRPL-Chimären in der Retina transgener *Drosophila*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Elektroretinographie (ERG) verwendet, um zu bestimmen, ob die chimären Untereinheiten *in vivo* funktionale Kanäle bilden. Wie aus Abb. 4.30 hervorgeht, reagieren die Photorezeptoren von *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Fliegen nicht auf Licht. Die Chimären wurden einzeln in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ein Photorezeptorpotential auszubilden. Alle Chimären wurden darüber hinaus in der *trpl*³⁰²-Mutante untersucht, um zu sehen, ob die chimären Konstrukte in der Lage sind, den *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyp zu revertieren. Aus diesen Untersuchungen kann der Einfluss der ausgetauschten Regionen auf das TRPL- oder TRP-typische ERG-Verhalten abgeleitet werden.

4.7.1 Kriterien für die Rettung des *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyps durch Überexpression chimärer Kanaluntereinheiten

Für die Reversion des *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyps wurden folgende drei Kriterien verwendet. Die Amplitude des extrazellulären Potenzials in *trpl*³⁰² ist vergleichbar mit der Amplitude wildtypischer Fliegen (lichtadaptiert, 15-20 mV), oszilliert jedoch mit 75 Hz während der Plateauphase (Abb. 4.30 Mitte). Dieses Phänomen wurde anhand intrazellulärer Ableitungen von Leung und Pak beschrieben (Leung und Pak, 2002). Die Ursache für die Oszillation ist nicht bekannt; das Auftreten im ERG spricht für das synchrone Auftreten der Oszillation in allen Photorezeptorzellen. Ein weiteres qualitatives Merkmal des *trpl*³⁰²-Phänotyps ist das Fehlen des sog. „on-transients“. Dabei handelt es sich um die Hyperpolarisation der LMCs (Large Monopolar Cell) der Lamina ganglionaris, die die Rezeptorantwort überlagert (Alawi *et al.*, 1971; Heisenberg, 1971; Laughlin S. in Kapitel 11 in Stavenga und Hardie, 1989). Das Fehlen des „on-transients“ deutet auf eine mögliche Beteiligung des TRPL an synaptischen Prozessen der Photorezeptoren hin (Gregor Belusic, Baruch Minke und Christoph Schuster persönliche Mitteilung). Weiterhin wurde die Adaptation der Photorezeptoren an Hintergrund-Beleuchtung geringer Intensität untersucht. Die *trpl*³⁰²-Mutante ist im Gegensatz zu *wf*-Photorezeptoren nicht in der Lage, an Hintergrund-Beleuchtung geringer Intensität zu adaptieren (Leung und Pak, 2002; Bähner *et al.* 2002). Die Expression der chimären Kanaluntereinheiten in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante sollte zeigen, ob die Chimären zu funktionalen Homomeren assemblieren können. Der ERG-Phänotyp der *trpl*³⁰²-Mutante

spiegelt das Verhalten der TRP-Kanäle wieder. Ebenso sind TRPL-Kanäle für den transienten ERG-Phänotyp der *trp*⁹-Mutante verantwortlich. Aus diesem Grund wurde das Auftreten eines transienten Rezeptorpotentials bei Expression der chimären Kanäle in der *trp*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante als TRPL-typisches Verhalten gewertet.

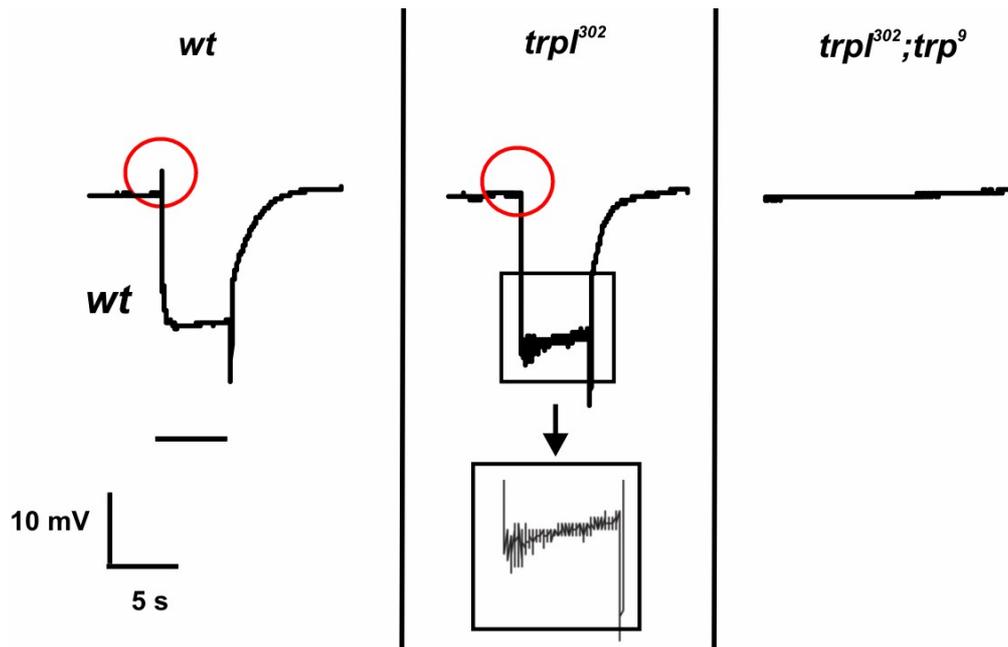


Abb. 4.30 Der amorphe *trp*³⁰²-Phänotyp ist durch den Verlust des „on-transients“ zu Beginn des Lichtstimulus (roter Kreis Mitte) und 75 Hz-Oszillationen während des „steady-states“ gekennzeichnet (Kasten Mitte). Die *trp*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante reagiert nicht auf Licht.

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf einen 5s Lichtreiz (580 nm) relativ zu einer indifferenten Elektrode.

4.7.2 Chimäre 1 zeigt im ERG Gemeinsamkeiten mit TRPL

Die Photorezeptoren der transgenen Chimäre1; *trp*³⁰²-Fliegen depolarisieren auf einen 5s Orangelichtpuls und verbleiben depolarisiert bis zum Ende des Stimulus. Eine erneute Reizung der Retina mit einem 5s Blaulichtpuls führt zu erneuter Depolarisation ähnlicher Amplitude (Abb. 4.31). Das ERG der Chimäre1; *trp*³⁰² auf den ersten Lichtstimulus verfügt über ein deutliches „on-transient“ (Abb. 4.31). Das Fehlen von 75 Hz Oszillation während der Plateauphase des Photorezeptorpotenzials („steady-state“) zeigt, dass sich Chimäre 1 in der

*trpl*³⁰²-Mutante wie TRPL verhält. Die Expression der Chimäre 1 in der *trpl*³⁰²;*trp*⁹-Mutante führt zur Ausbildung eines transienten Rezeptorpotenzials, das typisch für das *trp*⁹-Allel ist (Abb. 4.31). Die Chimäre 1 hat in der *trpl*³⁰² und *trpl*³⁰², *trp*⁹-Doppelmutante ähnliche Eigenschaften wie TRPL, die Untereinheiten assemblieren zu funktionalen Kanälen.

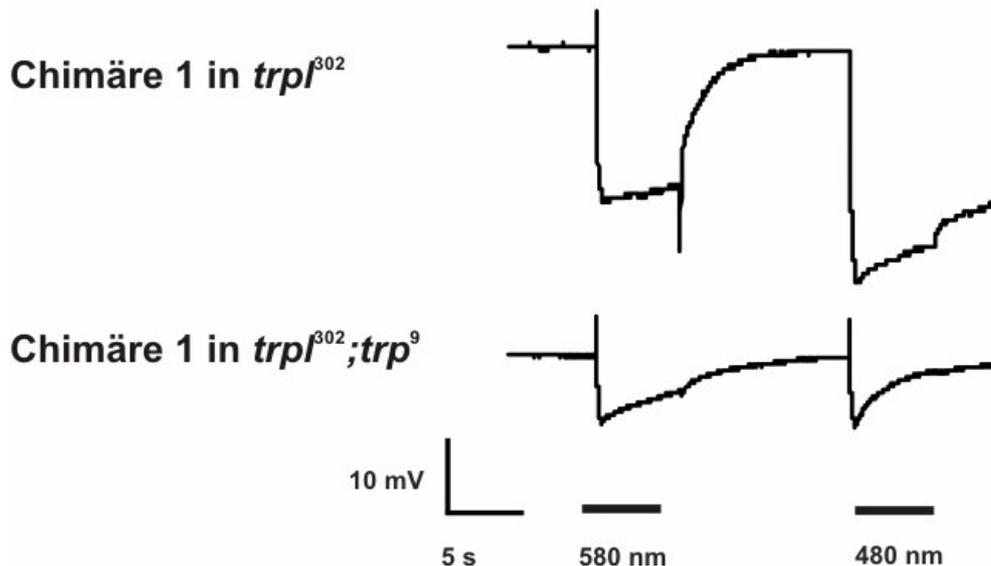


Abb. 4.31 Typische Elektroretinogramme von Chimäre1 in der *trpl*³⁰²-Mutante bzw. *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante. Expression der Chimäre1 revertiert den *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyp zu einem *wt*-ERG-Phänotyp und den Phänotyp der *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante zu einem „transienten-Rezeptorpotential“-Phänotyp. Die Chimäre 1 verhält sich wie TRPL. Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlänge der verwendeten Stimuli waren 580nm bzw. 480nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert. Das Photorezeptorpotential der Chimäre 1; *trpl*³⁰²-Fliege erreicht bei Stimulation mit 5s Orangelicht eine Plateauphase („steady-state“) und kehrt nach Ende des Stimulus zum Ausgangswert zurück. Die Rezeptorantwort auf erneute 5s Stimulation mit Licht der Wellenlänge 480nm hat eine geringfügig höhere Amplitude. Die Rezeptorantwort verfügt über ein deutliches „on-transient“, die Plateauphase des Rezeptorpotenzials ist wildtypisch. Das Photorezeptorpotential der Chimäre 1; *trpl*³⁰² *trp*⁹-Fliege repolarisiert während der Stimulation mit 480nm auf den Ausgangswert. Der ERG-Phänotyp der Chimäre 1; *trpl*³⁰² *trp*⁹-Fliege entspricht dem Phänotyp einer hypomorphen *trp*-Mutante.

4.7.3 Expression der Chimäre 1 in *trpl*³⁰²-Fliegen erhöht die Fähigkeit der Photorezeptorzellen sich an Hintergrund-Licht geringer Intensität zu adaptieren

Die Empfindlichkeit der Photorezeptoren der Chimäre1, *trpl*³⁰²-Fliegen wurde anhand von Reizintensität-Reizantwort-Kurven („Reiz-Reizantwort-Kurve“) mit der Empfindlichkeit von *wf*- und *trpl*³⁰²-Photorezeptoren verglichen. Reiz-Reizantwort-Kurven haben bei halblogarithmischer Auftragung einen sigmoiden Verlauf, welche die Lichtsättigung der Photorezeptoren beschreibt. Die Spanne an Lichtintensitäten auf die die Photorezeptoren reagieren können wird als Arbeitsbereich oder „dynamic range“ bezeichnet. Der Arbeitsbereich der Photorezeptoren wurde für drei unterschiedliche Hintergrund-Intensitäten ermittelt. Zur optimalen Repräsentation der Spannungsantwort als Funktion der Lichtintensität wurden die Reiz-Reizantwort-Kurven mittels nicht-linearer Regression durch Verwendung der Hill-Gleichung $[V/V_{\max} = I^n / (I^n + I_{50}^n)]$ an die Datenpunkte angepasst [I₅₀-Lichtintensität die zu halbmaximaler Rezeptor-Antwort führt, n (Hill-Koeffizient) Steigung der V/logI-Kurve]. Die Reizschwelle der Rezeptoren wird von dem Parameter I₅₀ beschrieben. Je weiter die I₅₀-Werte bei unterschiedlichen Hintergrundbeleuchtungen auseinander liegen, desto größer ist die Spannweite an Lichtintensitäten, auf die der Rezeptor antworten kann. Je kleiner der I₅₀-Wert eines Photorezeptors ist, desto größer ist seine „absolute Empfindlichkeit“ (Kleinschmidt und Dowling, 1975). Der Hill-Koeffizient [n] ist ein Maß für den kleinsten Helligkeits-Unterschied, den die Photorezeptorzelle wahrnehmen kann („Kontrast-Diskriminierung“). Große Werte für Hill-Koeffizienten sind ein Ausdruck für eine große „relative Empfindlichkeit“ der Photorezeptorzellen (Kleinschmidt und Dowling, 1975).

Der Abbildung 4.32 A ist zu entnehmen, dass weißäugige *wf*-Fliegen an zunehmende Hintergrund-Beleuchtung adaptieren. Die Reizschwelle der Photorezeptorzellen liegt in Fliegen mit Hintergrund-Beleuchtung höher als ohne. Die Kurven mit Hintergrund-Beleuchtung sind gegenüber den Kurven ohne Hintergrund-Beleuchtung zu Werten höherer Intensität versetzt („range-shift“) (Abb. 4.32 A). Zur zusätzlichen Vergrößerung des Arbeitsbereiches wildtypischer Photorezeptoren nimmt die Steigung der Reiz-Reizantwortkurve ab; diese „Streckung“ des Arbeitsbereiches ist mit einer Verringerung der relativen Empfindlichkeit des Rezeptors verbunden (Abb. 4.32 B).

Im Falle der *trpl*³⁰²-Mutante ist die Anpassung an Hintergrund-Beleuchtung verringert. Die Photorezeptoren sind nicht in der Lage, Stimuli gleicher Intensität bei unterschiedlicher Hintergrund-Beleuchtung voneinander zu unterscheiden. Die Reiz-Reizantwort-Kurven ohne (Abb. 4.33 „Dunkel“) und mit schwachem (Abb. 4.33 -5,2 log) Hintergrundlicht überlagern einander teilweise. Dies wirkt sich als Verkleinerung des Arbeitsbereiches der *trpl*³⁰²-Photorezeptoren aus. Dieser Effekt wird zusätzlich durch die Vergrößerung des Hill-

Koeffizienten („Stauchung der Kurve“) bei allen untersuchten Hintergrund-Beleuchtungen (Abb. 4.32) verstärkt.

Die Reiz-Reizantwort-Kurven der Chimäre 1, *trpl*³⁰²-Photorezeptorzellen bei Hintergrund-Beleuchtung geringer Intensität (-5,2 log) und ohne Hintergrund-Beleuchtung überlagern einander nicht. Die Photorezeptoren können sich an geringe Unterschiede in der Hintergrund-Lichtintensität adaptieren. Die I_{50} und der Hill-Koeffizient der Chimäre1, *trpl*³⁰² liegt ohne Hintergrund-Beleuchtung (Abb. 4.33 A, B „Dunkel“) bzw. mit Hintergrund-Beleuchtung geringer Intensität (Abb. 4.33 A,B -5,2 log) zwischen den Werten der *wt* und *trpl*³⁰²-Fliegen und passt sich für -4,2 log den *wt*-Werten weitgehend an. Die I_{50} -Werte der *wt*-Photorezeptoren an. Die I_{50} -Werte der Chimäre1, *trpl*³⁰² sind im Dunklen kleiner und im Hellen größer als die I_{50} -Werte der *trpl*³⁰²-Mutante. Die Expression der Chimäre1 in den Photorezeptoren der *trpl*³⁰²-Mutante vergrößert die absolute Sensitivität und den Arbeitsbereich der Photorezeptorzellen (Abb. 4.33 A).

Der Hill-Koeffizient (Steigung) der Chimäre1, *trpl*³⁰², ermittelt aus der Reiz-Reizantwort-Kurve, ist wie in *wt*-Photorezeptoren kleiner als in der *trpl*³⁰²-Mutante.

wt und Chimäre1, *trpl*³⁰² erreichen die gleiche Amplitude der Reizantwort als Folge der Adaptation an die Hintergrund-Beleuchtung erst bei höherer Reizintensität als die *trpl*³⁰²-Mutante (vgl. Abb. 4.32 A, C mit B, 4.33 A). Durch die den „range-shift“ und der Verringerung der Steigung der Reiz-Reizantwort-Kurven wird der Arbeitsbereich von *wt* und Chimäre1, *trpl*³⁰² „gestreckt“.

Die Expression der Chimäre 1 in der *trpl*³⁰²-Mutante ist in der Lage, den bei *trpl*³⁰²-Photorezeptorzellen beobachteten Defekt im Adaptationsverhalten teilweise zu revertieren.

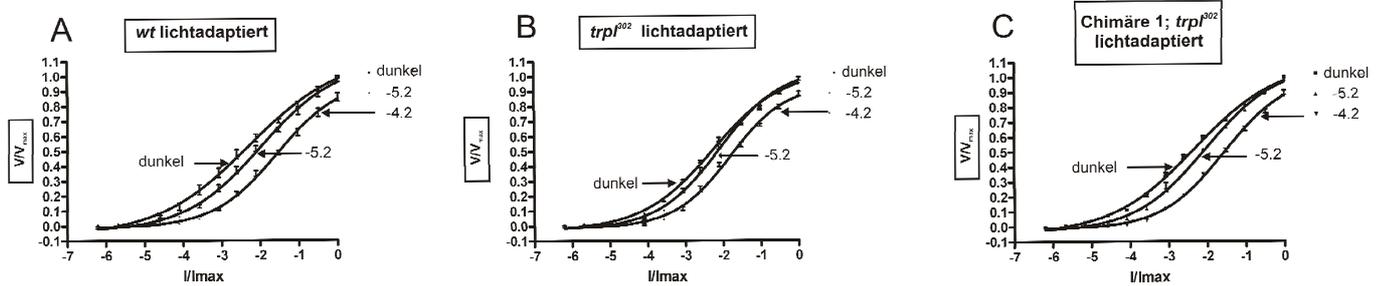


Abb. 4.32 Die Adaptation von *Drosophila*-Photorezeptoren an schwache Hintergrund-Beleuchtung ist abhängig von TRPL Kanälen. Das Chimäre 1-Protein kann TRPL bei der Adaptation an schwache Hintergrund-Beleuchtung ersetzen. Reiz-Reizantwort-Kurven weißäugiger wt (A), $trpl^{302}$ (B) und Chimäre1, $trpl^{302}$ -Fliegen (C). Der Arbeitsbereich der Photorezeptoren für Lichtreize unterschiedlicher Intensität der $trpl^{302}$ -Mutante ist im Vergleich zu wt- und Chimäre1, $trpl^{302}$ -Fliegen verringert. Dies wird geringfügig durch Zunahme der relativen Sensitivität der $trpl^{302}$ -Mutante kompensiert. (Abb. von Gregor Belusic zur Verfügung gestellt)

Weißäugige Fliegen wurden lichtadaptiert und mit Licht der Wellenlänge 530 nm für 1000 ms stimuliert. Die Intensität des Lichtes wurde mit Neutralfiltern über einen Bereich 6.7 log Einheiten in 0.5-log Schritten variiert. Die Amplitude der Elektroretinogramme wurde auf 1 normiert und halblogarithmisch gegen die Reizintensität aufgetragen. Die Datenpunkte entsprechen den gemittelten Werten der Rezeptorpotenzials während der stationären Phase der Depolarisation Die Kurven wurden unter Verwendung der Hill-Gleichung (siehe Text) an die Datenpunkte angepasst. Die 3 Kurven wurden mit dem gleichen Stimulusprotokoll bei drei verschiedenen Hintergrundintensitäten (siehe Pfeile, Zahlen entsprechen der Hintergrundintensität) aufgenommen. Es wurden 4 Fliegen pro Hintergrundintensität gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

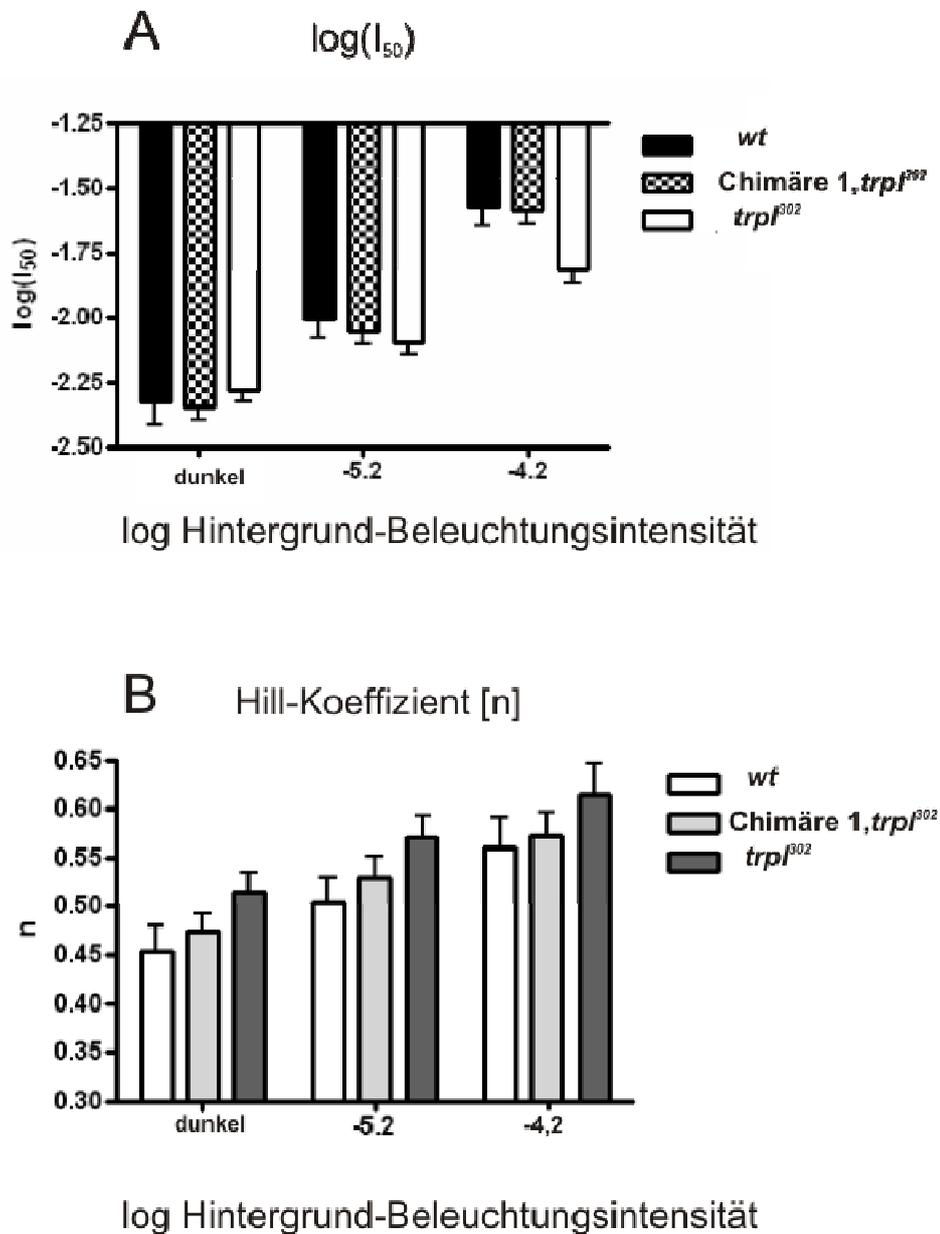


Abb. 4.33 $trpl^{302}$ -Fliegen adaptieren an ein kleineres Spektrum von Lichtintensitäten als *wt*- und Chimäre1; $trpl^{302}$ -Fliegen (Abb. von Gregor Belusic zur Verfügung gestellt)

Histogramme: **A**, I_{50} -Werte und **B**, Hill-Koeffizienten ermittelt aus Reiz-Reizantwort-Kurven der Chimäre1 $trpl^{302}$ im Vergleich mit $trpl^{302}$ und *wt*-Fliegen. Die Werte der Chimäre1 $trpl^{302}$ -Photorezeptoren liegen zwischen den Werten der wildtypischen und der $trpl^{302}$ -Mutante für niedrige Hintergrundbeleuchtungsintensitäten.

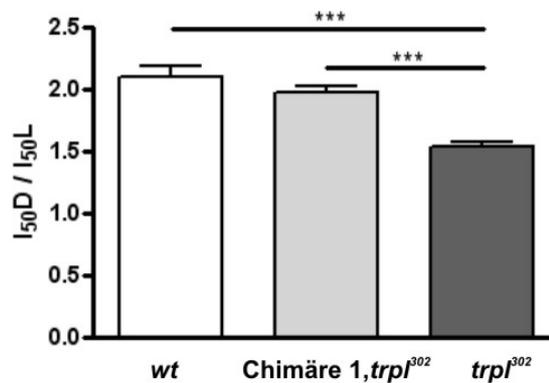


Abb. 4.34 Histogramme: Quotient der I_{50} -Werte hell- (I_{50L}) und dunkeladaptierter (I_{50D})-Fliegen ermittelt aus Reiz-Reizantwort-Kurven der Chimäre1 $trpl^{302}$ im Vergleich mit $trpl^{302}$ und *wt*-Fliegen. Der I_{50D}/I_{50L} -Quotient der $trpl^{302}$ -Mutante unterscheidet sich signifikant von Chimäre 1, $trpl^{302}$ - und *wt*-Fliegen. (Abb. von Gregor Belusic zur Verfügung gestellt).

Der quantitative Vergleich der I_{50D}/I_{50L} -Quotienten von Chimäre 1; $trpl^{302}$; mit $trpl^{302}$ und *wt*-Fliegen zeigt signifikante Unterschiede zwischen $trpl^{302}$ und Chimäre 1; $trpl^{302}$ -Fliegen ($P= 0,0008$), und $trpl^{302}$ und *wt*-Fliegen ($P= 0,0009$), während die I_{50D}/I_{50L} -Quotienten von *wt*-Fliegen und Chimäre 1; $trpl^{302}$ keine signifikanten Unterschiede zeigen ($P= 0,238$), Students-T-Test.

4.7.4 Die Chimäre 2 rettet den ERG-Phänotyp der $trpl^{302}$ -Mutante nicht

Die Photorezeptoren der transgener Chimäre 2; $trpl^{302}$ -Fliegen depolarisieren auf einen 5s Orangelichtpuls und verbleiben depolarisiert bis zum Ende des Stimulus. Eine erneute Reizung der Retina mit einem 5s Blaulichtpuls führt zu erneuter Depolarisation ähnlicher Amplitude. Dem ERG der Chimäre 2; $trpl^{302}$ auf den ersten Lichtstimulus fehlt das „on-transient“ (Abb. 4.35). Die Plateauphase des Rezeptorpotentials („steady-state“) zeigt deutliche 75 Hz Oszillation. Die Chimäre 2 in der $trpl^{302}$ -Mutante verhält sich wie eine $trpl^{302}$ -Mutante. Die Expression der Chimäre 2 in der $trpl^{302}; trp^9$ -Mutante führt zu Ausbildung eines transienten Rezeptorpotenzials, das typisch für das trp^9 -Allel ist (Abb. 4.7). Die Chimäre 2-Untereinheiten assemblieren zu funktionalen Homomeren in der $trpl^{302}; trp^9$ -Doppelmutante.

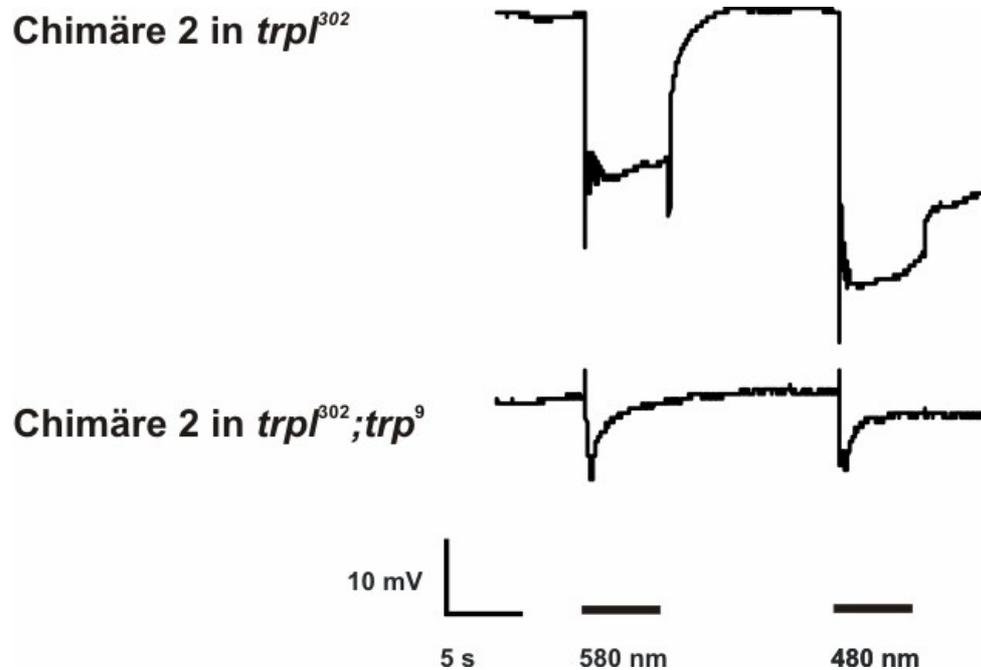


Abb. 4.35 Das Elektroretinogramm von Fliegen in Chimäre 2 der *trpl*³⁰²-Mutante bzw. *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante. Die Expression der Chimäre revertiert den *trpl*³⁰²-Phänotyp nicht. Der Phänotyp der *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante wird zu einem „transienten-Rezeptorpotential“-Phänotyp. Die Chimäre 2 bildet funktionale Kanäle, deren Verhalten zwischen dem des TRPLs und des TRPs liegt.

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlänge der verwendeten Stimuli waren 580nm bzw. 480 nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert.

Das Photorezeptorpotential der Chimäre 2; *trpl*³⁰²-Fliege ist bei Stimulation mit 5s-Orangelicht erreicht eine Plateauphase und kehrt nach Ende des Stimulus zum Ausgangswert zurück. Die Rezeptorantwort auf erneute 5s Stimulation mit Licht der Wellenlänge 480nm hat eine geringfügig höhere Amplitude. Der Rezeptor antwort fehlt das „on-transient“, die Amplitude ist wildtypisch.

Das Photorezeptorpotential der Chimäre 2; *trpl*³⁰² *trp*⁹-Fliege repolarisiert während der Stimulation auf den Ausgangswert. Der ERG-Phänotyp der Chimäre 2; *trpl*³⁰² *trp*⁹-Fliege entspricht dem Phänotyp einer *trp*⁹-Mutante.

4.7.5 Die Chimäre 3 rettet den ERG-Phänotyp der *trpl*³⁰²-Mutante nicht

Die Photorezeptoren der transgener Chimäre 3; *trpl*³⁰²-Fliegen depolarisieren auf einen 5s Orangelichtpuls und verbleiben depolarisiert bis zum Ende des Stimulus. Eine erneute Reizung der Retina mit einem 5s Blaulichtpuls führt zu erneuter Depolarisation ähnlicher Amplitude. Dem ERG der Chimäre 3; *trpl*³⁰² auf den ersten Lichtstimulus fehlt das „on-transient“ (Abb. 4.36). Die Plateauphase des Rezeptorpotentials („steady-state“) zeigt deutliche 75 Hz Oszillation. Die Chimäre 3, *trpl*³⁰²-Photorezeptoren verhalten sich wie *trpl*³⁰²-Photorezeptoren. Die Expression der Chimäre 3 in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Mutante führt zur Ausbildung eines transienten Rezeptorpotenzials, das typisch für das *trp*⁹-Allel ist (Abb. 4.36). Die Chimäre 3-Untereinheiten assemblieren zu funktionalen Homomeren in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante.

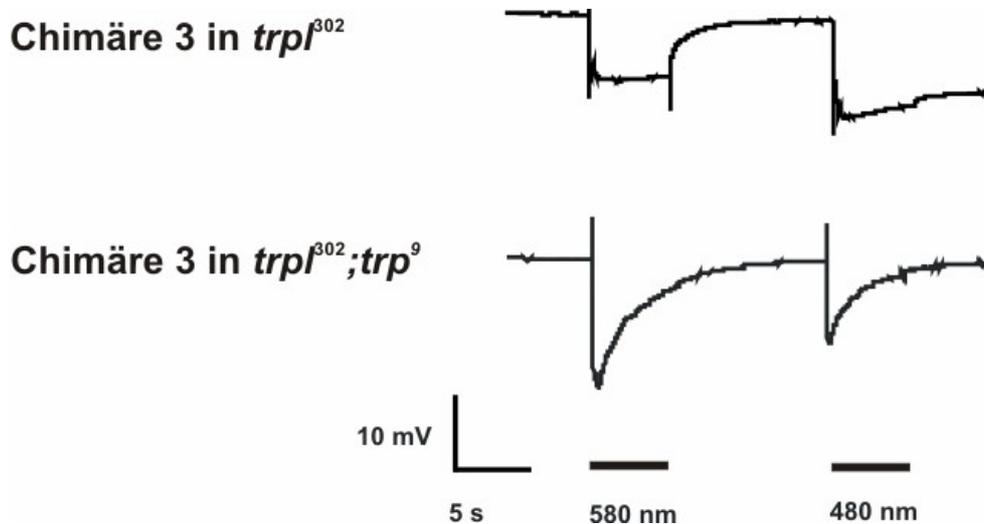


Abb. 4.36 Das Elektroretinogramm von Fliegen in Chimäre 3 der *trpl*³⁰²-Mutante bzw. *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante. Expression der Chimäre 3 revertiert den *trpl*³⁰²-Phänotyp nicht. Der Phänotyp der *trpl*³⁰²*trp*⁹-Mutante wird zu einem „transienten-Rezeptorpotential“-Phänotyp. Die Chimäre 3 bildet funktionale Kanäle, deren Verhalten zwischen dem des TRPLs und des TRPs liegt.

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlänge der verwendeten Stimuli waren 580 nm bzw. 480 nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert.

Das Photorezeptorpotential der Chimäre 3; *trpl*³⁰²-Fliege bei Stimulation mit 5s Orangelicht erreicht eine Plateauphase und kehrt nach Ende des Stimulus zum Ausgangswert zurück. Die Rezeptorantwort auf erneute 5s Stimulation mit Licht der

Wellenlänge 480nm hat eine geringfügig höhere Amplitude. Der Rezeptorantwort fehlt das „on-transient“, die Amplitude ist wildtypisch.

Das Photorezeptorpotential der Chimäre3; *trp*³⁰² *trp*⁹-Fliege repolarisiert während der Stimulation auf den Ausgangswert. Der ERG-Phänotyp der Chimäre3; *trp*³⁰² *trp*⁹-Fliege entspricht dem Phänotyp einer *trp*⁹-Mutante.

4.7.6 Die Chimären 1/2/3 komplementieren den transienten ERG-Phänotyp der *trp*⁹-Mutante nicht

Der ERG-Phänotyp der Chimären 1/2/3 in *trp*⁹-Mutanten entspricht dem „transienten“-Rezeptorpotential-Phänotyp der amorphen *trp*⁹-Mutante (Abb. 4.37). Der Austausch des C- und des N-Terminus einzeln oder beider intrazellulären Termini führen zu funktionalen Kanälen die die Funktion des TRP-Kanals in *trp*⁹-Photorezeptoren nicht ersetzen kann. Da für den „transienten“-Rezeptorpotential-Phänotyp das Fehlen des Calcium-Einstroms während der Belichtung diskutiert wird (Hardie *et al.*, 2001; Wang und Montell, 2006), ist dieses Ergebnis ein Hinweis auf die Abnahme der Calcium-Selektivität der Chimären-Kanäle im Vergleich zu nativen TRP-Kanälen.

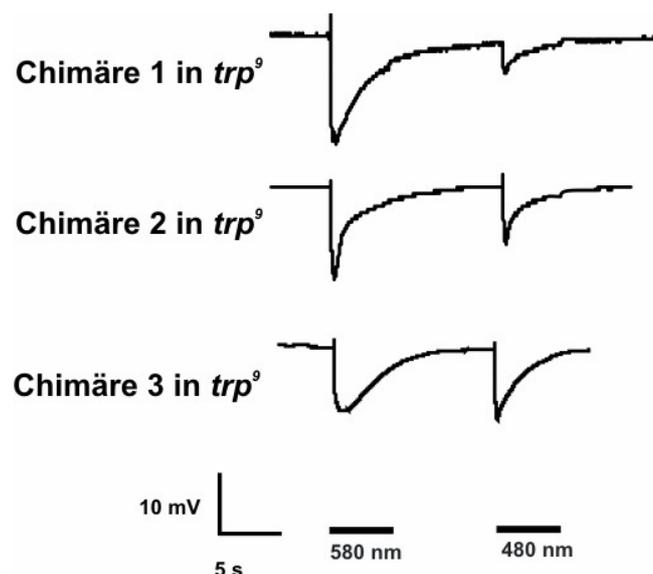


Abb. 4.37 Elektroretinogramme von Chimäre 1, *trp*⁹-, Chimäre 2, *trp*⁹- und Chimäre 3, *trp*⁹-Fliegen. Die Expression der Chimären 1/2/3-Proteine in den Photorezeptoren ist nicht ausreichend, um den „transienten-Rezeptorpotential“-Phänotyp der *trp*⁹-Mutante zu einem wildtypischen ERG zu revertieren. Die Chimären verhalten sich im ERG nicht wie TRP.

Ableitung des Photorezeptorsummenpotentials als Antwort auf zwei 5s Lichtreize relativ zu einer indifferenten Elektrode. Die Wellenlänge der verwendeten Stimuli waren 580nm bzw. 480 nm. Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation je 5 min. dunkeladaptiert.

Das Photorezeptorpotential der Chimäre 1/2/3; *trp*⁹-Fliege repolarisiert während der Stimulation annähernd auf den Ausgangswert. Der ERG-Phänotyp der Chimäre 1/2/3; *trp*⁹-Fliegen entspricht dem Phänotyp einer *trp*⁹-Mutante.

Alle untersuchten chimären Untereinheiten bilden funktionale Kanäle in den *trpl*³⁰²;*trp*⁹-Photorezeptorzellen. Dies setzt voraus, dass die chimären Untereinheiten *in vivo* zu homomeren Kanälen assembliert wurden.

Die Expression der Chimären 2 oder 3 in *trpl*³⁰²-Photorezeptoren führte nicht zu der Reversion des *trpl*³⁰²-Phänotypes. Nur die Chimäre 1 ist in der Lage, mehrere Aspekte des *trpl*³⁰²-Phänotyps zu „retten“. Keines der chimären TRP/TRPL Fusionsproteine verhielt sich dominant-negativ gegenüber endogenen TRP oder TRPL-Kanälen bei Expression im *trp*⁹-Hintergrund oder *trp*³⁰²-Hintergrund (vgl. Abb. 4.36, 4.35, 4.31 und Abb. 4.37). Die Bindungseigenschaften der chimären Kanäle legen nahe, dass in Fliegen, die eine der Chimären in *trp*⁹-Mutanten exprimieren, Ionenkanäle aus TRPL und der exprimierten Chimäre gebildet werden. Die Heteromere aus Chimären und TRPL haben Mischporen aus Proteindomänen von TRP/TRPL.

4.8 Sequenzunterschiede zwischen TRP und TRPL im N- und C-Terminus sind für das unterschiedliche Wanderungsverhalten der beiden Kanäle verantwortlich

Um die Sequenzbereiche, die für das Translokations-Verhalten des TRPL notwendig/hinreichend sind zu ermitteln, wurden chimäre Kanäle bestehend aus TRP/TRPL-eGFP konstruiert. Hierbei sollte durch den Ersatz der N- oder C-Termini bzw. N- und C-Termini des TRP durch die entsprechende Region des TRPL die Translokations-Eigenschaft auf TRP übertragen werden. Die Sequenzidentität über die Gesamtlänge von TRP/TRPL beträgt 39%. Die größten Sequenzunterschiede zwischen TRP und TRPL bestehen zwischen den C-Termini mit 19% Identität. Mit Hilfe von Sequenzanalyseprogrammen PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/>) und ELM: (<http://elm.eu.org/>) wurden Sequenzbereiche in TRPL-N- und C-Termini mit Ähnlichkeit zu bekannten Sortierungsmotiven identifiziert, die in TRP nicht vorhanden sind. Die As 1-5 (GRKK Konsensus: [XXRR]) im N-Terminus und die As 1120-1123 (PKHR Konsensus: [KKXX]) im C-Terminus des TRPL zeigen Ähnlichkeit zu ER-Retentionsmotiven. Weiterhin werden von PSORT im N-Terminus die As 211-214, 252-255 und 326-329 und im C-Terminus die As 652-655, 672-675 742-745 und 783-786 als Tyr-basierte-Sortierungs-Signale (Konsensus: Y [LMVIF]) vorhergesagt, diese sind jedoch weitgehend konserviert zwischen TRP und TRPL.

4.8.1 Mikroskopische Untersuchung der reizbedingten Veränderung der subzellulären Lokalisation von Chimäre 3

Für den für die Bewertung der reizbedingten Translokation der chimären Proteine wurden 2 Kriterien gewählt. TRPL-ähnliches Wanderungsverhalten lag vor, wenn die chimären Kanaluntereinheiten autonom, d.h. unabhängig von endogenem TRPL wanderten. Dieses Kriterium sollte ein „Co-trafficking“ chimärer Untereinheiten im Multimer mit *wt*-TRPL Untereinheiten ausschließen (Abb. 4.38 A, B). Das Wanderungsverhalten der chimären Proteine wurde hierfür in der amorphen *trp*³⁰²-Mutante untersucht, die kein TRPL-Protein bildet (Niemeyer *et al.*, 1998). Als zweites Kriterium für TRPL-typische Translokation mussten die chimären Untereinheiten den Transport-Defekt des TRPL-eGFP in der *trp*⁹-Mutante phänokopieren (siehe Abb. 4.38 C, D).

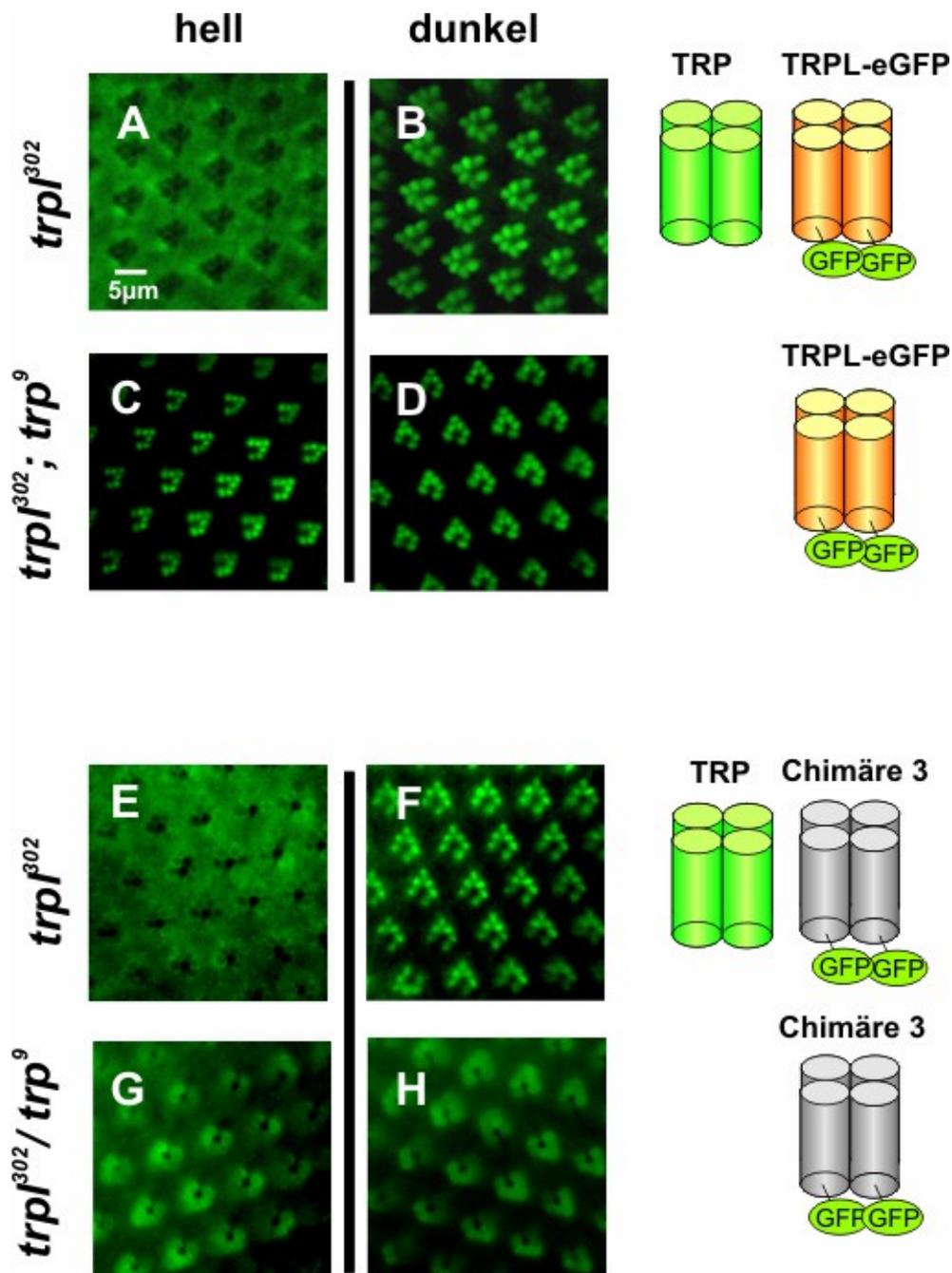


Abb. 4.38 Chimäre 3 phänokopiert das Translokationsverhalten des TRPL-eGFP in der *trpl*³⁰²-Mutante und der *trpl*³⁰²,*trp*⁹-Doppelmutante. Erklärung siehe Text.

Wasserimmersionsaufnahme TRPL-eGFP bzw. Chimäre 3 exprimierender *Drosophila*-Augen.

A und B: TRPL-eGFP, *trpl*³⁰²-Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert.

C und D: TRPL-eGFP *trpl*³⁰²-; *trp*⁹-Doppelmutante Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert.

E und F: Chimäre 3 in *trpl*³⁰²-Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert

G und H: Chimäre 3 in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante hell- und dunkeladaptiert

Rechte Seite: Grün: TRP-Multimer; Orange: TRPL-Multimer; Grau: Chimäre 3-

Multimer; Grau/Orange: Chimäre 3-TRPL-Heteromultimer.

In helladaptierten Chimäre 3 *trpl*³⁰²-Fliegen ist das Chimäre 3-Protein im intrazellulären Speicherkompartiment angereichert (Abb. 4.38 E). Die Rhabdomere sind weitgehend von der eGFP-Fluoreszenz ausgespart und gegenüber dem Zellkörper abgegrenzt. Bei dunkeladaptierten Chimäre 3 *trpl*³⁰²-Fliegen (Abb. 4.38 F) akkumuliert das Chimäre 3-Protein verstärkt in den Rhabdomeren. Das Translokationsverhalten von Chimäre 3 ist unabhängig von endogenem TRPL. In der Chimäre 3, *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante ist das Fusionsprotein in helladaptierten und dunkeladaptierten Fliegen weitgehend rhabdomerisch, (Abb. 4.38 G, H).

Die Chimäre 3 verändert lichtabhängig seine subzelluläre Lokalisation und phänotypisiert damit das Translokationsverhalten von TRPL-eGFP bezüglich beider verwendeter Kriterien. Zusätzlich zu der Untersuchung des Translokationsverhaltens von Chimäre 3 in der intakten Retina wurde die Verteilung des Fusionsproteins in isolierten Ommatidien hell- und dunkeladaptierter Fliegen analysiert.

In den Photorezeptorzellen dunkeladaptierter Fliegen befindet sich das TRPL-eGFP und das Chimäre 3 Protein überwiegend in den Rhabdomeren (Abb. 4.39 A und C). Im Zellkörper der Chimäre 3-Protein exprimierenden Photorezeptoren zeichnen sich an dem Ende, das der Cornea zugewandt ist, Zellkerne schwach ab. (Abb. 4.39 A „Verdickung“ rechts des Kästchens). Der Übergang zwischen Zellkörper und Rhabdomer ist durch die Anreicherung des Chimäre 3-Proteins an dieser Stelle deutlich sichtbar (Abb. 4.39 B). Die Verteilung des TRPL-eGFP-Proteins beschränkt sich auf die Rhabdomere (Pfeil in Abb. 4.39 D deutet auf eine einzelne Rhabdomer-„Lamelle“). Die Anreicherung des Chimäre 3-Proteins in den Rhabdomeren ist im Vergleich mit TRPL nicht ganz vollständig (vgl. Abb. 4.39 A mit C). In den Photorezeptoren helladaptierter Fliegen sind TRPL-eGFP und Chimäre 3-Protein stark in einem intrazellulären Speicherkompartiment angereichert (Pfeile in Abb. 4.39 F und H). Die Rhabdomere erscheinen dunkler und heben sich durch ihre „lamellenartige“ Struktur vom Zellkörper ab. Das TRPL-eGFP akkumuliert stark in einem Kompartiment um die Zellkerne der Photorezeptorzellen herum (Kästchen in Abb. 4.39 G, H). Bei diesem Kompartiment handelt es sich möglicherweise um das endoplasmatische Retikulum.

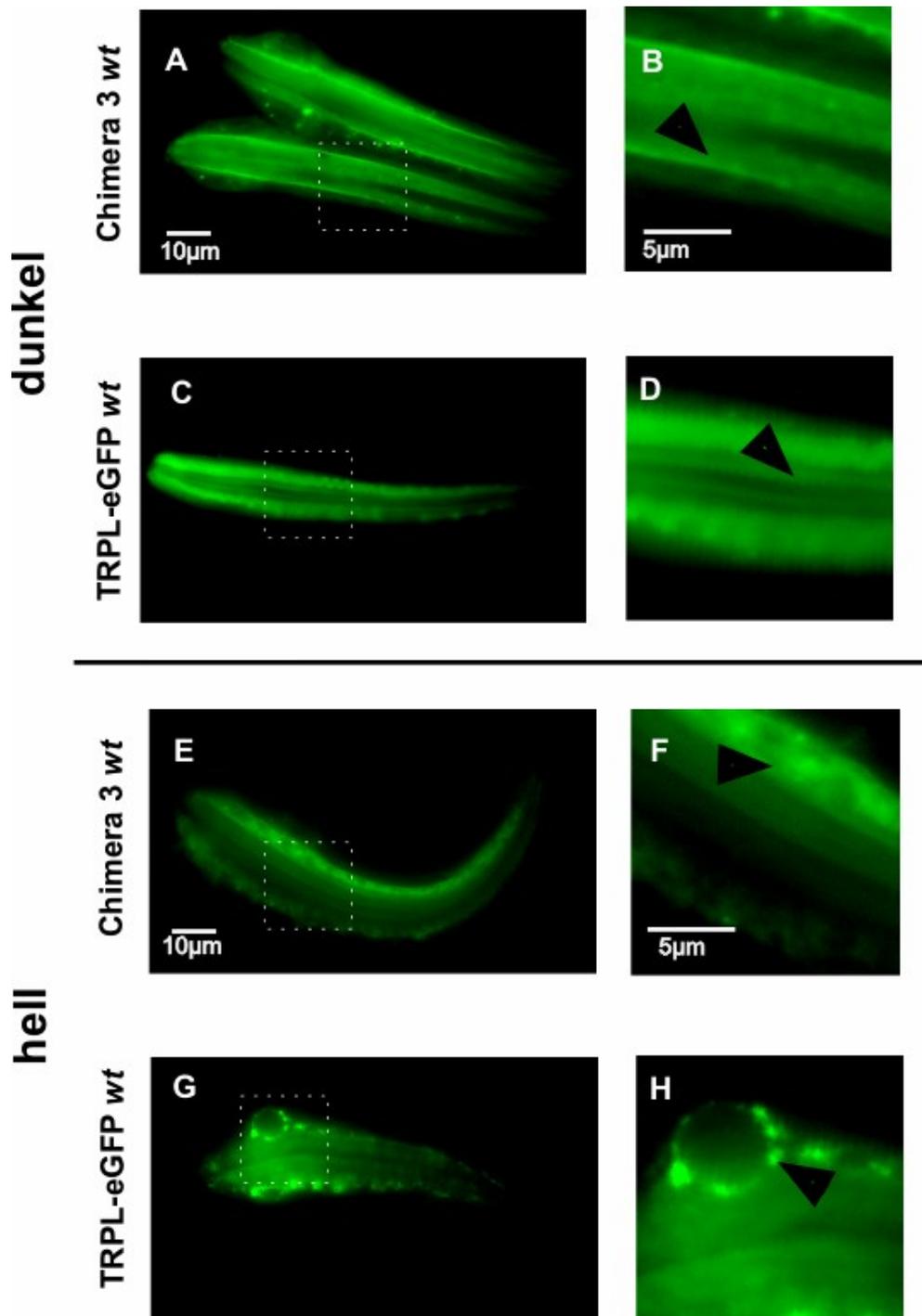


Abb. 4.39 **Chimäre 3 befindet sich in einem intrazellulären Kompartiment in helladaptierten Ommatidien und rhabdomerisch in dunkeladaptierten isolierten Ommatidien. Erklärung siehe Text.**

Ölimmersionsaufnahmen von isolierten Ommatidien (in Hanks Medium). Die 1-2 Tage alten Fliegen wurden vor der Präparation hell- bzw. dunkeladaptiert. Die Photorezeptoren sind so orientiert, dass die der Cornea zugewandte Seite nach rechts zeigt. eGFP-Fuoreszenz von Chimäre 3 und TRPL-eGFP; *wt* in den Photorezeptorzellen transgener Fliegen.

A und B: Chimäre 3 dunkeladaptiert **E und F:** Chimäre 3: helladaptiert.

C und D: TRPL-eGFP dunkeladaptiert, **G und H:** TRPL-eGFP helladaptiert.

F und H sind vergrößerte Ausschnitte der gestrichelten Quadrate aus E und G. Der Pfeil in F deutet auf intrazelluläres Speicherkompartiment.

Der Pfeil in H deutet auf mögliche Transportvesikel in Nachbarschaft eines Zellkerns.

4.8.2 Mikroskopische Untersuchung der reizbedingten Veränderung der subzellulären Lokalisation von Chimäre 1 und 2

Das TRPL-eGFP-Protein akkumuliert in dunkeladaptierten Photorezeptoren in den Rhabdomeren, und in helladaptierten Fliegen ist es vollständig in einem intrazellulären Speicherkompartiment (Abb. 4.40 I und J). In der *trpl³⁰²; trp⁹*-Doppelmutante ist das TRPL-eGFP-Protein unabhängig von den Lichtbedingungen auf das Rhabdomer beschränkt (Abb. 4.40. K, L).

In den helladaptierten Chimäre1-*trpl³⁰²*-Fliegen ist das Chimäre1-Protein zwischen den Rhabdomeren und dem Zellkörper verteilt (Abb. 4.40 A). Die Rhabdomere sind deutlich vom Zellkörper abgegrenzt, was für eine Anreicherung des Chimäre 1-Proteins in den Rhabdomeren gegenüber dem Zellkörper spricht. Bei dunkeladaptierten Chimäre 1, *trpl³⁰²*-Fliegen (Abb. 4.40 B) akkumuliert das Chimäre 1-Protein verstärkt in einem Speicherkompartiment im Zellkörper. Chimäre 1 verändert lichtabhängig seine subzelluläre Lokalisation. Das lichtabhängige Verhalten entspricht nicht dem Translokationsverhalten von TRPL-eGFP. In der Chimäre 1, *trpl³⁰²; trp⁹*-Doppelmutante ist das Fusionsprotein in helladaptierten Fliegen weitgehend in den Rhabdomeren lokalisiert, (Abb. 4.40 C). In dunkeladaptierten Fliegen befindet sich das Chimäre 1-Protein im Speicherkompartiment im Zellkörper, während die Rhabdomere von der eGFP-Fluoreszenz ausgespart (Abb. 4.40 D) bleiben. Der Austausch des C-Terminus TRP durch den C-Terminus des TRPL ist nicht ausreichend, um für TRPL-typisches Translokations-Verhalten zu vermitteln.

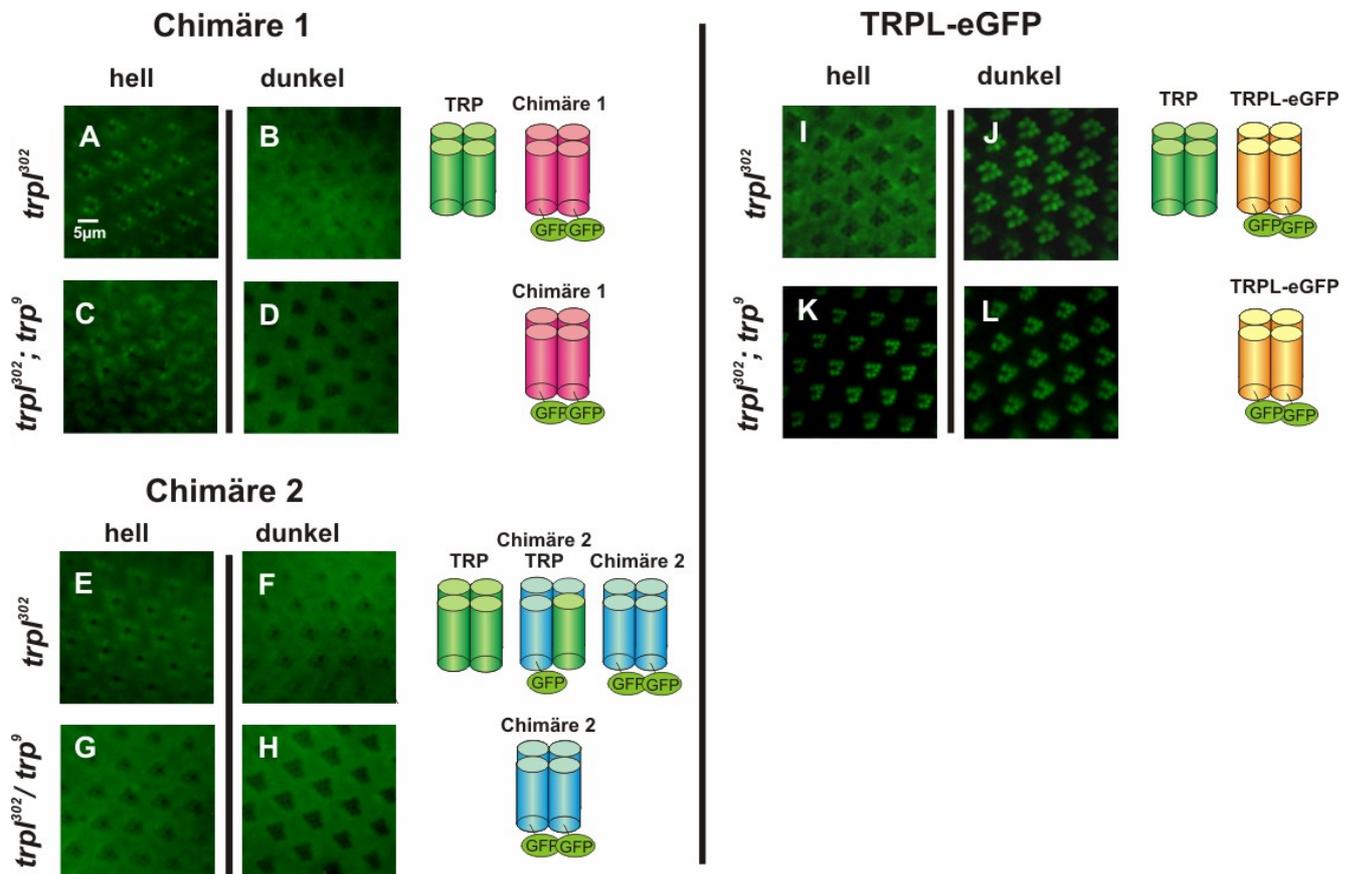


Abb. 4.40 Translokationsverhalten hell- und dunkeladaptierter Chimäre 1- und Chimäre 2-Fliegen in Mutanten, die keine endogene TRP/TRPL Untereinheiten exprimieren. Chimäre 1 und Chimäre 2 zeigen lichtabhängige Translokation in Photorezeptoren. Das Wanderungsverhalten von Chimäre 1 und Chimäre 2 ist keine Phänokopie des TRPL-eGFP Verhaltens. Erklärung siehe Text.
A und B: Chimäre 1; *trpl*³⁰²-Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert.
C und D: Chimäre 1 *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante hell- bzw. dunkeladaptiert.
Grün: TRP-Multimer; **Pink:** Chimäre 1-Multimer.
E und F: Chimäre 2; *trpl*³⁰²-Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert.
G und H: Chimäre 2; *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante hell- bzw. dunkeladaptiert.
Grün: TRP-Multimer; **Blau:** Chimäre 2-Multimer; **Blau/Grün:** Chimäre 2/TRP-Heteromultimer;
I und J: TRPL-eGFP; *trpl*³⁰²-Mutante hell- bzw. dunkeladaptiert.
K und L: TRPL-eGFP, *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante hell- bzw. dunkeladaptiert.

In helladaptierten Chimäre 2 *trpl*³⁰²-Fliegen ist das Chimäre 1-Protein zwischen den Rhabdomeren und dem Zellkörper verteilt. Die Rhabdomere sind weniger deutlich vom Zellkörper abgegrenzt als bei den vergleichbaren Chimäre 1, *trpl*³⁰²-Fliegen (vgl. Abb. 4.40 A mit E). Bei dunkeladaptierten Chimäre 2 *trpl*³⁰²-Fliegen (Abb. 4.40 F) akkumuliert das Chimäre 2-Protein verstärkt in einem Speicherkompartiment im Zellkörper. Chimäre 2

verändert lichtabhängig seine subzelluläre Lokalisation. Das Translokationsverhalten entspricht nicht dem Translokationsverhalten von TRPL-eGFP. Das Translokationsverhalten von Chimäre2 ist unabhängig von endogenem TRPL und ist somit eine Eigenschaft der chimären Untereinheit. In hell- und dunkeladaptierten Chimäre 2, *trpl³⁰²trp⁹*-Fliegen (Abb. 4.40 G und H) ist das Fusionsprotein in beiden Fällen in einem intrazellulären Speicherkompartiment lokalisiert. Bei helladaptierten Fliegen sind geringe Mengen des Fusionsproteins auch in den Rhabdomeren (Abb. 4.40 G). Die lichtabhängige Translokation der Chimäre 2 wird somit von TRP beeinflusst. Das TRP beeinflusst die subzelluläre Verteilung des Chimäre 2-Proteins wahrscheinlich durch direkte Wechselwirkung. Die Tabelle 4.2 fasst die subzelluläre Lokalisation der untersuchten TRP/TRPL-Chimären im Vergleich TRPL-eGFP zusammen.

	Chimäre 1		Chimäre 2		Chimäre 3		TRPL-eGFP	
	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel
<i>trpl³⁰²</i>	Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere
<i>trpl³⁰²; trp⁹</i>	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere	Rhabdomere	Rhabdomere	Rhabdomere

Tab. 4.2 Zusammenfassung der subzellulären Verteilung der untersuchten TRP/TRPL-Fusionsproteine in *trpl³⁰²* und *trpl³⁰²; trp⁹*-Mutanten (hell und dunkeladaptiert). Erläuterungen siehe Text.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden chimäre Proteine aus TRP und TRPL sowie Deletionsvarianten des TRPL-Kationenkanals in transgenen Fliegen exprimiert und ihre physiologischen Eigenschaften untersucht. Diese Versuche sollten dazu beitragen, die Unterschiede im Translokations-Verhalten und in den elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen den paralogen Proteinen TRP und TRPL zu erklären. Eine weitere Kernfrage war, ob TRP und TRPL funktional oder auch physisch miteinander interagieren. Die Frage der Homo- oder Heteromultimerisierung von TRP und TRPL wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Gillo *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Reuss *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 2000).

5.1 Expression rekombinanter Proteine in *Drosophila* mit dem Gateway™-System

Zur rekombinanten Expression der chimären eGFP-markierten Fusionsproteine wurden Gateway™-Vektoren konstruiert, die die Expression der Proteine in den Photorezeptorzellen von *Drosophila* ermöglichen. Epitop-markierte Kanaluntereinheiten bieten den Vorteil, die Proteine mit großer Sensitivität und Selektivität in ihrer physiologischen Umgebung untersuchen zu können. Im Falle des TRPL-eGFP Proteins konnte von Meyer und Mitarbeitern (Meyer *et al.*, 2006) gezeigt werden, dass die Überexpression der epitop-markierten Kanaluntereinheit keine Veränderung der Kanaleigenschaften oder der Photorezeptorzellen zur Folge hat. Die Kanaluntereinheiten können anhand des Epitops spezifisch auf Immunoblots oder immunhistochemisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus bietet die Expression eGFP-markierter Kanaluntereinheiten die Möglichkeit, die subzelluläre Verteilung der Kanäle *in vivo* mikroskopisch zu verfolgen. Die Verwendung des Gateway™-Systems macht die Subklonierung der Transgene in P-Element-Vektoren sehr effizient. Dies ist deshalb von Bedeutung, da aufgrund der Größe der P-Element-Vektoren und Restriktionsschnittstellen für die Konstruktion von Transgenen eine Klonierung in einfachere Vektoren unumgänglich ist.

Trotz der zusätzlichen Kosten für Enzyme rechtfertigt die enorme Zeitersparnis und die ausgezeichnete Ausbeute an rekombinanten Klonen die Verwendung des Gateway™-Systems. Der in der vorliegenden Arbeit konstruierte YC4Rh1-DEST-Vektor umgeht die Expression von Gal4-Protein im Gewebe, in dem das Transgen exprimiert werden soll. Obwohl sich das UAS/Gal4 System als sehr vielseitig erwiesen hat, führt die Expression des Gal4-Proteins in *Drosophila*-Augenimaginalscheiben und neuronalen Gewebe häufig zu

Apoptose und einem so genannten „rough eye“-Phänotyp (Kramer und Staveley, 2003; Rezával *et al.*, 2007).

Als Nachteil des Gateway™-Systems hat sich in der vorliegenden Arbeit die schwierige DNA-Sequenzierung der verwendeten pENTR-Vektoren erwiesen. In diesen Vektoren flankieren ca. 150 bp lange palindromische Sequenzen die DNA Region, die in die Destination-Vektoren rekombiniert werden soll. Die relativ langen palindromischen Bereiche führen wahrscheinlich zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche die Leseweiten bei der DNA-Sequenzierung verkürzen.

Durch die Verwendung von Sequenzierungs-Primern mit Schmelztemperaturen zwischen 60 und 65°C ließen sich die pENTR-Vektoren in den meisten Fällen sequenzieren. In den Fällen, in denen die Verwendung von Sequenzierungs-Protokollen mit höherer Schmelztemperatur nicht zu den gewünschten Leselängen führte, konnten die Inserts in den Destination-Vektoren erfolgreich sequenziert werden. Nach der Rekombination wird das Insert in den Destination-Vektoren nur noch von palindromischen Sequenzen von ca. 25 bp flankiert (Gateway™-Manual, Invitrogen).

Die Möglichkeit, Proteine in unterschiedlichen Expressionssystemen zu untersuchen, erweitert den Anwendungsbereich rekombinanter Proteine gegenüber der Verwendung einzelner heterologer Expressionssysteme. Seit kurzem steht eine Vielzahl von P-Element-basierten Destination-Vektoren für die Expression epitop-markierter Proteine in *Drosophila* zur Verfügung (<http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html>).

Die Herstellung von transgenen Fliegen zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften bietet aufgrund der physiologischen Umgebung enorme Vorteile gegenüber heterologen Expressionssystemen. Einzelkanal-Ableitungen, Untersuchungen zur Topologie von Membranproteinen mittels Biotin-Markierung oder FRET-Messungen von Protein-Interaktionen sind in intakten *Drosophila*-Augen aber zurzeit noch nicht möglich. Die Untersuchung der Ionenkanäle in *Drosophila*-S2-Zellen macht die Messung von Einzelkanalströmen direkt möglich. Tsunoda und Mitarbeiter kombinierten bei der Untersuchung der Funktion der PDZ-Domänen des INAD transgene Fliegen mit Zellkulturexperimenten (Tsunoda *et al.*, 2001). In der genannten Arbeit konnten einige Deletionsvarianten des INAD-Proteins nur in Zellkultur erfolgreich exprimiert werden. Elektrophysiologische Untersuchungen des TRPL-eGFP Proteins in S2-Zellen und in isolierten Ommatidien demonstrieren die Komplementarität beider Methoden für einige Fragestellungen (Parnas und Minke 2007). Entsprechende Messungen an epitop-markiertem TRP-Protein zeigten jedoch auch die Grenzen der Methode auf, da TRP in S2-Zellen nicht stabil exprimiert werden konnte (Parnas und Minke, 2007).

5.2 Medizinische Bedeutung der Assemblierung von TRP-Kanälen

Vertreter der TRP-Kanäle werden zunehmend als potentielle „Drug targets“ diskutiert (Übersicht: Ong und Barritt, 2004; Wissenbach *et al.*, 2004, Xie *et al.*, 2007). Die pharmakologische Beeinflussung von TRP-Kanälen könnte neuartige Therapieansätze für Entzündungsprozesse und Schmerzen, ebenso wie congenitale Erkrankungen wie das PKD (Polycystic kidney disease) oder lysosomale Speicherkrankheiten (Mucopolysaccharidose IV) liefern (Übersicht Xie *et al.*, 2007; Ong und Barritt, 2004; Wissenbach *et al.*, 2004). Arzneimittel-Nebenwirkungen sind häufig auf unzureichende Spezifität der verwendeten Pharmaka zu ihrem Zielmolekül zurückzuführen. Neue *in vitro*-evolutive, Peptid/RNAi- und *in silico*-Technologien erlauben das Design von sehr spezifischen Bindungspartnern/Inhibitoren gegen ausgewählte Zielproteine. Erste Beispiele für zugelassene Medikamente/Leitstrukturen gegen Grippe aus der Gruppe der Neuramidasehemmer (Übersicht Oxford *et al.* 2003), die anhand von Kristallstrukturen *in silico* modelliert wurden, und ein RNAi-basiertes Medikament gegen Macula-Degeneration (Übersicht Michels *et al.*, 2006) sowie viel versprechende Ansätze aus dem Bereich der Peptid/RNA-Aptamere (Übersicht Jame, 2007; Cerchia und de Franciscis, 2006) lassen auf zahlreiche neue Medikamente hoffen. Allen Ansätzen gemeinsam ist die Tatsache, dass ein geeignetes Zielmolekül bekannt und genau charakterisiert werden muss. Für die TRP Kanäle bedeutet das, dass Regulation der intrazellulären Verteilung und die Regeln, die der Bildung von Homo und Heteromeren zu Grunde liegen, bekannt sein müssen, damit die Pharmaka nur auf die gewünschte Kanalspezies wirken.

Für einige Vertreter der TRPV/TRPC-Unterfamilien wurde mittels FRET-Messungen und biochemischer Untersuchungen die tetramere Quartärstruktur nachgewiesen (Hoenderop *et al.*, 2003; Jahnelt *et al.*, 2001; Keddi *et al.*, 2001; Hellwig *et al.*, 2005; Amiri *et al.*, 2003; Venkatachalam *et al.*, 2006, Strübing *et al.*, 2001; Strübing *et al.*, 2003; Goel *et al.*, 2002). Heterolog exprimierte VR1-Kanäle können in nativen Gelen anhand ihres Molekulargewichtes mono-, di-, tri- und tetrameren Kanälen zugeordnet werden. (Strübing *et al.*, 2001; Strübing *et al.*, 2003; Goel *et al.*, 2002). *In vivo* vernetzte TRPV-Kanaluntereinheiten wiesen ebenfalls tetramere Struktur auf (Keddi *et al.*, 2001; Hoenderop *et al.*, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete native PFO-PAGE legt nahe, dass auch TRPL in den Photorezeptorzellen von *Drosophila* als Tetramer und Dimer vorliegt. Hofmann und Mitarbeiter zeigten durch FRET-Untersuchungen, dass humane TRPC-Kanaluntereinheiten, die durch intrazellulären Calcium-Anstieg geöffnet werden („store-operated“), in Zellkulturen untereinander Heteromultimere bilden. Co-exprimierte TRPC-Kanäle, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert wurden, wurden in diese Heteromere nicht integriert. Die Auswahl der Bindungspartner wird in diesem Fall durch den Mechanismus der

Kanalöffnung bestimmt. (Hofmann *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen machten deutlich, dass die Bildung von Multimeren ein regulierter Prozess ist, und nicht wie postuliert durch zufälliges „Aufeinandertreffen“ von Kanaluntereinheiten ausgelöst wird.

5.3 Assemblierung der *Drosophila* TRPC-Kanäle

Bei TRP/ TRPL/TRP γ -Kanaluntereinheiten handelt es sich um rhabdomerische Proteine, die *in vitro* und in Zellkultur spontan zur Heteromerisierung fähig sind (Gillo *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997). Die ersten Hinweise für die physische Interaktion von *Drosophila*-TRP und -TRPL stammen aus Untersuchungen von in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Kanaluntereinheiten. Heterolog exprimierte TRP- oder TRPL-Kanäle bildeten keine funktionalen Homomere. Die Co-Transfektion von cDNA beider Kanaluntereinheiten führte zur Bildung funktionaler Kationenkanäle (Gillo *et al.*, 1996). Weitere Hinweise auf eine physische Wechselwirkung zwischen den beiden paralogen TRPC Kanälen zeigten Xu und Mitarbeiter (1997) *in vitro* und *in vivo*. In Membranproteinextrakten co-präzipitierte TRPL mit TRP. Weitere biochemische und elektrophysiologische Experimente legen nahe, dass TRP und TRPL *in vitro* und *in vivo* zur Bildung von Heteromultimeren in der Lage sind.

Hinweise auf eine Wechselwirkung von TRP und TRPL *in vivo* lieferten Leung und Mitarbeiter (Leung und Pak, 2000). Sie schlossen aus biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen unterschiedlicher Mutanten, dass in *InaD*^{P215}-Mutanten das TRPL-Protein für die Retention des TRP in der rhabdomerischen Membran verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, die Co-Immunopräzipitation von TRPL mit TRP zu reproduzieren. Anders als bei Xu und Mitarbeitern (Xu *et al.* 1997) wurden hier Antikörper gegen eGFP-markierte Kanaluntereinheiten verwendet. Die epitop-markierten Kanal-Untereinheiten wurden in *wt*-Fliegen exprimiert. Die markierten Kanal-Untereinheiten wurden mit einem monoklonalen eGFP-Antikörper aus nativen Membran-Extrakten präzipitiert. Die große Spezifität des eGFP-Antikörpers ermöglichte die Verwendung größerer Antikörper- und Extrakt-Mengen (ca. 2,5 bis 5 fache Menge an Protein als von Xu *et al.* 1997 verwendet). Das Präzipitat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die im Präzipitat enthaltenen Kanal-Untereinheiten auf Western-blots mit spezifischen Antikörpern gegen TRP und TRPL nachgewiesen.

Die endogenen und epitop-markierten Kanal-Untereinheiten, können anhand des unterschiedlichen Molekulargewichtes, bedingt durch die Fusion mit dem eGFP voneinander unterschieden werden. Bei der Co-IP aus Fliegen, die TRPL-eGFP exprimieren, konnte kein TRP präzipitiert werden, jedoch TRPL, dessen Menge etwa 1/10 des TRP beträgt. Die in der

Co-Immunopräzipitation nachgewiesene Wechselwirkung von TRPL-eGFP mit TRPL bei 10fachem „Überangebot“ an endogenem TRP spricht für die Spezifität der Co-IP und für die starke Affinität von TRPL-eGFP zu TRPL. Zu einem komplementären Ergebnis kam die Co-IP mit TRP-eGFP. Im Ansatz mit TRP-eGFP wurde ausschließlich endogenes TRP-Protein co-präzipitiert. Diese Strategie ermöglichte es die Co-Immunopräzipitationen von TRP-eGFP und TRPL-eGFP unter weitgehend identischen Bedingungen durchzuführen. Die Co-IP von TRPL-eGFP und TRP-eGFP zeigte dass die epitop-markierten Kanal-Untereinheiten exklusiv mit ihrem endogenen Pendant zu Multimeren assemblieren. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass homomultimere und heteromultimere Kanäle durch ein Detergenz unterschiedlich gut extrahiert werden. Im vorliegenden Fall kam die Co-IP mit TXSEP-Puffer und einem modifizierten RIPA-Puffer zum gleichen Ergebnis. Das Molekulargewicht der TRPL-eGFP-Multimere die durch die PFO-PAGE bestimmt wurde, lässt ebenfalls auf TRPL-eGFP-Homomultimere und nicht auf TRPL-eGFP/TRP-Multimere schließen. Da sich die drei verwendeten Puffer deutlich in ihrer Zusammensetzung voneinander unterscheiden, ist die „selektive“ Extraktion von Homomultimeren unwahrscheinlich.

5.4 Einfluss der cytoplasmatischen Termini des TRPL auf die Auswahl der Interaktionspartner

Die Untersuchung der chimären Proteine und von TRPL-Deletionsvarianten auf ihre Fähigkeit hin, mit endogenen TRP Kanälen Multimere zu bilden, erlaubte es, die für die Selektivität bei der Bildung von homomeren TRPL-Kanälen verantwortliche Region auf den N- und den C-Terminus des TRPL einzugrenzen. Ein Beitrag des C-Terminus zur Assemblierung ist für *Drosophila* TRPCs bisher noch nicht beschrieben worden. Die Untersuchungen der cytoplasmatischen Bereiche des TRPL in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl der N- oder C-Terminus alleine für die Multimerisierung von TRPL-Kanaluntereinheiten ausreichend ist. Die Affinität der cytoplasmatischen Bereiche zu endogenem TRPL war in allen untersuchten Chimären und TRPL-Deletionsvarianten ausreichend, um physische Wechselwirkung zu vermitteln. Die Untersuchung der Bindungseigenschaften der Chimäre 1 mittels Co-Immunopräzipitation zeigte, dass der Austausch des C-Terminus von TRP gegen den C-Terminus des TRPL für die Bildung von TRPL-Multimeren/Oligomeren ausreichend ist. Im Präzipitat konnte zudem kein endogenes TRP nachgewiesen werden. Im Einklang mit diesem Ergebnis sind die elektrophysiologischen und Immunopräzipitations-Experimente der Δ Ank-TRPL-eGFP-

Variante und des ΔC -TRPL-eGFP. Sowohl für \square Ank-TRPL-eGFP als auch für ΔC -TRPL-eGFP konnte die direkte Wechselwirkung mit endogenen TRPL-Untereinheiten durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden. Die Wechselwirkung mit endogenem TRPL ist ein deutlicher Hinweis auf die korrekte Faltung von Δ Ank/ ΔC -TRPL-eGFP. Allerdings war keine der untersuchten Deletionsvarianten des TRPL-eGFP in der Lage, in das Rhabdomer zu translozieren. Die Expression von Δ Ank-TRPL-eGFP-Untereinheiten in *wt*-Fliegen führt zu einer Phänokopie des *trpl*³⁰²-ERG-Phänotyps. Da das \square Ank-TRPL-eGFP nicht in die Rhabdomere transportiert wird, aber an endogene TRPL-Untereinheiten bindet, wird endogenes TRPL wahrscheinlich über Wechselwirkung mit dem intakten C-Terminus des Δ Ank-TRPL-eGFP an der Translokation gehindert (Abb.5.1) Die zusätzliche Expression von TRPL-HcRed reicht nicht aus, um den Transport der Δ Ank-TRPL-eGFP-Untereinheiten zu ermöglichen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Δ Ank-TRPL-eGFP ist das ΔC -TRPL-eGFP in der Lage, durch zusätzliche Expression von TRPL-HcRed lichtabhängig in das Rhabdomer zu translozieren. Es ist anzunehmen, dass die Translokation des ΔC -TRPL-eGFP im Multimer mit den intakten TRPL-HcRed-Untereinheiten erfolgt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide untersuchten Deletionsvarianten des TRPL weitgehend in nativer Konformation vorliegen. Weiterhin wird deutlich, dass die Wechselwirkung mit endogenem TRPL erhalten geblieben ist. Ein ähnliches Verhalten wurde für das humane TRPC1 Protein beschrieben. In Zellkultur exprimiertes TRPC1 war in intrazellulären Membrankompartimenten lokalisiert, während TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPC6 an der Plasmamembran lokalisiert waren (Zitt *et al.*, 1996). Bei der Co-Expression von TRPC1 und mTRPC4 β (TRPC4) (Schäfer *et al.*, 2000) konnte eine deutliche Zunahme des TRPC1 an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Nur TRPC4 ist in der Lage, TRPC1 zur Plasmamembran zu dirigieren. Dies wird wahrscheinlich durch gemischte Multimere erreicht. Die ersten verfügbaren Kristallstrukturen von TRPV2-Fragmenten lieferten neue Einblicke in die Funktion des N-Terminus bei der Assemblierung zu oligomeren Kanälen (Jin *et al.*, 2006; McCleverty *et al.*, 2006). Die Kristallstrukturen zeigten, dass das vierte und fünfte Ankyrin-Repeat die regelmäßige Struktur der Protein-Domäne durch eine Drehung gegen den Uhrzeigersinn unterbrechen. Die Autoren ergänzten die Kristallstrukturdaten durch biochemische Experimente zum Assemblierungsverhalten N-terminaler TRPV2-Fragmente in Lösung und kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass die TRPV2 Ankyrin-Repeats keine Homooligomere ausbilden können. Sie vermuten die Funktion der Ankyrin-Repeats in der Bindung anderer Proteine und Liganden (Jin *et al.*, 2006; McCleverty *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse sind insofern unerwartet, als die Bildung von TRPV2-Homomeren und die Beteiligung der cytosolischen Termini an der Assemblierung aufgrund von biochemischen und FRET-Experimenten als sehr wahrscheinlich galt (Hellwig *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse ist die Beteiligung weiterer Liganden, die an

die Ankyrin-Repeats mehrerer Kanal-Untereinheiten binden. Die Bedeutung des N-Terminus für die Wechselwirkung der TRPL-Untereinheiten wird unabhängig von den Untersuchungen des Δ Ank-TRPL-eGFP durch Co-Immunopräzipitation der Chimäre 2 mit TRPL bestätigt. Der Austausch des N-Terminus des TRP gegen den N-Terminus des TRPL ist ausreichend, um physische Wechselwirkung mit TRPL *in vivo* zu vermitteln. *In vitro* Untersuchungen von Xu zeigen, dass im Falle des TRPL keine weiteren Liganden für die Wechselwirkung der N-Termini von TRPL miteinander notwendig sind (Xu *et al.*, 1997). Genetische Untersuchungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, haben im Gegensatz zu heterolog exprimierten Kanälen den Vorteil, dass sie auch eine indirekte Bindung über dritte Partner erfassen. Ein möglicher Partner, der für die indirekte Vermittlung von Wechselwirkung zwischen TRP und TRPL in Frage kommt, ist das INAD-Protein. Die direkte Wechselwirkung des TRP und TRPL-Proteins mit INAD wurde mittels Co-Immunopräzipitation aus Membranextrakten von *Drosophila* und in Zellkultur demonstriert (Sinkins *et al.*, 1995; Xu und Montell, 1998).

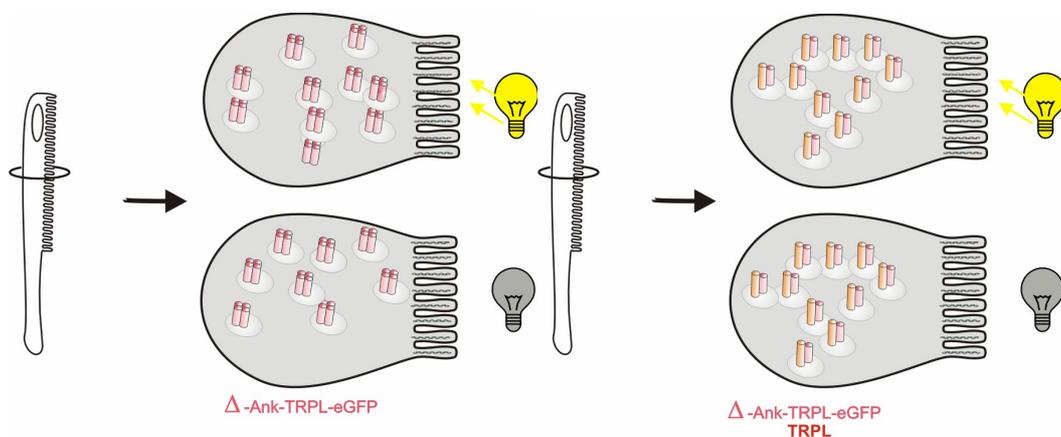


Abb. 5.1 Vorstellung des dominant-negativen Effektes der Δ Ank-TRPL-eGFP-Variante auf endogene TRPL Untereinheiten

Die Deletion der Ankyrin-Repeats des TRPL-Kanals führt zum Verlust von Motiven die für den rhabdomerischen Transport notwendig sind, und die Assemblierung der Kanäle beeinträchtigen. Die Wechselwirkung der Deletionsvariante des TRPL mit endogenen Kanal-Untereinheiten erfolgt über den intakten C-Terminus. Die Δ Ank-TRPL-eGFP/TRPL-Multimere verbleiben gemeinsam im intrazellulären Kompartiment.

Hinweise für die Beteiligung der cytosolischen Termini an der Assemblierung von TRPC-Multimeren lieferten Untersuchungen an Chimären der nicht physisch interagierenden TRPC4 und TRPC6-Kanäle (Lepage *et al.*, 2006). Zusätzlich lieferten die Ergebnisse von Lepage und Mitarbeitern Einblicke, welche Kanalregionen im Multimer miteinander wechselwirken (Lepage *et al.*, 2006). Die Ankyrin-Repeats und die coiled-coil-Domänen im N-Terminus des TRPC4 wurden als notwendige Regionen identifiziert. Der zweite Bereich, der für die Wechselwirkung von TRPC4 identifiziert wurde, befindet sich im C-terminalen Bereich einschließlich der Porenregion. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus erwiesen sich als ausreichend, um die Assemblierung von TRPC4/6-Chimären mit den TRPC4 zu ermöglichen. Im Falle des TRPC6 fanden die Autoren, dass der N-Terminus des TRPC6 mit dem C-Terminus des TRPC6 interagiert. Die Autoren gehen davon aus, dass bei der Assemblierung des TRPC6 Wechselwirkungen zwischen den N- und C-Termini des TRPC6 für die Assemblierung der Homomere möglich, aber nicht notwendig sind (Lepage *et al.*, 2006).

5.5 Einfluss der N- und C-Termini des TRPL auf die lichtabhängige Translokation

Die Untersuchung des Membran-Transportes von Glutamatrezeptoren und spannungsabhängige Ionenkanäle zeigen, dass die Assemblierung zum Tetramer eine notwendige Voraussetzung für den Transport zur Plasmamembran ist. Die Bildung der Tetramere im ER erfolgt in zwei Schritten, wobei zunächst Dimere gebildet werden. (Übersicht Fleck, 2006). Bei der Assemblierung des Tetramers werden ER-Retentionsmotive „maskiert“, was den Transport des Tetramers an die Plasmamembran einleitet. Ähnlich Mechanismen konnten auch für K⁺-Kanäle und Ca²⁺-Kanäle gezeigt werden (Übersicht Fleck, 2006).

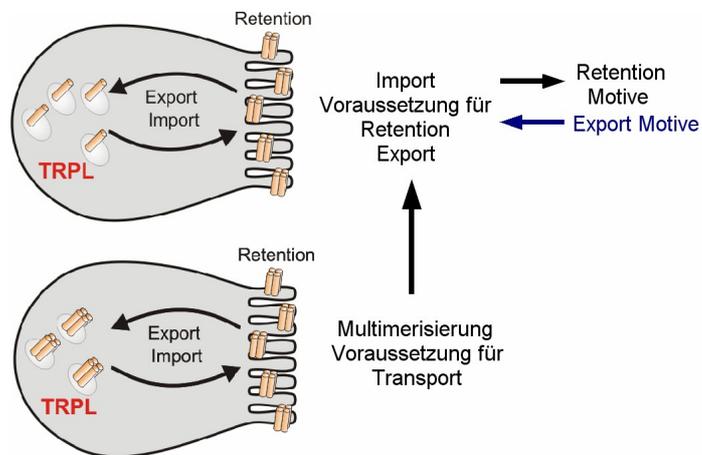


Abb. 5.2 Alternative Transportmechanismen des TRPL-Kanals als Mono- oder Oligomer

Die Assemblierung des TRPL-Kanals wahrscheinlich eine notwendige Voraussetzung für den Transport in das Rhabdomer. Ist die Assemblierung der TRPL-Untereinheiten durch Mutationen/Deletion gestört, so ist die Interpretation eines „Translokations-Defekt“-Phänotyps nicht mehr einem der oben dargestellten Prozesse zuzuordnen.

Die von Sequenzdatenprogrammen (PSORT) vorhergesagten ER-Retentionsmotive GRKK (As 2-5) und PKHR (As 1120-1124) sind im N- bzw. C-Terminus von TRPL vorhanden und fehlen bei den Deletionsvarianten Δ C-TRPL-eGFP und Δ N-TRPL-eGFP. Die Deletion der postulierten ER-Retentionssignale führte nicht wie erwartet zur Anreicherung der Proteine im Rhabdomer. Die Fähigkeit der Deletionsvarianten zur Wechselwirkung mit intakten TRPL wurde durch unterschiedliche Methoden gezeigt. Es bleibt aber zu untersuchen, ob es sich bei den Multimeren um Dimere oder Tetramere handelt. Sofern die Deletion die Bildung von Tetrameren beeinträchtigt, könnten ER-Retentionssignale der intakten Untereinheit exponiert bleiben. Diese exponierten ER-Retentionsmotive könnten für die intrazelluläre Lokalisation der Deletionsvarianten verantwortlich sein. Die zusätzliche Expression von TRPL-HcRed-Untereinheiten war für die lichtabhängige Anreicherung von Δ C-TRPL-eGFP im Rhabdomer, nicht jedoch für Δ Ank-TRPL-eGFP ausreichend. Dies könnte helfen, die Ursache der Retention im Cytoplasma auf einen Transport- oder Assemblierungsdefekt einzugrenzen. Da das Δ C-TRPL-eGFP mit TRPL-HcRed zusammen ins Rhabdomer transportiert wird, ist anzunehmen, dass in diesem Fall Motive deletiert wurden, die für den Transport und nicht für die Assemblierung notwendig sind (Abb 5.3).

Beim Deletionskonstrukt Δ C-TRPL-eGFP wurden die Aminosäuren 833 bis 1124 entfernt. In diesem Bereich befindet sich eine Calmodulin-Bindestelle (ab ca. As 850-900). Die Calmodulin-Bindestelle dient der Ca^{2+} -vermittelten Schließung des Kanals (Warr und Kelly, 1996; Scott *et al.*, 1997). Von der Deletion ist weiterhin eine prolinreiche Region (As 1117-

1120) betroffen, die mit der Prolyl-Isomerase FKBP59 interagiert (Goel *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde für diesen Bereich bei ca. 900 Aminosäuren eine coiled-coil-Domäne (CC-Domäne) von dem Programm COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) vorhergesagt. Die CC-Domäne könnte an der Multimerisierung des Ionenkanals beteiligt sein. Die Funktion dieser Regionen ist gegenwärtig spekulativ. Die Regulation des TRPL-Transportes durch FKBP59 bedingte Änderung der Proteinkonformation wäre jedoch eine attraktive Arbeitshypothese.

Der Austausch der cytoplasmatischen Termini von TRP gegen die entsprechenden Termini des TRPL führte zu Kanalproteinen mit neuartigen lichtabhängigen Translokations-Eigenschaften. Motive in N- und C-Terminus des TRPL die physisch oder funktional interagieren, werden für den Transport in das und aus dem Rhabdomer benötigt. Dies liefert eine plausible Erklärung für die intrazelluläre Retention von TRPL durch Δ Ank-TRPL-eGFP (Abb. 5.1). Über den Mechanismus der lichtabhängigen Translokation des TRPL ist bekannt, dass die Aktivierung der Phototransduktionskaskade notwendig ist, um die Translokation in das intrazelluläre Speicherkompartiment einzuleiten (Meyer *et al.*, 2006; Cronin *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass für den Export aus dem Rhabdomer TRP benötigt wird (Bähner *et al.*, 2002; Cronin *et al.*, 2006).

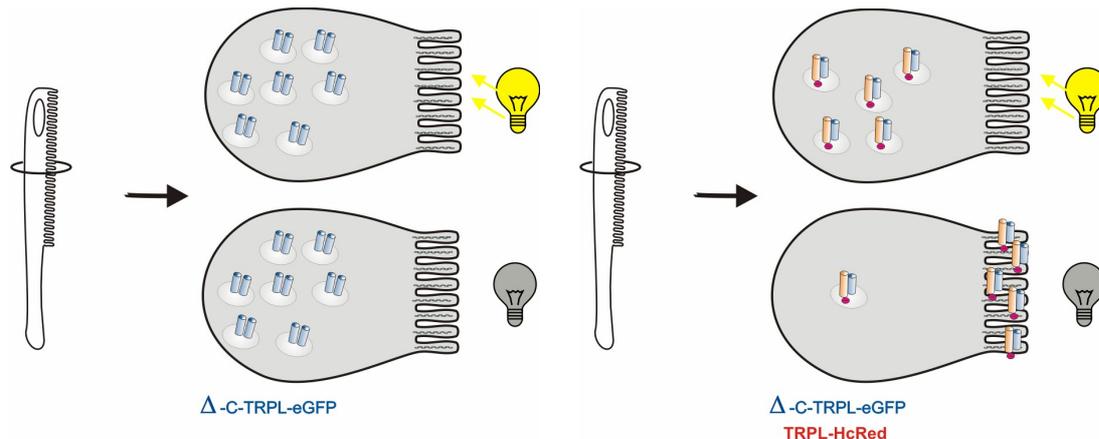


Abb. 5.3 Vorstellung des „Co-Trafficking“ der Δ C-TRPL-eGFP-Variante im Multimer mit intakten TRPL-HcRed Untereinheiten.

Die Deletion im Δ C-Terminus des TRPL-Kanals führt zum Verlust von Motiven, die für den rhabdomerischen Transport notwendig sind, aber die Assemblierung der Kanäle nicht beeinträchtigen. Die Überexpression intakter TRPL-HcRed-Untereinheiten führt zur Bildung von Δ C-TRPL-eGFP/TRPL-HcRed-Multimeren, die lichtabhängig in das Rhabdomer translozieren. Das TRPL-HcRed enthält die Motive, die für die

Translokation notwendig sind. Die Wechselwirkung des Δ C-TRPL-eGFP mit TRPL-HcRed erfolgt über den intakten N-Terminus des Δ C-TRPL-eGFP.

Die mikroskopische Untersuchung der subzellulären Verteilung der eGFP-markierten TRP/TRPL-Chimären sollte helfen, die notwendigen und/oder ausreichenden Bereiche auf den N- und/oder den C-Terminus von TRPL-eGFP einzugrenzen.

	TRPL- eGFP		TRP- eGFP	
	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel
<i>wt</i>	Intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere	Rhabdomere	Rhabdomere
<i>trpl³⁰²</i>	Intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere	Rhabdomere	Rhabdomere
<i>trp⁹</i>	Rhabdomere	Rhabdomere	Rhabdomere (diffus)	Rhabdomere (diffus)
<i>trpl³⁰²; trp⁹</i>	Rhabdomere	Rhabdomere		

Tab. 5.1 Einfluss der endogenen TRP und TRPL-Kanäle auf die subzelluläre Lokalisation von TRP- und TRPL-eGFP. Die Verteilung der rekombinanten Proteine wurde anhand der GFP-Fluoreszenz in *wt* und *trp/trpl*-Mutanten, (hell- und dunkeladaptierte) untersucht

	Chimäre 1		Chimäre 2		Chimäre 3	
	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel	Hell	Dunkel
<i>wt</i>	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Rhabdomere
<i>trpl³⁰²</i>	Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Rhabdomere
<i>trp⁹</i>	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Rhabdomere	Rhabdomere
<i>trpl³⁰²; trp⁹</i>	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomere	Intrazelluläres Kompartiment	Intrazelluläres Kompartiment/ Rhabdomer	Intrazelluläres Kompartiment	Rhabdomere	Rhabdomere

Tab. 5.2 Einfluss der endogenen TRP und TRPL-Kanäle auf die subzelluläre Lokalisation von TRP- und TRPL-eGFP. Die Verteilung der rekombinanten-Proteine wurde anhand der GFP-Fluoreszenz in *wt* und *trp/trpl*-Mutanten, (hell- und dunkeladaptierte) untersucht (Fettdruck zeigt stärkere Anreicherung im betreffenden Kompartiment).

Die Tabellen 5.1 und 5.2 zeigen eine Zusammenfassung der subzellulären Verteilung von Chimäre 1-3 im Vergleich mit TRPL-eGFP/TRP-eGFP in hell- und dunkeladaptierten Fliegen mit unterschiedlichem Bestand an endogenen TRP-Kanälen. Chimäre 1 und 2 sind, abhängig von den vorhandenen endogenen Kanälen, in unterschiedlichem Maße auf die Rhabdomere oder das intrazelluläre Kompartiment verteilt.

Die Abhängigkeit der Anreicherung von den Lichtverhältnissen und den endogenen Kanal-Untereinheiten wird aus der Tabelle deutlich. In *wildtypischen* Fliegen und *trpl*³⁰²-Mutanten reicherten sich Chimäre 1 und Chimäre 2 tendenziell nach Helladaptation im Rhabdomer und nach Inkubation im Dunkeln im intrazellulären Kompartiment an.

Die lichtabhängige Anreicherung der chimären Proteine in einem der beiden Kompartimente ist in der *trpl*³⁰²-Mutante ausgeprägter als in *wt*-Fliegen. Die Anreicherung beider Proteine im Rhabdomer ist lichtabhängig, erfolgt jedoch im Gegensatz zu TRPL in lichtadaptierten Fliegen. Die Anreicherung von Chimäre 1 und 2 ist nicht vollständig; die GFP-Fluoreszenz ist nicht auf das intrazelluläre oder rhabdomerische Kompartiment beschränkt. Die direkte Wechselwirkung mit endogenem TRPL könnte für die unvollständige Verteilung der Chimären in *wt*-Fliegen verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung für die unerwartete Anreicherung der Chimäre 1 und 2 könnten die sowohl im N- als auch im C-Terminus von TRPL vorhergesagten ER-Retentionsmotive (N-Terminus: ²GRKK⁵; C-Terminus: ¹¹²⁰PKHR¹¹²⁴; PSORT II, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>; Nakai und Horton, 1997) sein. Je eines dieser Motive wurde in Chimäre 1 und 2 auf den TRP-„Rumpf“ übertragen.

Ein markanter Unterschied zwischen dem Translokationsverhalten der beiden chimären Proteine ist, dass Chimäre 2 ohne endogenes TRP nicht bzw. geringfügig in das Rhabdomer transportiert wird. Da die Chimäre 2 die einzige der untersuchten Fusionsproteine ist, die physisch mit TRP interagiert, handelt es sich möglicherweise nicht um eine autonome Translokation der mutierten Kanal-Untereinheit, sondern um eine Co-Translokation mit endogenem TRP.

Chimäre 3 phänotypisiert in allen untersuchten Mutanten das Translokationsverhalten des TRPL-eGFP. Chimäre 3 wird in lichtadaptierten Fliegen vom Rhabdomer in das intrazelluläre Membrankompartiment transportiert. Der Transport erfolgt autonom, d.h. ohne die Beteiligung endogener TRPL-Untereinheiten. Darüber hinaus benötigt das Chimäre 3-Protein wie TRPL-eGFP für den Export aus dem Rhabdomer das TRP.

Chimäre 3 zeigt, dass durch Übertragung beider Termini auf die TRP-TM-Domäne der Phänotyp des TRPL-eGFP kopiert wird. Die Übertragung der Translokations-Eigenschaft von TRPL auf TRP war in diesem Fall erfolgreich. Somit ist der N- und C-Terminus für die Translokation von TRPL-eGFP ausreichend und notwendig.

5.6 Funktionelle Wechselwirkung zwischen TRP und TRPL

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von TRP und TRPL in helladaptierten Retinae ist ein direkter Hinweis, dass TRP/TRPL-Heteromere nicht die vorherrschende Kanalspezies darstellen. Der TRPL/TRPL-eGFP-Transport in das intrazelluläre Speicherkompartiment benötigt die Anwesenheit von funktionellen TRP-Protein (Bähner *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006; und Cronin *et al.*, 2006). Als mögliche Ursache für die TRP-Abhängigkeit der TRPL-Translokation aus dem Rhabdomer wurde die Heteromerbildung mit TRP diskutiert (Montell, 2005). Die Ergebnisse der Immunopräzipitation eGFP-markierter Kanaluntereinheiten (diese Arbeit) sprechen gegen diese Vermutung. Alternativ könnte der TRPL-Exportdefekt eine indirekte Folge der Fehlverteilung des INAD-Signalkomplexes in der *trp*⁹-Mutante sein, wie von Li und Montell 2000 beschrieben. *Drosophila*-TRP trägt neben seiner Funktion als Kationen-Kanal auch durch die Verankerung des Transduktionskomplexes („Signalplex“, „Transducisom“) an der Plasmamembran zur räumlichen Organisation der Sehkaskade bei. Das lösliche INAD-Gerüstprotein bindet viele Schlüssel-Komponenten der Phototransduktionskaskade über PDZ-Domänen (Xu und Montell, 1998; Tsunoda *et al.*, 2001). Sowohl TRP als auch INAD sind für die Retention des Transduktionskomplexes im Rhabdomer notwendig. Die Abhängigkeit des TRPL-Exports aus dem Rhabdomer kann somit eine indirekte Folge der Fehlverteilung einer dieser Komponenten sein. In der amorphen *trp*⁹-Mutante ist kein TRP-Protein nachweisbar und der Transduktionskomplex kann nicht langfristig in der rhabdomerischen Membran verankert werden. (Xu und Montell 1998; Li und Montell 2000; Tsunoda *et al.* 2001). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Wanderung des TRPL in das intrazelluläre Speicherkompartiment ein Ca²⁺-abhängiger Prozess ist. Der TRP-Kanal, der nach Aktivierung selektiv einen Ca²⁺-Einstrom vermittelt, würde in diesem Fall durch eine lichtabhängige Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration auf den TRPL-Transport wirken. Die Überexpression von Calx-Protein, einem Ca²⁺-Transporter, der Ca²⁺ aus den Photorezeptorzellen entfernt, in der Retina verringert die Menge an intrazellulärem Calcium (Wang *et al.*, 2005 a). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Transportdefekt von TRPL-eGFP, der in der *trp*⁹-Mutante beobachtet wurde, auch bei Überexpression von Calx auftritt. Den gleichen Effekt hatte das TRP¹⁴-Protein auf die TRPL-eGFP-Translokation. *trp*¹⁴-Fliegen exprimieren eine TRP-Variante, in der die Calciumselektivität des Kanals verringert ist. Die Ausbildung des Signalplex wird von der Mutation nicht beeinflusst (Wang *et al.*, 2005). Die Verringerung der rhabdomerischen Calcium-Menge war trotz vorhandenem TRP¹⁴-Proteins ausreichend, um die Internalisierung des TRPL zu unterbinden. Der Translokations-Defekt des TRPL in *trp*⁹ wird dadurch hinreichend erklärt, ohne die Annahme, dass eine direkte Wechselwirkung mit TRP notwendig ist. Der Einfluss erhöhter Calcium-Konzentration auf die TRPL-Translokation

wurde zuvor in der dominant-aktiven *trp*³⁶⁵-Mutante untersucht (Cronin *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2006). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration ist aufgrund der konstitutiv geöffneten TRP-Variante stark erhöht (Yoon *et al.*, 2000). Das TRPL war nur in sehr jungen Fliegen (<4h nach dem Schlüpfen) im Rhabdomer zu finden. In Fliegen, die älter als 4h nach dem Schlüpfen untersucht wurden, war TRPL unabhängig von den verwendeten Lichtbedingungen im intrazellulären Speicherkompartiment. Die *trp*³⁶⁵-Mutante zeigt eine starke Degeneration der Retinazellen (Yoon *et al.*, 2000). Dies erschwert es, zwischen einer direkten physiologischen Calcium-Wirkung und einem degenerationsbedingten Effekt zu unterscheiden. Die Calcium-Konzentration in den Photorezeptorzellen der *calx*^B-Mutante ist ebenfalls erhöht, wirkt sich jedoch nicht auf die TRPL-eGFP Translokation aus. Der Unterschied liegt wahrscheinlich in der hypomorphen Natur des *calx*^B-Allels, welches in Verbindung mit dem ebenfalls in der Retina nachgewiesenen redundanten NCKX30C - Calcium/Natrium-Transporter nicht ausreicht, um den TRPL-Transport zu inhibieren.

5.7 Elektrophysiologie

Als Hauptaufgabe für TRPL wird gegenwärtig die Vergrößerung des Arbeitsbereiches der Photorezeptoren für unterschiedliche Lichtintensitäten diskutiert (Leung *et al.*, 2000; Bähner *et al.*, 2002). Durch Elektoretinographie (ERG) können keine physikalischen Kennwerte für einzelne Kanäle ermittelt werden; der zelluläre Kontext der Kanäle bleibt mit dieser Methode aber erhalten. Dadurch eignet sich die ERG gut für die Untersuchung der Adaptation der Retina an Lichtbedingungen unterschiedlicher Quantität und Qualität.

Die Untersuchung der chimären Untereinheiten in *trpl*³⁰² *trp*⁹-Doppelmutanten erbrachte, dass Chimäre 1-3 ein Photorezeptorpotential ausbilden können. Dies lässt darauf schließen, dass die chimären Kanäle in der *trpl*³⁰²; *trp*⁹-Doppelmutante als Homo-Multimere vorliegen. Alle drei Chimären zeigen einen transienten ERG-Phänotyp in der *trp*⁹ *trpl*³⁰²-Doppelmutante. Dieser Phänotyp wird auf ein Absinken der rhabdomerischen Ca²⁺-Konzentration ohne den Ca²⁺-selektiven TRP-Kanal zurückgeführt. Aktuelle Untersuchungen von Reuss *et al.* 1997 und Kwon *et al.* 2006 lassen vermuten, dass der rhabdomerische Ca²⁺-Einstrom für die Regeneration von PIP₂ benötigt wird. Da PIP₂ für die weitere Öffnung von TRP Kanälen notwendig ist, werden nach dem Erschöpfen des PIP₂-Pools keine weiteren Kanäle geöffnet. Der transiente Phänotyp der chimären Kanäle ist somit ein möglicher Hinweis auf eine verringerte Calcium-Permeabilität.

Die Ionenselektivität ist neben der Leitfähigkeit einer der wichtigsten Kennwerte, die zur Charakterisierung eines Ionenkanals verwendet werden. Für den TRPV6-Kanal konnte

anhand von Einzelkanalableitung gezeigt werden, dass die Porenregion für die Ionenselektivität verantwortlich ist (Bödding und Flockerzi, 2004; Voets *et al.*, 2004). Die Porenregion der TRP-Kanäle wird wahrscheinlich von der S4-S5-Region und der verbindenden, extrazellulären Schleife gebildet. Eine aktuelle Arbeit führte die unterschiedliche Ionenselektivität von TRP und TRPL auf einen Asp⁶²¹-Rest in der Porenregion zurück (Liu *et al.*, 2007). Im Falle des *Drosophila* TRP-Kanals ist die Poren-Region nicht der einzige an der Ionenselektivität beteiligte Bereich. Die As-Substitution R671Q in der TRP-Domäne des TRP-Proteins (Wang *et al.*, 2006) führt ebenfalls zum Verlust der Selektivität für Ca²⁺. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung C-terminaler Bereiche des TRP an der Ionenselektivität. Untersuchungen an TRPC5 legen ebenfalls nahe, dass basische Reste in der C-terminal gelegenen TRP-Box-Region die Leitfähigkeit der Kanäle modulieren können. (Obukhov *et al.*, 2005). Die Untersuchung der chimären TRP/TRPL-Kanäle könnte einen Beitrag der C/N-Termini zu den elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle zeigen, wie sie aus den ERG Messung der chimären Untereinheiten nahe gelegt werden.

Das Chimäre 1-Protein wurde mit der Annahme konstruiert, dass die geringe Sequenz-Identität zwischen den cytosolischen C-Termini von TRP und TRPL für das unterschiedliche Translokationsverhalten der beiden Proteine verantwortlich sein könnte. Mit der Annahme, dass der C-Terminus die unterschiedliche Wirkung von Thapsigargin auf TRP und TRPL erklärt, konstruierten Sinkins und Mitarbeiter ein chimäres Protein aus TRPL und TRP, welches sich lediglich durch das Fehlen der eGFP-Fusion am C-Terminus von der Chimäre 1 in dieser Arbeit unterschied (Sinkins *et al.*, 1995). Die von Sinkins untersuchte Mutante sollte auch den Beitrag des C-Terminus zur Permeabilität heterolog exprimierter TRP- und TRPL-Kanäle erklären. Während TRP in Sf9 Zellen regulierbare calcium-selektive Kanäle bildet, die Thapsigargin aktivierbar sind, sind TRPL Kanäle in diesem System konstitutiv offen und wenig selektiv für Kationen. Die Autoren zeigten, dass die C-Termini beider Proteine für die Thapsigargin-abhängige Regulation des TRP Kanals verantwortlich sind, aber die Ionenselektivität nicht beeinflussen. Aus heutiger Sicht gelten die Ergebnisse der Autoren in vielen Punkten überholt. TRP und TRPL werden *in vivo* nicht durch Calcium-Einstrom aus dem ER aktiviert, des Weiteren ist TRPL *in vivo* nicht konstitutiv aktiv (Leung *et al.*, 2002). Da Thapsigargin über die Inhibition einer ER residenten Calcium-ATPase wirkt, ist die Thapsigargin abhängige Aktivierung des TRP ein Artefakt des verwendeten Expressionssystems.

Dass der C-Terminus wichtige Motive für die Regulierung des Kanals enthält, wird aus der Arbeit von Scott *et al.* 1997 ersichtlich. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Deletion der Calmodulin-Bindungsstellen in TRPL zur verzögerten Inaktivierung des Kanals führt. Die Untersuchung der chimären Proteine durch Einzelzell-Ableitungen isolierter Ommatidien

hingegen könnte zur Bestimmung der Permeabilität, Selektivität und Leitfähigkeit der Chimären beitragen.

Die Chimäre 1 erwies sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften als TRPL ähnlich. Die Expression von Chimäre 1 in der *trpl*³⁰²-Mutante unterdrückte die *trpl*³⁰²-typischen 75 Hz-Oszillationen. Die Photorezeptoren verfügten darüber hinaus über ein deutliches „on-transient“. Die Werte des Hill-Koeffizienten als Maß für die relative Sensitivität der Photorezeptoren liegen für Chimäre 1, *trpl*³⁰²-Fliegen zwischen den Werten der *trpl*³⁰²-Mutante und dem *wt*. Für die stärkste verwendete Hintergrundbeleuchtung nimmt der Hill-Koeffizient weitgehend wildtypische Werte an. Der anhand von Reizintensitäts-Reizantwort-Kurven gemessene Arbeitsbereich der Photorezeptoren ist annähernd wildtypisch in Chimäre 1, *trpl*³⁰². Das ERG von Fliegen die die Chimäre 1 in der amorphen *trp*⁹-Mutante exprimieren ist transient. Die ERG-Eigenschaften der Chimäre 1 sind somit den ERG Eigenschaften von TRPL-eGFP/TRPL ähnlicher als dem TRP-eGFP. Diese Daten legen nahe, dass der C-Terminus von TRPL einen wesentlichen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des Ionenkanals hat. Die Expression von Chimäre 2 oder Chimäre 3 in *trpl*³⁰² unterdrückte die für *trpl*³⁰² typischen 75 Hz-Oszillationen. Die Photorezeptoren der Chimäre 2, *trpl*³⁰², und Chimäre 3, *trpl*³⁰² bilden im ERG

jedoch kein „on-transient“ aus. Die Expression von Chimäre 2 und 3 war wie Chimäre 1 nicht ausreichend, um den transienten ERG-Phänotyp der *trp*⁹-Mutante zu komplementieren. Der Einfluss des C-Terminus auf biophysikalische Eigenschaften ist möglicherweise ein Regulations-Prinzip, welches für TRP-Kanäle unterschiedlicher Familien und Organismen zutrifft. So erwiesen sich die C-Termini des kältesensitiven TRPM8 und des wärmesensitiven TRPV1 als ausschlaggebend für die Temperaturabhängigkeit der Kanal-Öffnung. Chimären aus TRPM8/TRPV1 zeigten die Temperaturabhängigkeit der Kanal-Öffnung wie der Kanal, von dem der C-Terminus stammt. (Brauchi *et al.*, 2006)

Durch Co-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit hergestellten TRP/TRPL-Chimären Heteromere mit endogenem TRPL bilden. In diesen Heteromeren werden die Poren aus TRP und TRPL-Regionen gebildet. Die Untersuchungen dieser „Mischporen“ mittels Einzelzell-Ableitungen könnten zusätzliche Hinweise auf die Beteiligung des C-/N-Terminus an der Leitfähigkeit und Permeabilität des TRPL bringen. Gillo und Mitarbeiter haben in heterolog co-exprimierten TRP/TRPL-Kanälen demonstriert, dass La³⁺ den Einzelkanal-Strom von TRP/TRPL-Mischporen inhibiert (Gillo *et al.*, 1996). *In situ*-Messungen an isolierten Ommatidien zeigen im Gegensatz dazu, dass nur TRP durch La³⁺ inhibiert wird (Reuss und Hardie, 1998).

6. Literaturverzeichnis

- A.A. Alawi, W L. Pak Science. 4;172(987):1055-7(1971)
- H.Amiri, G.Schultz, and M.Schaefer. Cell Calcium **33**, 463 (2003).
- M.Arniges, J.M.Fernandez-Fernandez, N.Albrecht, M.Schaefer, and M.A.Valverde. J. Biol. Chem. **281**, 1580 (2006).
- M.Bahner, S.Frechter, N.Da Silva, B.Minke, R.Paulsen, and A.Huber. Neuron **34**, 83 (2002).
- A.J.Beevers and A.Kukol. Protein Sci **15**, 1127 (2006).
- C.D.Benham, J.B.Davis, and A.D.Randall. Neuropharmacology **42**, 873 (2002).
- V.J.Bezzerides, I.S.Ramsey, S.Kotecha, A.Greka, and D.E.Clapham. Nat Cell Biol **6**, 709 (2004).
- B.T.Bloomquist, R.D.Shortridge, S.Schneuwly, M.Perdew, C.Montell, H.Steller, G.Rubin, and W.L.Pak. Cell **54**, 723 (1988).
- M.Bodding and V.Flockerzi. J. Biol. Chem. **279**, 36546 (2004).
- A.H.Brand and N.Perrimon. Development **118**, 401 (1993).
- S.Brauchi, G.Orta, M.Salazar, E.Rosenmann, and R.Latorre. J. Neurosci. **26**, 4835 (2006).
- M.J.Caterina, M.A.Schumacher, M.Tominaga, T.A.Rosen, J.D.Levine, and D.Julius. Nature **389**, 816 (1997).
- Q.Chang, E.Gyftogianni, S.F.J.van de Graaf, S.Hoefs, F.A.Weidema, R.J.M.Bindels, and J.G.J.Hoenderop. J. Biol. Chem. **279**, 54304 (2004).
- J.Chevesich, A.J.Kreuz, and C.Montell. Neuron **18**, 95 (1997).
- S.Chyb, P.Raghu, and R.C.Hardie. Nature **397**, 255 (1999).
- D.E.Clapham, L.W.Runnels, and C.Strubing. Nat Rev Neurosci **2**, 387 (2001).
- D.E.Clapham. Nature **426**, 517 (2003).
- B.Cook and B.Minke. Cell Calcium **25**, 161 (1999).
- Cosens, D. J., and A. Manning. (1969) *Nature*.224:285-287.

- M.A.Cronin, M.H.Lieu, and S.Tsunoda. *J Cell Sci* **119**, 2935 (2006).
- A.B.Cubitt, R.Heim, S.R.Adams, A.E.Boyd, L.A.Gross, and R.Y.Tsien. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 448 (1995).
- V.Denis and M.S.Cyert. *J. Cell Biol.* **156**, 29 (2002).
- M.Engelke, O.Friedrich, P.Budde, C.Schafer, U.Niemann, C.Zitt, E.Jungling, O.Rocks, A.Luckhoff, and J.Frey. *FEBS Letters* **523**, 193 (2002).
- I.Erler, D.Hirnet, U.Wissenbach, V.Flockerzi, and B.A.Niemeyer. *J. Biol. Chem.* **279**, 34456 (2004).
- N. Franceschini , K. Kirschfeld *Kybernetik.* Jan;8(1):1-13.(1971)
- N. Franceschini , K. Kirschfeld *Kybernetik.* Nov;9(5):159-82. (1971)
- Z.Gao, D.M.Ruden, and X.Lu. *Current Biology* **13**, 2175 (2003).
- Z.Gao, E.Joseph, D.M.Ruden, and X.Lu. *J. Biol. Chem.* **279**, 14225 (2004).
- N.Garcia-Sanz, A.Fernandez-Carvajal, C.Morenilla-Palao, R.Planells-Cases, E.Fajardo-Sanchez, G.Fernandez-Ballester, and A.Ferrer-Montiel. *J. Neurosci.* **24**, 5307 (2004).
- M.S.Gelman, W.Chang, D.Y.Thomas, J.J.M.Bergeron, and J.M.Prives. *J. Biol. Chem.* **270**, 15085 (1995).
- C.Gengs, H.T.Leung, D.R.Skingsley, M.I.lovchev, Z.Yin, E.P.Semenov, M.G.Burg, R.C.Hardie, and W.L.Pak. *J. Biol. Chem.* **277**, 42113 (2002).
- H.H.Gerdes and C.Kaether. *FEBS Letters* **389**, 44 (1996).
- B.Gillo, I.Chorna, H.Cohen, B.Cook, I.Manistersky, M.Chorev, A.Arnou, J.á.Pollock, Z.Selinger, and B.Minke. *PNAS* **93**, 14146 (1996).
- M.Goel, R.Garcia, M.Estacion, and W.P.Schilling. *J. Biol. Chem.* **276**, 38762 (2001).
- M.Goel, W.G.Sinkins, and W.P.Schilling. *J. Biol. Chem.* **277**, 48303 (2002).
- D.Grabs, V.I.Slepnev, Z.Songyang, C.David, M.Lynch, L.C.Cantley, and P.De Camilli. *J. Biol. Chem.* **272**, 13419 (1997).
- W.N.Green. *J. Gen. Physiol.* **113**, 163 (1999).

LITERATURVERZEICHNIS

- Greenspan R.J Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1996)
- K.Groschner, S.Hingel, B.Lintschinger, M.Balzer, C.Romanin, X.Zhu, and W.Schreibmayer. FEBS Letters **437**, 101 (1998).
- R.C.Hardie and B.Minke. Neuron **8**, 643 (1992).
- R.C.Hardie. J Exp Biol **204**, 3403 (2001).
- R.C.Hardie and P.Raghu. Nature **413**, 186 (2001).
- R.C.Hardie, P.Raghu, S.Moore, M.Juusola, R.A.Baines, and S.T.Sweeney. Neuron **30**, 149 (2001).
- C.Harteneck, T.D.Plant, and G.Schultz. Trends in Neurosciences **23**, 159 (2000).
- K.Haug-Collet, B.Pearson, R.Weibel, R.T.Szerencsei, R.J.Winkfein, P.P.M.Schnetkamp, and N.J.Colley. J. Cell Biol. **147**, 659 (1999).
- L.M.Hawkins, K.Prybylowski, K.Chang, C.Moussan, F.A.Stephenson, and R.J.Wenthold. J. Biol. Chem. **279**, 28903 (2004).
- M.Heisenberg. J Exp Biol **55**, 85 (1971).
- N.Hellwig, N.Albrecht, C.Harteneck, G.Schultz, and M.Schaefer. J Cell Sci **118**, 917 (2005).
- S.R.Henderson, H.Reuss, and R.C.Hardie. J Physiol (Lond) **524**, 179 (2000).
- B.J.Hillier, K.S.Christopherson, K.E.Prehoda, D.S.Bredt, and W.A.Lim. Science **284**, 812 (1999).
- T.Hofmann, M.Schaefer, G.Schultz, and T.Gudermann. PNAS **99**, 7461 (2002).
- C.L.Huang. J Am Soc Nephrol **15**, 1690 (2004).
- A.Huber, P.Sander, and R.Paulsen. J. Biol. Chem. **271**, 11710 (1996).
- K.Itagaki, K.B.Kannan, B.B.Singh, and C.J.Hauser. J Immunol **172**, 601 (2004).
- R.Jahnel, M.Dreger, C.Gillen, O.Bender, J.Kurreck, and F.Hucho. European Journal of Biochemistry **268**, 5489 (2001).
- W.James. J Gen Virol **88**, 351 (2007).
- X.Jin, J.Touhey, and R.Gaudet. J. Biol. Chem. **281**, 25006 (2006).

- M.E.Johansen, C.A.Reilly, and G.S.Yost. *Toxicol. Sci.* **89**, 278 (2006).
- S.Jors, V.Kazanski, A.Foik, D.Krautwurst, and C.Harteneck. *J. Biol. Chem.* **281**, 29693 (2006).
- A.M.Jose, I.A.Bany, D.L.Chase, and M.R.Koelle. *Genetics* **175**, 93 (2007).
- M.Kanzaki, Q.You, H.Mashima[ast], L.Li[ast], H.Shibata[ast], and I.Kojima. *Nat Cell Biol* **1**, 165 (1999).
- N.Kedei, T.Szabo, J.D.Lile, J.J.Treanor, Z.Olah, M.J.Iadarola, and P.M.Blumberg. *J. Biol. Chem.* **276**, 28613 (2001).
- J.Kim, Y.D.Chung, D.y.Park, S.Choi, D.W.Shin, H.Soh, H.W.Lee, W.Son, J.Yim, C.S.Park, M.J.Kernan, and C.Kim. *Nature* **424**, 81 (2003).
- J.Y.Kim, W.Zeng, K.Kiselyov, J.P.Yuan, M.H.Dehoff, K.Mikoshiba, P.F.Worley, and S.Muallem. *J. Biol. Chem.* **281**, 32540 (2006).
- S.J.Kim, Y.S.Kim, J.P.Yuan, R.S.Petralia, P.F.Worley, and D.J.Linden. *Nature* **426**, 285 (2003).
- K.Kiselyov, A.Soyombo, and S.Muallem. *J Physiol (Lond)* **578**, 641 (2007).
- M.Konrad, K.P.Schlingmann, and T.Gudermann. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F599 (2004).
- M J. Kramer and B E. Staveley *Genet. Mol. Res.* **2** (1): 43-47 (2003)
- J.W.Landsberg and J.X.J.Yuan. *News Physiol Sci* **19**, 44 (2004).
- S.B. Laughlin, Neural principles in the peripheral visual systems of invertebrates. In: H.J. Autrum, Editor, *Handbook of Sensory Physiology* vol VII/6B, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1981), pp. 133–280.
- P.K.Lepage, M.P.Lussier, H.Barajas-Martinez, S.M.Bousquet, A.P.Blanchard, N.Francoeur, R.Dumaine, and G.Boulay. *J. Biol. Chem.* **281**, 30356 (2006).
- H.T.Leung, C.Geng, and W.L.Pak. *J. Neurosci.* **20**, 6797 (2000).
- C.H.Liu, T.Wang, M.Postma, A.G.Obukhov, C.Montell, and R.C.Hardie. *J. Neurosci.* **27**, 604 (2007).
- X.Liu, B.C.Bandyopadhyay, B.B.Singh, K.Groschner, and I.S.Ambudkar. *J. Biol. Chem.* **280**, 21600 (2005).

- T.Lockwich, B.B.Singh, X.Liu, and I.S.Ambudkar. *J. Biol. Chem.* **276**, 42401 (2001).
- T.P.Lockwich, X.Liu, B.B.Singh, J.Jadlowiec, S.Weiland, and I.S.Ambudkar. *J. Biol. Chem.* **275**, 11934 (2000).
- M.P.Lussier, S.Cayouette, P.K.Lepage, C.L.Bernier, N.Francoeur, M.St Hilaire, M.Pinard, and G.Boulay. *J. Biol. Chem.* **280**, 19393 (2005).
- M.R.MacPherson, V.P.Pollock, L.Kean, T.D.Southall, M.E.Giannakou, K.E.Broderick, J.A.T.Dow, R.C.Hardie, and S.A.Davies. *Genetics* **169**, 1541 (2005).
- JS. Mann, A.R Lambkin *Expert Rev Anti Infect Ther.* Aug;1(2):337-42. (2003).
- C.J.McCleverty, E.Koesema, A.Patapoutian, S.A.Lesley, and A.Kreusch. *Protein Sci* **15**, 2201 (2006).
- L.Mery, B.Strauss, J.F.Dufour, K.H.Krause, and M.Hoth. *J Cell Sci* **115**, 3497 (2002).
- N.E.Meyer, T.Joel-Almagor, S.Frechter, B.Minke, and A.Huber. *J Cell Sci jcs* (2006).
- P.Michaely and V.Bennett. *J. Biol. Chem.* **268**, 22703 (1993).
- S. Michels, U. Schmidt-Erfurth, P J Rosenfeld *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Vol. 15, No. 7, 779-793 2006
- B.Minke and B.Cook. *Physiol. Rev.* **82**, 429 (2002).
- A.Miyawaki, J.Llopis, R.Heim, J.M.McCaffery, J.A.Adams, M.Ikura, and R.Y.Tsien. *Nature* **388**, 882 (1997).
- C.Montell and G.M.Rubin. *Neuron* **2**, 1313 (1989).
- C.Montell. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 231 (1999).
- C.Montell. *Sci. STKE* **2001**, re1 (2001).
- C.Montell, L.Birnbaumer, V.Flockerzi, R.J.Bindels, E.A.Bruford, M.J.Caterina, D.E.Clapham, C.Harteneck, S.Heller, and D.Julius. *Molecular Cell* **9**, 229 (2002).
- C.Montell, L.Birnbaumer, and V.Flockerzi. *Cell* **108**, 595 (2002).

LITERATURVERZEICHNIS

- C.Montell. *Sci. STKE* **2005**, re3 (2005).
- M.M.Moran, H.Xu, and D.E.Clapham. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 362 (2004).
- C.Morenilla-Palao, R.Planells-Cases, N.Garcia-Sanz, and A.Ferrer-Montiel. *J. Biol. Chem.* **279**, 25665 (2004).
- B.A.Niemeyer, E.Suzuki, K.Scott, K.Jalink, and C.S.Zuker. *Cell* **85**, 651 (1996).
- B.Nilius, G.Owsianik, T.Voets, and J.A.Peters. *Physiol. Rev.* **87**, 165 (2007).
- J.E.O'Tousa, W.Baehr, R.L.Martin, J.Hirsh, W.L.Pak, and M.L.Applebury. *Cell* **40**, 839 (1985).
- A G Obukhov, C Harteneck, A Zobel, R Harhammer, F Kalkbrenner, D Leopoldt, A Lückhoff, B Nürnberg, and G Schultz *EMBO J.* November 1; 15(21): 5833–5838. (1996)
- A.G.Obukhov and M.C.Nowycky. *J. Neurosci.* **25**, 1234 (2005).
- D. Y. Okuhara, A. Y. Hsia, M. Xie *Expert Opinion on Therapeutic Targets* March, Vol. 11, No. 3, Pages 391-401 (2007)
- HL. Ong, GJ. Barritt *Respirology* 9 (4), 448–457. (2004)
- B.Ordaz, J.Tang, R.Xiao, A.Salgado, A.Sampieri, M.X.Zhu, and L.Vaca. *J. Biol. Chem.* **280**, 30788 (2005).
- C.P.Palmer, X.L.Zhou, J.Lin, S.H.Loukin, C.Kung, and Y.Saimi. *PNAS* **98**, 7801 (2001).
- M.Parnas, B.Katz, and B.Minke. *J. Gen. Physiol.* **129**, 17 (2007).
- J.S.Patton, X.V.Gomes, and P.K.Geyer. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5859 (1992).
- R.Paulsen, M.Bähner, and A.Huber. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **439**, r181 (2000).
- S.Philipp, B.Strauss, D.Hirnet, U.Wissenbach, L.Mery, V.Flockerzi, and M.Hoth. *J. Biol. Chem.* **278**, 26629 (2003).
- A.M.Phillips, A.Bull, and L.E.Kelly. *Neuron* **8**, 631 (1992).
- K.L.Pierce, R.T.Premont, and R.J.Lefkowitz. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639 (2002).

LITERATURVERZEICHNIS

- R.Planelles-Cases, N.García-Sanz, C.Morenilla-Palao, and A.Ferrer-Montiel. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **451**, 151 (2005).
- O.Poirot, E.O'Toole, and C.Notredame. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3503 (2003).
- C.P.Ponting. *Protein Sci* **6**, 464 (1997).
- D.C.Prasher, V.K.Eckenrode, W.W.Ward, F.G.Predergast, and M.J.Cormier. *Gene* **111**, 229 (1992).
- P.Raghu, K.Usher, S.Jonas, S.Chyb, A.Polyanovsky, and R.C.Hardie. *Neuron* **26**, 169 (2000).
- H.Reuss, M.H.Mojet, S.Chyb, and R.C.Hardie. *Neuron* **19**, 1249 (1997).
- O.Rey, S.H.Young, R.Papazyan, M.S.Shapiro, and E.Rozengurt. *J. Biol. Chem.* **281**, 38730 (2006).
- C. Rezával, S. Werbach, M.F. Ceriani. *European Journal of Neuroscience* **25** (3), 683–694. (2007)
- A.K.Satoh, J.E.O'Tousa, K.Ozaki, and D.F.Ready. *Development* **132**, 1487 (2005).
- M.Schaefer, T.D.Plant, A.G.Obukhov, T.Hofmann, T.Gudermann, and G.Schultz. *J. Biol. Chem.* **275**, 17517 (2000).
- A.Scharenberg. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **451**, 220 (2005).
- S.Schillo, G.Belusic, K.Hartmann, C.Franz, B.Kuhl, G.Brenner-Weiss, R.Paulsen, and A.Huber. *J. Biol. Chem.* M404611200 (2004).
- J.P.Schoeber, C.N.Topala, X.Wang, R.J.Diepens, T.T.Lambers, J.G.Hoenderop, and R.J.Bindels. *J. Biol. Chem.* **281**, 29669 (2006).
- E.M.Schwarz and S.Benzer. *PNAS* **94**, 10249 (1997).
- K.Scott, Y.Sun, K.Beckingham, and C.S.Zuker. *Cell* **91**, 375 (1997).
- K.Scott and C.Zuker. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 383 (1998).
- B.H.Shieh and M.Y.Zhu. *Neuron* **16**, 991 (1996).
- B.B.Singh, X.Liu, and I.S.Ambudkar. *J. Biol. Chem.* **275**, 36483 (2000).

- B.B.Singh, X.Liu, J.Tang, M.X.Zhu, and I.S.Ambudkar. *Molecular Cell* **9**, 739 (2002).
- W.G.Sinkins, L.Vaca, Y.Hu, D.L.Kunze, and W.P.Schilling. *J. Biol. Chem.* **271**, 2955 (1996).
- W.G.Sinkins, M.Goel, M.Estacion, and W.P.Schilling. *J. Biol. Chem.* **279**, 34521 (2004).
- L.A.Smith, X.Wang, A.A.Peixoto, E.K.Neumann, L.M.Hall, and J.C.Hall. *J. Neurosci.* **16**, 7868 (1996).
- M.M. Smith, Lindstrom J., and Merlie J.P..*J. Biol.Chem.* 262:4367Ð4376 (1987)
- Z.Songyang, A.S.Fanning, C.Fu, J.Xu, S.M.Marfatia, A.H.Chishti, A.Crompton, A.C.Chan, J.M.Anderson, and L.C.Cantley. *Science* **275**, 73 (1997).
- DG Stavenga, RC Hardie (Herausgeber) *Facets of Vision* von Verlag: Springer-Verlag GmbH (1989)
- K.F.Stortkuhl, B.T.Hovemann, and J.R.Carlson. *J. Neurosci.* **19**, 4839 (1999).
- G.M.Story, A.M.Peier, A.J.Reeve, S.R.Eid, J.Mosbacher, T.R.Hricik, T.J.Earley, A.C.Hergarden, D.A.Andersson, and S.W.Hwang. *Cell* **112**, 819 (2003).
- C.Strubing, G.Krapivinsky, L.Krapivinsky, and D.E.Clapham. *Neuron* **29**, 645 (2001).
- C.Strubing, G.Krapivinsky, L.Krapivinsky, and D.E.Clapham. *J. Biol. Chem.* **278**, 39014 (2003).
- Z.Su, P.Csutora, D.Hunton, R.L.Shoemaker, R.B.Marchase, and J.E.Blalock. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1284 (2001).
- M.Sun, E.Goldin, S.Stahl, J.L.Falardeau, J.C.Kennedy, J.S.J.Acierno, C.Bove, C.R.Kaneski, J.Nagle, M.C.Bromley, M.Colman, R.Schiffmann, and S.A.Slaughaupt. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2471 (2000).
- D.Thevenin, T.Lazarova, M.F.Roberts, and C.R.Robinson. *Protein Sci* **14**, 2177 (2005).
- S.Torihashi, T.Fujimoto, C.Trost, and S.Nakayama. *J. Biol. Chem.* **277**, 19191 (2002).
- J.Tracey, R.I.Wilson, G.Laurent, and S.Benzer. *Cell* **113**, 261 (2003).
- M.Trebak, G.Vazquez, G.S.Bird, and J.Putney. *Cell Calcium* **33**, 451 (2003).
- L.Tsiokas, T.Arnoold, C.Zhu, E.Kim, G.Walz, and V.P.Sukhatme. *PNAS* **96**, 3934 (1999).

LITERATURVERZEICHNIS

- S.Tsunoda, J.Sierralta, Y.Sun, R.Bodner, E.Suzuki, A.Becker, M.Socolich, and C.S.Zuker. *Nature* **388**, 243 (1997).
- S.Tsunoda, Y.Sun, E.Suzuki, and C.Zuker. *J. Neurosci.* **21**, 150 (2001).
- H.R.Ueda, A.Matsumoto, M.Kawamura, M.Iino, T.Tanimura, and S.Hashimoto. *J. Biol. Chem.* **277**, 14048 (2002).
- S.F.J.van de Graaf, Q.Chang, A.R.Mensenkamp, J.G.J.Hoenderop, and R.J.M.Bindels. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 303 (2006).
- S.F.J.van de Graaf, J.G.J.Hoenderop, and R.J.M.Bindels. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F1295 (2006).
- K.Venkatachalam, T.Hofmann, and C.Montell. *J. Biol. Chem.* **281**, 17517 (2006).
- S.Vergarajauregui and R.Puertollano. *Traffic* **7**, 337 (2006).
- V.Vlachova, J.Teisinger, K.Susankova, A.Lyfenko, R.Ettrich, and L.Vyklicky. *J. Neurosci.* **23**, 1340 (2003).
- T.Voets, A.Janssens, G.Droogmans, and B.Nilius. *J. Biol. Chem.* **279**, 15223 (2004).
- J.Vriens, G.Owsianik, T.Voets, G.Droogmans, and B.Nilius. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **449**, 213 (2004).
- R.G.Walker, A.T.Willingham, and C.S.Zuker. *Science* **287**, 2229 (2000).
- G.X.Wang and M.m.Poo. *Nature* **434**, 898 (2005).
- T. Wang and C. Montell *J. Neurosci.*; 26: 12816-12825 (2006)
- T. Wang, H. Xu, J. Oberwinkler, Y. Gu, R. Hardie, C. Montell *Neuron*, **45**, 3, 367-378 (2005)
- T.J.Watnick, Y.Jin, E.Matunis, M.J.Kernan, and C.Montell. *Current Biology* **13**, 2179 (2003).
- P.D.Wes, J.Chevesich, A.Jeromin, C.Rosenberg, G.Stetten, and C.Montell. *PNAS* **92**, 9652 (1995).
- D.Wicher, H.J.Agricola, R.Schonherr, S.H.Heinemann, and C.Derst. *J. Biol. Chem.* **281**, 3227 (2006).

U. Wissenbach , B. A. Niemeyer and Veit Flockerzi Biology of the Cell Volume 96, Issue 1 , February 2004, 47-54

X.Wu, G.Babnigg, T.Zagranichnaya, and M.L.Villereal. J. Biol. Chem. **277**, 13597 (2002).

X.-Z.S.Xu, F.Chien, A.Butler, L.Salkoff, and C.Montell. Neuron **26**, 647 (2000).

X.Z.S.Xu, H.S.Li, W.B.Guggino, and C.Montell. Cell **89**, 1155 (1997).

X.Z.S.Xu, A.Choudhury, X.Li, and C.Montell. J. Cell Biol. **142**, 545 (1998).

F.Yang, L.G.Moss, and G.N.Phillips. Nat Biotech **14**, 1246 (1996).

T.T.Yang, P.Sinai, G.Green, P.A.Kitts, Y.T.Chen, L.Lybarger, R.Chervenak, G.H.Patterson, D.W.Piston, and S.R.Kain. J. Biol. Chem. **273**, 8212 (1998).

J.Yoon, H.C.Ben Ami, Y.S.Hong, S.Park, L.L.R.Strong, J.Bowman, C.Geng, K.Baek, B.Minke, and W.L.Pak. J. Neurosci. **20**, 649 (2000).

X.L.Zhou, A.F.Batiza, S.H.Loukin, C.P.Palmer, C.Kung, and Y.Saimi. PNAS **100**, 7105 (2003).

C.Zitt, A.Zobel, A.G.Obukhov, C.Harteneck, F.Kalkbrenner, A.Luckhoff, and G.Schultz. Neuron **16**, 1189 (1996).

C.S.Zuker, A.F.Cowman, and G.M.Rubin. Cell **40**, 851 (1985).

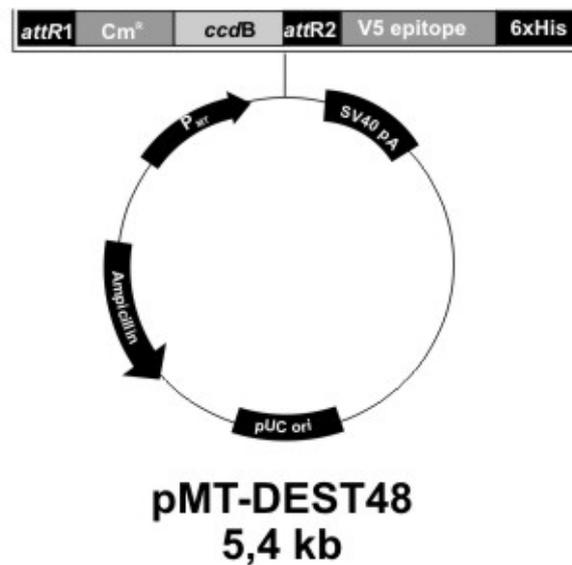
C.S.Zuker. PNAS **93**, 571 (1996).

7. Abkürzungen

A	Alanin
Aqua. bidest	doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BSA	Bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CBS	calmodulin binding site
cDNA	copy- Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
E	Glutamat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ePKC	eye spezifische Proteinkinase C
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Phenylalanin
FRET	Fluoreszenz- Resonanz- Energie- Transfer
G	Glycin
GFP	green fluorescent protein
G- Protein	Guanosinnukleotid- bindendes Protein
Gq	visuelles G- Protein
H	Histidin
IGF- 1	insulin- like growth factor- 1
INAD	inactivation no afterpotential D
IP ₃	Inositol-1, 4, 5- Triphosphat
K	Lysin
kDa	Kilodalton
M	Metarhodopsin
mRNA	messenger (Boten)- Ribonukleinsäure
<i>norp A</i>	no receptor potential A
NP- 40	Nonidet- P40
OD	Optische Dichte
P	Prolin

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PFO	Perfluorooctanoat
PIP ₂	Phosphatidylinositol- 4, 5- Bisphosphat
PLCβ	Phospholipase Cβ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PRM	Prolin reiches Motiv
PUFA	poly unsaturated fatty acids
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rhodopsin bzw. Arginin
R1- R8	Photorezeptorzellen 1- 8
RT	Raumtemperatur
S1- S6	Transmembransegment 1- 6
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	store operated channel
SOCE	store operated Ca ²⁺ entry
TBS, TBS- T	Tris buffered saline, TBS mit Tween 20
TRP	transient receptor potential
TRPL	transient receptor potential- like
TRPγ	transient receptor potential γ
TXEP	TritonX- 100 Extraktionspuffer
TXWP	TritonX- 100 Waschpuffer
u.a.	unter anderem
VAMP2	vesicle- associated membrane protein 2
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
<i>wt</i>	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

Keimbahntransformationsvektoren und S2-Zellkulturvektoren



Die Vektoren enthalten folgende Elemente:

Metallothionein Promotor

pUC origin Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

Chloramphenicol ,Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

Ampicillin (*bla*), Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)

ccdB (*controller of cell division or death B*), in *E. coli* selektierbare Marker

attR1 und *attR2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -

Excisionase/Integrase

rrnB T1 Terminator-Sequenz

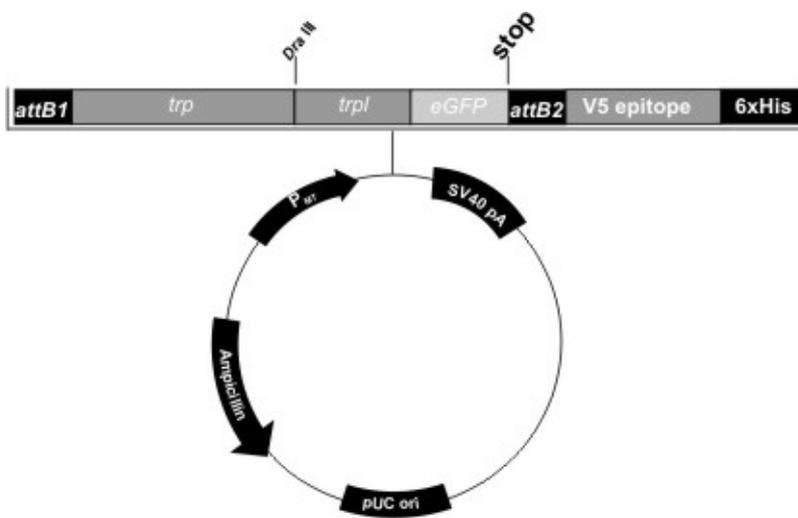
rrnB T2 Terminator-Sequenz

V5-Epitop

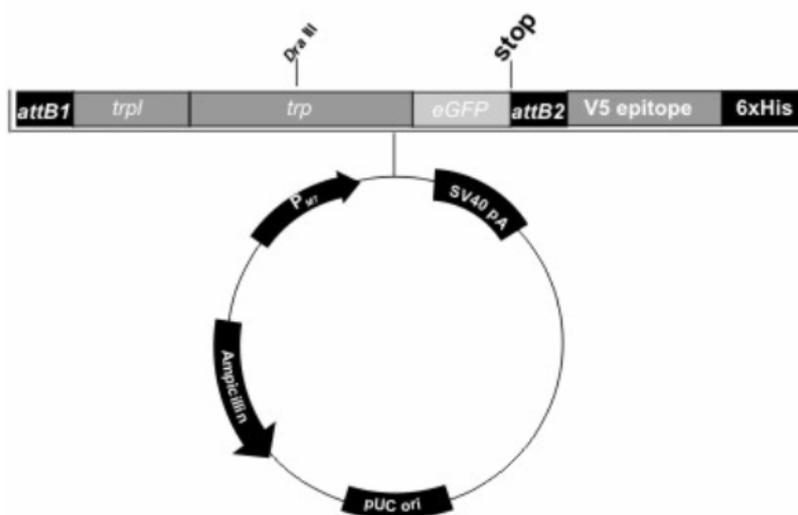
6xHis tag

SV40 late Polyadenylierungsregion

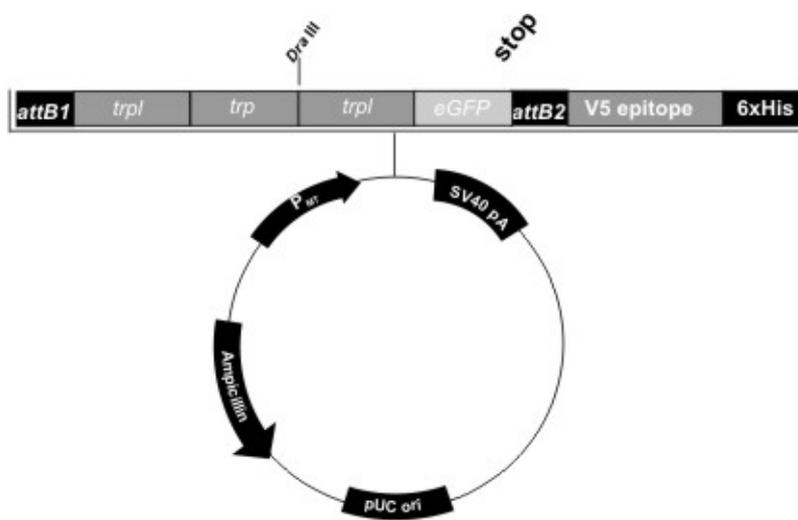
Ein käuflich erworbener Vektor (Invitrogen) zu konditionaler Expression in *Drosophila*-S2-Zellen. Die Expression erfolgt in Abhängigkeit von Kupfer-Ionen im Kulturmedium durch den Metallthionein-Promotor. Details siehe Gateway-Manual.



pMT48 Chimäre 1



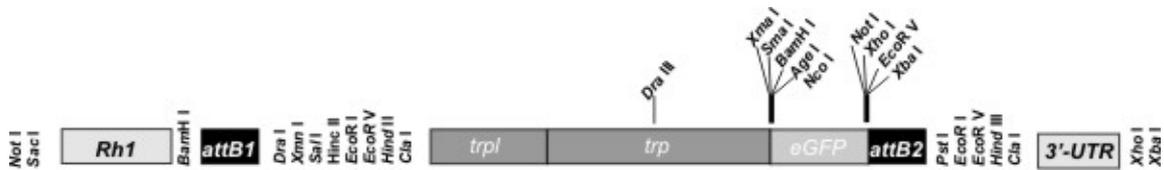
pMT48 Chimäre 2



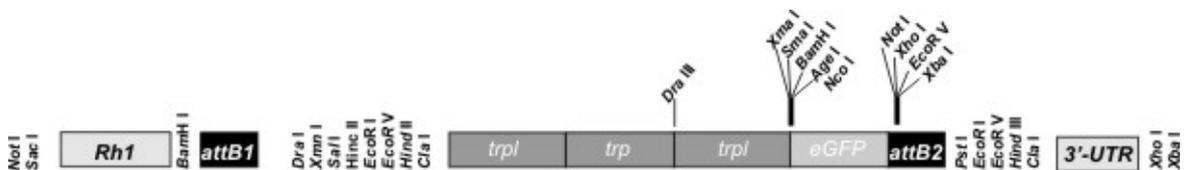
pMT48 Chimäre 3



pYC4Rh1-Chimäre 1

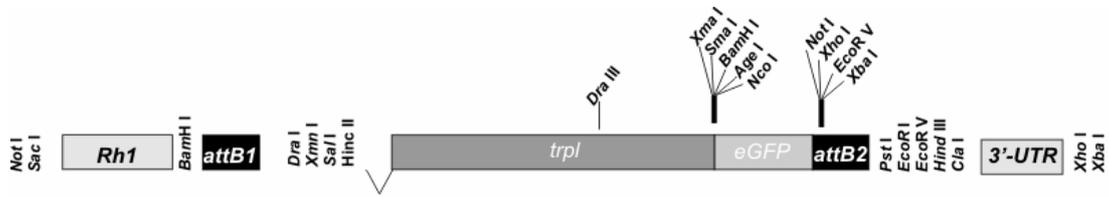


pYC4Rh1-Chimäre 2

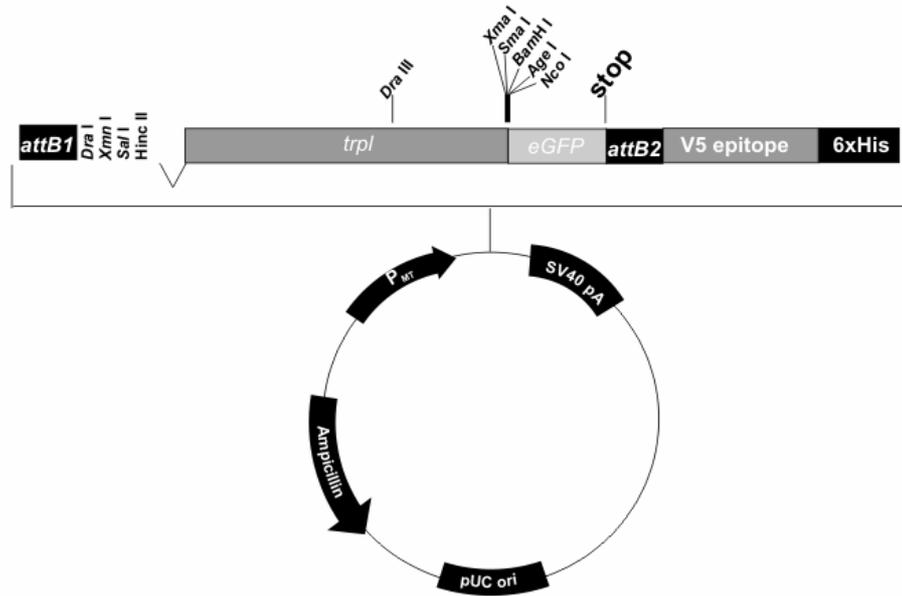


pYC4Rh1-Chimäre 3

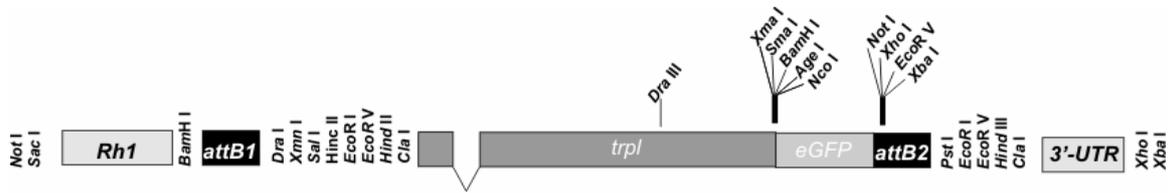
Der Ausschnitt aus den pYC4-Rh1-Vektoren enthält folgende Elemente:
 Rh1, *ninaE* Minimalpromotor (bp -833-+67) (nach Mismar 1987)
 3' UTR- 600 bp des *ninaE* Gens
attB1 und *attB2*, „attachment-sites“-Erkennungs-/Schnittstellen für λ -
 Excisionase/Integrase



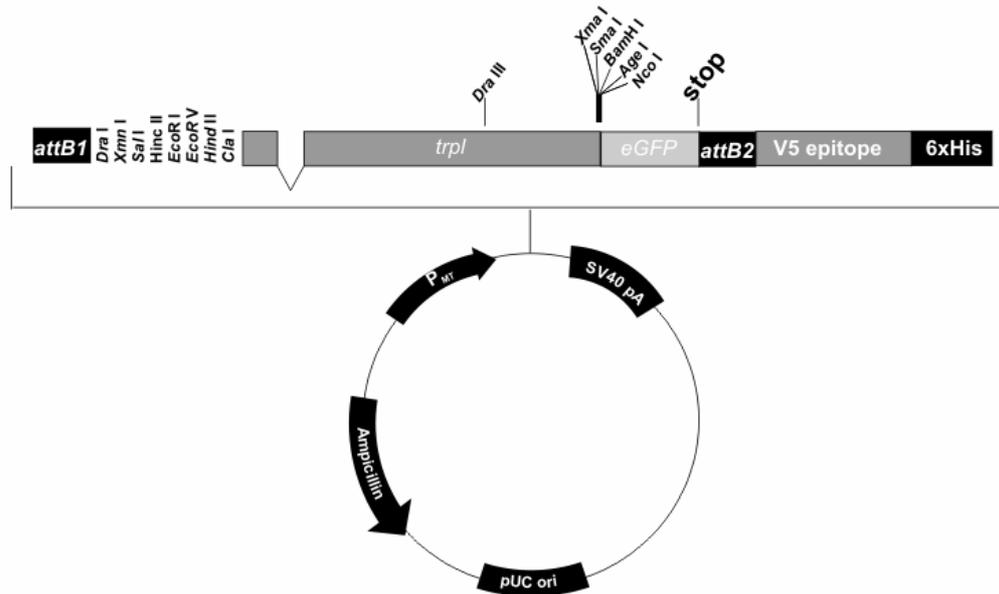
pYC4Rh1-ΔN-TRPL-eGFP



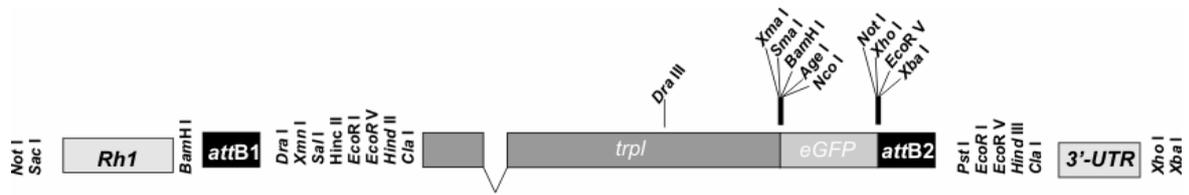
pMT48 -ΔN-TRPL-eGFP



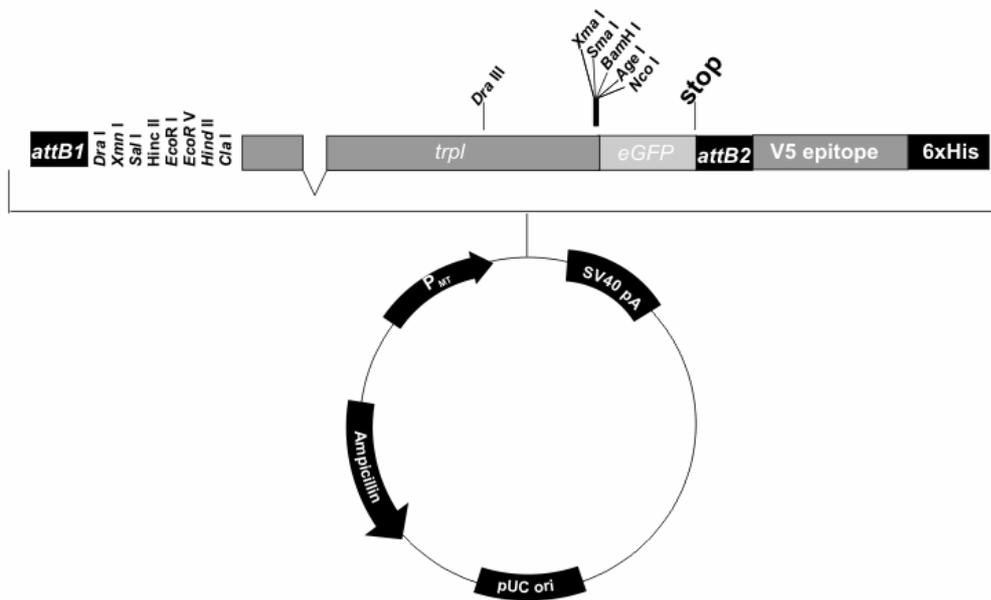
pYC4Rh1-ΔAnk-TRPL-eGFP



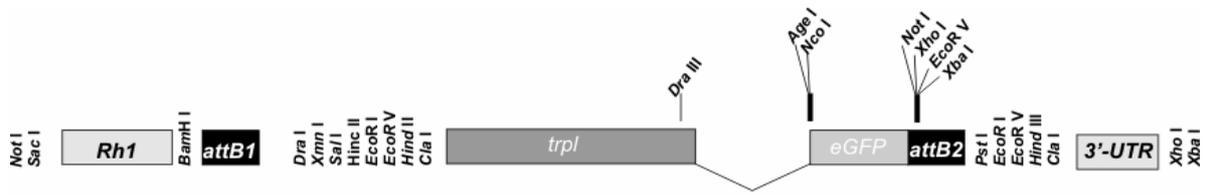
pMT48 ΔAnk-TRPL-eGFP



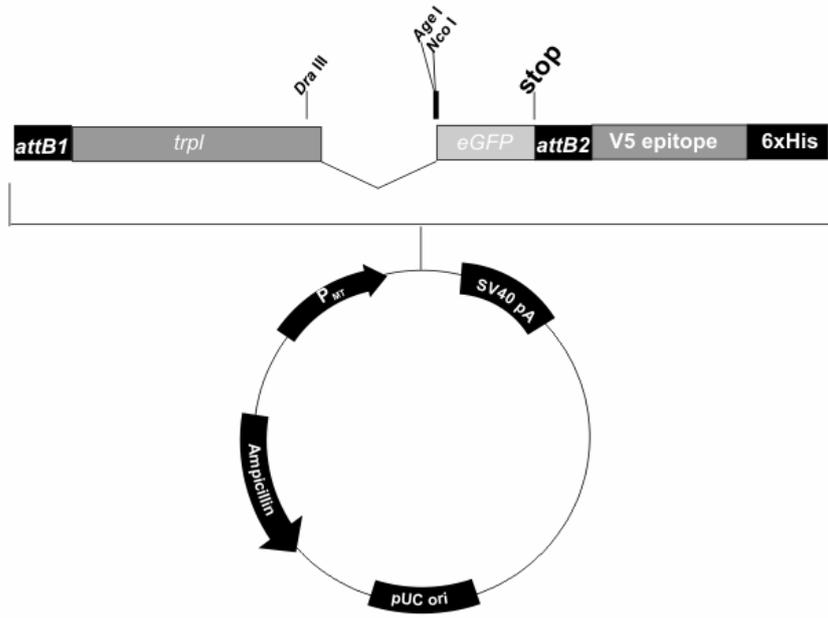
pYC4Rh1-ΔInt-TRPL-eGFP



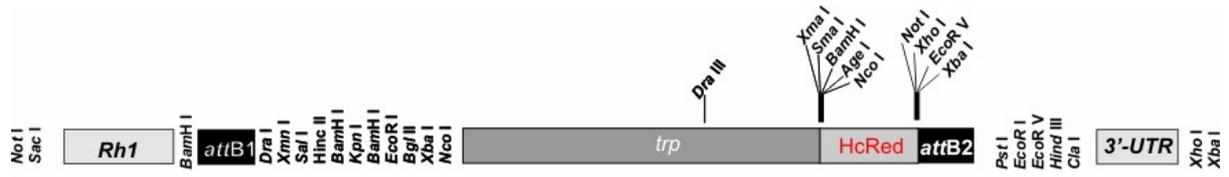
pMT48 ΔInt-TRPL-eGFP



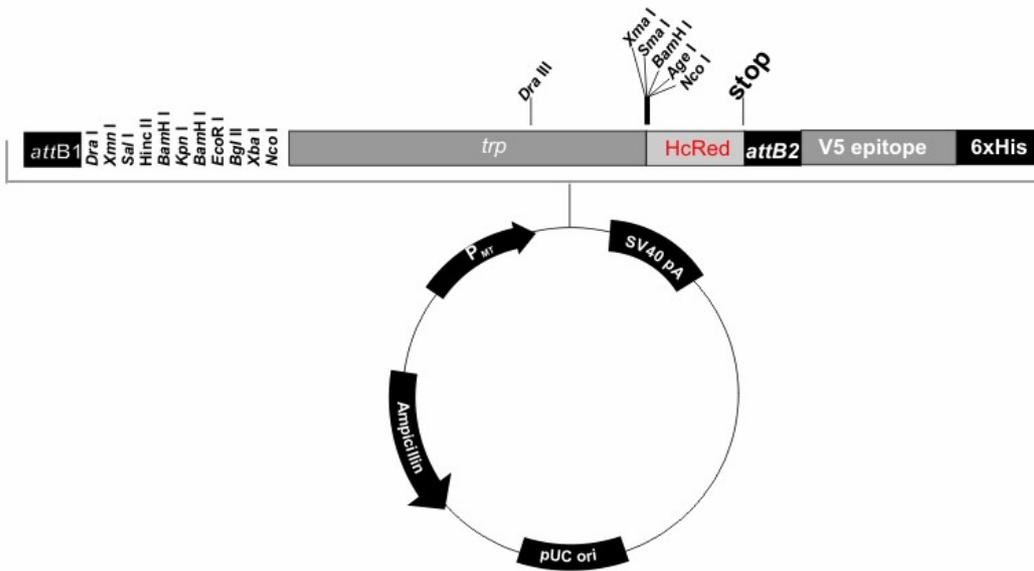
pYC4Rh1-ΔC-TRPL-eGFP



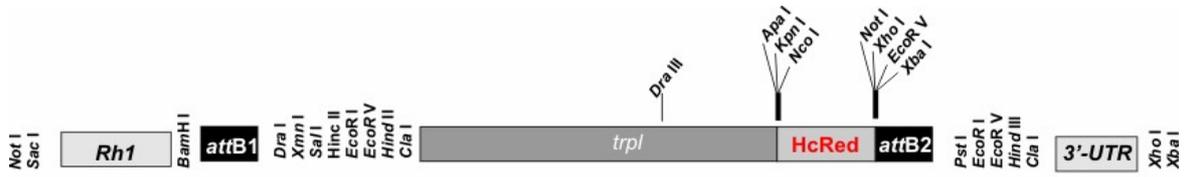
pMT48 ΔC-TRPL-eGFP



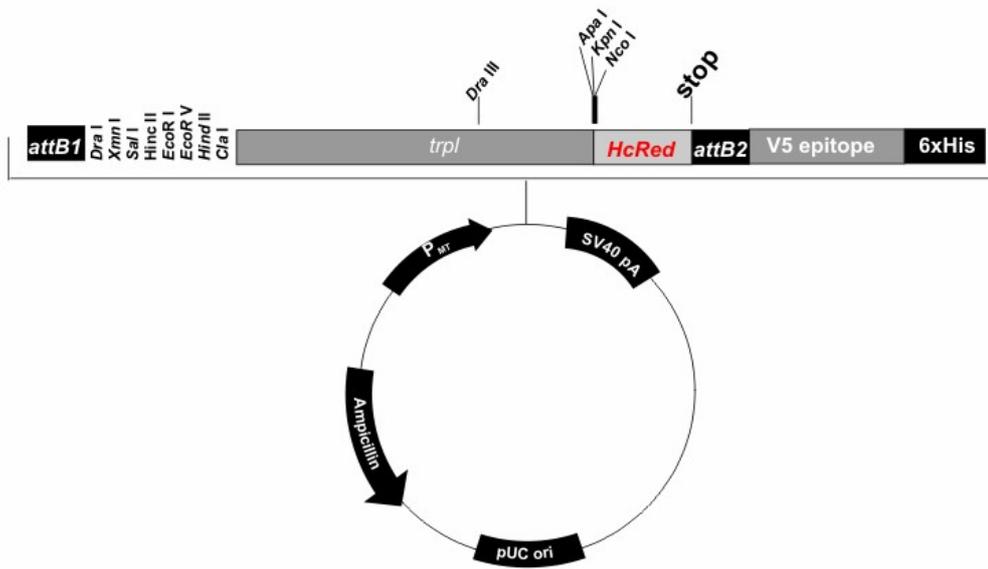
pYC4Rh1-TRP-HcRed



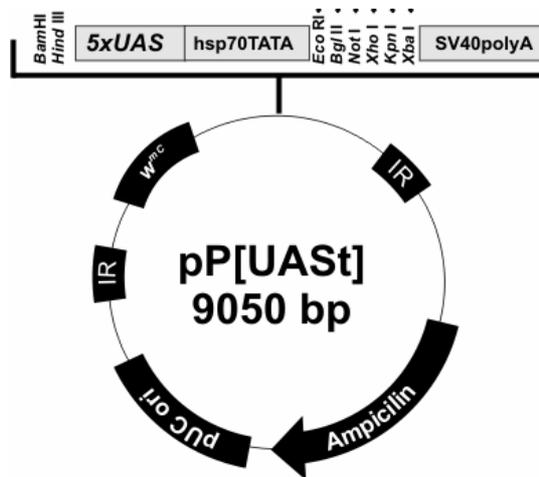
pMT48 TRP-HcRed



pYC4Rh1-TRPL-HcRed



pMT48--TRPL-HcRed



Der pUAST Vektor enthält folgende Elemente:

Fünf Bindungsstellen für den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4

hsp70 TATA -box und Transcriptions-Start

multiple cloning site (singuläre Restriktionsschnittstellen *EcoRI*, *BglII*, *NotI*, *XhoI*, *KpnI*, *XbaI*)

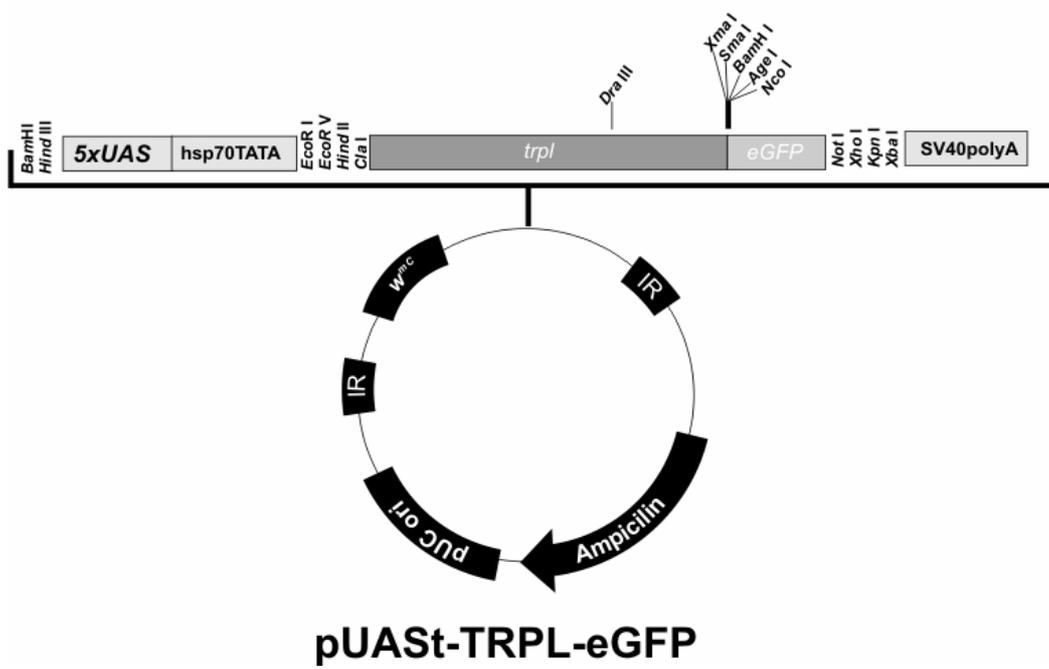
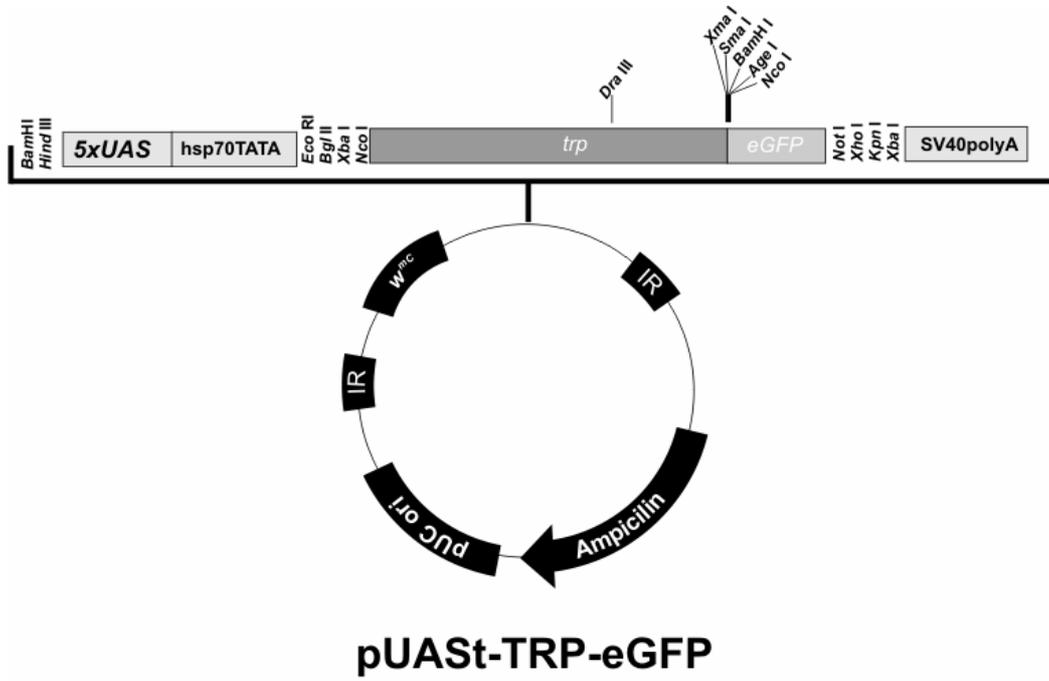
SV40 -Polyadenylierungsstelle

ori Replikationsursprung für die Propagation des Vektors in *E. coli*

IR „inverted Repeat“, Transposase-Erkennung/Schnittstelle

w^{mc}-Transformationsmarker der die Augenfarbe von *Drosophila* beeinflusst.

Ampicillin ,Antibiotikaresistenzgen (Transformationsmarker für *E. coli*)



Name: David Oliver Richter

Geburtstag, -ort: 25.07.1975 in Budapest/Ungarn

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Konfession: Römisch-katholisch

Wehrdienst: Befreiung wegen okulärer Hypertension

Familienstand: Verheiratet mit Viktoria Richter, geb. Goller,
M.A. der Romanistik und Philosophie

Mutter: Susanne Richter geb. Hargitay
Diplom-Pädagogin, Diplom-Heilpädagogin

Vater: Dr. Andreas Richter, Oberarzt

Geschwister: Alexandra Richter,
Master of science der Agrarwissenschaft

Schulbildung:

1982-1986	Grundschule Mainz-Gonsenheim
1986/87	Bischöfliches Williges-Gymnasium Mainz
1987-1995	Graf Münster Gymnasium Bayreuth
1995	Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote 1,7

Studium:

WS 1995/96	Beginn des Biochemie-Studiums an der Universität Bayreuth
1997	Vordiplom, Gesamtnote 1,31
2001	Diplom-Biochemiker, Gesamtnote 1,26
11/2001-03/2003	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth
seit 04/2003	Durchführung einer Promotionsarbeit am Institut für Zoologie, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe (TH)

Beruflicher Werdegang:

11/2001-03/2003	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth
seit 04/2003	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Zoologie, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe (TH)