

**Funktionelle Expression des
heteromultimeren INAD-Signalkomplexes
der Photorezeptoren von *Drosophila
melanogaster* in S2-Zellen**

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

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

DISSERTATION

von
Dipl.-Biol. Claudia Franz
aus Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes
Referent: Prof. Dr. Reinhard Paulsen
Korreferent: HD Dr. Adam Bertl
Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

Veröffentlichungen

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

Kongressbeiträge:

FRANZ C, PAULSEN R, AND HUBER A (2003). Fly vision: Recombinant expression of signaling molecules and assembly of the INAD signaling complex in a cell culture system. Proceedings of the ELSO 2003 Conference, pp. 20

FRANZ C, PAULSEN R, AND HUBER A (2003). The INAD signaling complex of *Drosophila* photoreceptors: Assembly and characterization in a cell culture system. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003 (N. Elsner and H. Zimmermann, eds), Thieme Stuttgart New York, Nr. 457

HARTMANN K, FRANZ C, BENTROP J, HUBER A, AND PAULSEN R (2003). Analysis of fly phototransduction proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003 (N. Elsner and H. Zimmermann, eds), Thieme Stuttgart New York, Nr. 454

FRANZ C, PAULSEN R, AND HUBER A (2003). Establishment and characterization of the *Drosophila* INAD signaling complex in a cell culture system. *Eur. J. Cell Biol.* 82, Suppl. 53, 111

HARTMANN K, FRANZ C, BENTROP J, HUBER A, AND PAULSEN R (2003). Analysis of fly phototransduction proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur. J. Cell Biol.* 82, Suppl. 53, 112

FRANZ C, HUBER A, AND PAULSEN R (2002). The INAD signaling complex of *Drosophila* photoreceptor: Recombinant Expression and Assembly in a Cell Culture System. DOI: 10.1240/sav_gbm_2000_h_000084 (online)

FRANZ C, BÄHNER M, PAULSEN R, AND HUBER A (2001). The INAD signaling complex of fly photoreceptors: Radioactive labeling of its newly synthesized components and its recombinant expression in a *Drosophila* cell line. Proceedings of the 28th Göttingen Neurobiology Conference 2001 (N. Elsner and W. Kreutzberg, eds), Thieme Stuttgart New York, Volume II, Nr. 505

FRANZ C, BÄHNER M, PAULSEN R, AND HUBER A (2001). Signaltransduktion in Photorezeptoren von Fliegen: radioaktive Markierung von neu synthetisierten Komponenten des INAD-Signalkomplexes und deren rekombinante Expression in Zellkultur. 12. Neurobiologischer Doktorandenworkshop, Universität Stuttgart-Hohenheim

meinen Eltern

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Reinhard Paulsen für die Themenstellung dieser Dissertation im Rahmen eines GIF-Projektes, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine konstruktiven Anregungen;

Herrn PD Dr. Armin Huber für die Verwaltung des GIF-Projektes, interessante wissenschaftliche Diskussionen sowie seine kritische Begutachtung des Manuskriptes dieser Dissertation;

Herrn Prof. Dr. Baruch Minke und Herrn Dror Segal (Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel) für eine ausgezeichnete, fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des GIF-Projektes – die im israelischen Labor gewonnenen elektrophysiologischen Daten bilden einen wertvollen Bestandteil dieser Arbeit;

Frau Kristina Hartmann für die produktive Zusammenarbeit bei der Gewinnung und Analyse von Massenspektren sowie das angenehme Arbeitsklima im Labor;

Herrn Martin Roth (Universität Würzburg, Biozentrum) für die Überlassung der Zelllinie S2P15;

Frau Susanne Schöler für die Unterstützung bei der Expressionklonierung von pMT/DmTRPL-EGFP im Rahmen eines Projektpraktikums, Frau Gabriele Gerdon für die Klonierung von inaDN2 und RTIE4 und Herrn David Richter für die Erstellung von DmTRPL-HcRed sowie die Zusammenarbeit bei der Erstellung von pMT-DEST/DmTRPL-HcRed.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Erik Frank für die umfangreiche Einführung in LaTeX, die das Vorliegen dieser Arbeit ermöglicht hat. Darüber hinaus danke ich ihm für wertvolle Ratschläge und seine uneingeschränkte Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung im Laboralltag. Besonders danke ich Georgia und Kristina für viele wertvolle Diskussionen, zahlreiche Aufheiterungen und Unterstützung beim Korrekturlesen dieser Arbeit sowie Monika für hilfreiche Anregungen.

Meiner Familie danke ich für viele Jahre Verständnis und Unterstützung zur Verwirklichung meiner Ziele.

Für die finanzielle Förderung des Projektes danke ich der German Israeli Foundation for Scientific Research and Development (GIF) sowie dem Land Baden-Württemberg.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das visuelle System der Diptere <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.2	Die visuelle Signaltransduktion in mikrovillären Photorezeptoren von Dipteren	4
2.3	Der INAD-Signalkomplex	5
2.3.1	Das Gerüstprotein INAD	6
2.3.2	TRP – Lichtabhängiger Kationenkanal der TRP-Proteinfamilie . . .	8
2.3.3	Phospholipase C β (PLC β)	11
2.3.4	ePKC: die augenspezifische Proteinkinase C	13
2.3.5	Weitere Assoziationspartner	15
2.4	S2 – Embryonale Insektenzellen als rekombinantes Expressionssystem . . .	17
2.5	Problemstellung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Material	20
3.1.1	Chemikalien, Radiochemikalien, Verbrauchsmaterialien, Antibiotika, Enzyme und Kits	20
3.1.2	Zellstämme	22
3.1.2.1	Bakterien	22
3.1.2.2	Eukaryotische Zellen	22
3.1.3	Nukleinsäuren	23
3.1.3.1	Vektoren und Konstrukte	23
3.1.3.2	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	23
3.1.3.3	cDNA-Banken und ESTs	25
3.1.4	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	25
3.1.5	Kulturmedien	26
3.1.5.1	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	26
3.1.5.2	Kultur von Schneider2-Zellen (S2)	26
3.1.6	Versuchstiere	27
3.1.6.1	Fliegen	27

3.1.6.2	Kaninchen	28
3.1.7	Verwendete Antikörper	28
3.1.8	Soft- und Hardware, spezielle Geräte	29
3.2	Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren: Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
3.2.2	Reinigung von Nukleinsäuren	31
3.2.2.1	PCR- und Gelbanden-DNA-Reinigung	31
3.2.2.2	Ethanolpräzipitation und Isopropanolpräzipitation	31
3.2.2.3	Phenolextraktion	32
3.2.3	PCR und Sequenzierung	32
3.2.3.1	PCR	32
3.2.3.2	Sequenzierung	33
3.2.4	Modifikation von DNA	34
3.2.4.1	DNA-Restriktion	34
3.2.4.2	Dephosphorylierung von Vektorenden	35
3.2.4.3	DNA-Ligation	35
3.2.5	Gentechnische Veränderung von Organismen: <i>E. coli</i>	36
3.2.6	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> M15[pREP4]: Antigenexpression	36
3.3	Rekombinante Expression in eukaryotischer Zellkultur: S2-Zellen	38
3.3.1	S2-Zell-Kultivierung	38
3.3.2	Gentechnische Veränderung eukaryotischer Zellen - transiente und stabile Transfektionen	38
3.3.3	Selektion stabil transfizierter Linien	39
3.3.4	Proteinextraktion aus S2-Zellen	39
3.4	Präparation biologischen Materials aus Köpfen von <i>D. melanogaster</i>	40
3.5	Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	41
3.5.1	Analyse rekombinant exprimierter Fluorophore	41
3.5.2	DAPI-basierte Kernfärbung	41
3.5.3	Immunomarkierung von S2-Zellen	41
3.5.4	Dokumentation von Fluoreszenzsignalen	42
3.6	Biochemische Methoden	42
3.6.1	Proteingehaltsbestimmung: Bicinchoninsäure- <i>Assay</i>	42
3.6.2	SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese	43
3.6.3	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	44
3.6.4	Silbernitratfärbung von SDS-PAGE-Gelen	44
3.6.5	Western Blot Analysen	45
3.6.5.1	Elektroblotting (Semi-Dry und Tankblot)	45
3.6.5.2	Immunologische Detektion und Visualisierung membran- gebundener Proteine	45
3.6.5.3	Amidoschwarzfärbung von PVDF-Blotmembranen	46
3.6.6	Proteinanreicherung und Proteinaufreinigung	47

3.6.6.1	Immunpräzipitation aus Drosophila-Kopf- oder Augenkap- Extrakten	47
3.6.6.2	Immunpräzipitation aus S2-Zellextrakten	48
3.6.6.3	IMAC-Aufreinigung aus S2-Extrakten	48
3.6.7	Proteinfragmentierung für massenspektrometrische Analysen	48
3.6.8	Immunisierung von Kaninchen	49
3.6.9	Affinitätsreinigung von Antiserum	50
3.6.10	<i>in vitro</i> -Translation	50
3.7	Spezifische Methoden dieser Arbeit	50
3.7.1	Verankerung vitaler S2-Zellen auf Oberflächen	50
3.7.2	Immuncytochemische/fluoreszenzmikroskopische Differenzierung lös- licher und membrangebundener Proteine in S2-Zellen	51
3.7.3	Affinitätsreinigung von Serum an S2-Lysaten	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Erzeugung und Aufreinigung von Antiseren gegen Komponenten des INAD- Signalkomplexes	52
4.1.1	α -DmTRP	52
4.1.2	α -DmINAD	53
4.2	Sequenzvariationen bei Komponenten des INAD-Signalkomplexes von <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	54
4.2.1	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) innerhalb der kodierenden Sequenz von INAD	54
4.2.2	Primärstrukturvariationen des TRP-Proteins	54
4.3	Klonierung der INAD-Komplexkomponenten zur rekombinanten Expressi- on in S2-Zellen	55
4.3.1	Analyse von cDNA-Klonen auf Eignung zur Expressionsklonierung	55
4.3.2	Isolierung einer cDNA-Sequenz mit vollständiger Kodierung für INAD von <i>D. melanogaster</i>	56
4.3.3	Herstellung von Konstrukten zur induzierbaren Expression in S2	58
4.4	S2-Zellkultursystem: Rekombinante Expression in polyklonalen Linien	59
4.4.1	Charakterisierung von Ausgangslinien und Etablierung der rekombi- nanten Expression	59
4.4.2	Etablierung der Expression von INAD-Signalkomplexkomponenten: Charakterisierung polyklonaler S2-Transfektionskulturen	63
4.4.3	Optimierung von Transfektion und Expressionsraten	67
4.4.4	Duale Co-Expression von Komplexkomponenten	69
4.5	Rekombinante Expression des INAD-Signalkomplexes in S2-Zellen	70
4.5.1	Generierung und Charakterisierung polyklonaler INAD-Komplex- Linien	70
4.5.2	Selektion monoklonaler Linien	72
4.5.3	Charakterisierung der monoklonalen S2-Linien INAD-Komplex	73

4.5.4	Klonal selektierte Linien mit Co-Expression mehrerer Komplexkomponenten: Basis der Etablierung von Teilkomplexen	79
4.5.5	Charakterisierung klonal selektierter Referenzlinien mit singulärer Komponentenexpression	85
4.6	Funktionelle Analysen an S2-Linien mit rekombinanter Expression von INAD-Signalkomplexkomponenten	87
4.6.1	MALDI-TOFF-Analyse: Rekombinante Expression des vollständigen DmTRP-Proteins	87
4.6.2	Co-Immunpräzipitationsstudien	91
4.6.3	Detergenz-basierte Differenzierung löslicher und membrangebundener Proteine	94
4.6.4	Elektrophysiologische Charakterisierung des rekombinanten INAD-Signalkomplexes	96
4.7	TRPL - Analyse gebildeter Ionenkanäle durch Expression im rekombinanten System S2	102
4.7.1	Singuläre heterologe Expression von rDmTRPL-EGFP	102
4.7.2	Elektrophysiologische Charakterisierung von rDmTRPL-EGFP: Bildung funktioneller Ionenkanäle in S2	105
4.7.3	Co-Expression von TRPL mit ausgewählten INAD-Komplexkomponenten	106
4.7.4	Interaktionsanalysen: Assemblierungsstudien an co-exprimiertem rDmTRPL-EGFP und Charakterisierung physiologischer Einflüsse der Co-Expression	111
4.8	Paramyosin - Identifizierung eines neuen Interaktionspartners des INAD-Komplexes?	114
5	Diskussion	118
5.1	Co-Expression in S2-Zellen: Systemcharakterisierung zur Analyse von Funktionen des INAD-Signalkomplexes	119
5.2	Heterologe Expression von Proteinen der TRP-Proteinfamilie	120
5.2.1	Heterologe Expression von DmTRP und DmTRPL	120
5.2.2	Heterologe Co-Expression von DmTRP und DmTRPL	124
5.2.3	TRPL – Interaktionspartner und der INAD-Komplex	126
5.2.4	Regulationsmechanismen TRPL- und TRP-abhängiger Ionenströme	128
5.3	Co-Expression von zentralen Komponenten des INAD-Signalkomplexes von <i>D. melanogaster</i> in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund	131
5.3.1	Co-Expression der vier INAD-Kernkomplexkomponenten	132
5.3.2	Assemblierung eines rekombinanten INAD-Komplexes	133
5.3.3	Funktionalität von rDmTRP im rINAD-Signalkomplex und Einflüsse assoziierter Komplexkomponenten	136
5.4	Paramyosin - temporäre Assoziation mit dem INAD-Signalkomplex?	139

Literaturverzeichnis	142
6 Abkürzungsverzeichnis	156
A Anhang	159

1 Zusammenfassung

Der INAD-Signalkomplex ist ein integraler Bestandteil der G-Protein-gekoppelten Lichtsignaltransduktion im mikrovillären Photorezeptor von *Drosophila melanogaster*. In diesem Komplex sind über die PDZ-Domänen des Gerüstproteins INAD Phospholipase C- β (PLC β), ePKC (augenspezifische Proteinkinase C) und der lichtabhängige Ionenkanal TRP verankert. Mit TRPL ist ein weiterer lichtabhängiger Ionenkanal in die Bildung des Rezeptorpotentials involviert. Für TRPL wird eine temporäre Assoziation mit dem INAD-Signalkomplex diskutiert. Die Funktion der Bildung des INAD-Signalkomplexes wird in der Erhöhung der Leitungs- und Wandlungsgeschwindigkeit sowie der Sicherung von Spezifität und Sensitivität der Signalverarbeitung gesehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Funktionen des INAD-Signalkomplexes durch rekombinante Co-Expression der Kernkomponenten des Komplexes sowie der Expression von TRPL. Voraussetzung für die Herstellung von Expressionskonstrukten war die Isolierung und Überprüfung von cDNA-Sequenzen, die für die Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes kodieren. In Schneider2-Zellen wurde unter Verwendung der erstellten Expressionskonstrukte die rekombinante Co-Expression der vier Signaltransduktionsproteine TRP, INAD, ePKC und PLC β und von jeweils drei der Komponenten etabliert. Die TRP / TRPL-Co-Expression überprüft eine mögliche Heteromerisierung beider Proteine. Durch Selektion und Charakterisierung von Linien basierend auf einzelnen co-transfizierten Ausgangszellen (klonale Selektion) wird die Kenntnis des rekombinanten genetischen Hintergrundes jeder einzelnen Zelle einer Kultur sichergestellt.

Immunochemische Nachweismethoden detektieren in untransfizierten S2-Zellen weder die Expression von Kernkomponenten des INAD-Komplexes noch von TRPL. Aus Zelllinien mit verifizierter Co-Expression der rekombinanten Proteine rDmPKC, rDmPLC β , rDm-INAD und rDmTRP können mehrerer INAD-Komplexkomponenten co-immunpräzipitiert werden. Diese Interaktionsstudien weisen die Bildung rekombinanter INAD-Signalkomplexe beziehungsweise Teilkomplexe nach und identifizieren die Bildung des INAD-Komplexes als Mechanismus unabhängig von weiteren photorezeptorspezifischen Faktoren. Massenspektrometrische Analysen belegen für rekombinant exprimiertes TRP die Vollständigkeit der Primärstruktur, eine Voraussetzung für die Funktionalität des Proteins. Die Funktionsfähigkeit von rDmTRP zeigen elektrophysiologische Daten klonal selektierter S2-Linien mit Co-Expression der vier Kernkomplexkomponenten. In diesen Linien wird im Gegensatz zur Referenzlinie, die den INAD-Kernkomplex mit Ausnahme von TRP exprimiert, ein auswärtsgerichteter Ionenstrom detektiert. Elektrophysiologisch dokumentiert wird weiterhin die Abhängigkeit des TRP-basierten Ionenstroms von der Co-Expression aller vier Hauptkomponenten des INAD-Komplexes. Für die rekombinante Co-Expression der beiden Ionenkanalproteine TRP und TRPL können weder durch Immunpräzipitation noch durch elektrophysiologische Analysen Belege einer Interaktion gefunden werden.

Die Etablierung und Charakterisierung der rekombinanten Co-Expression der vier Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes zeigt erstmals, dass die funktionelle Expression von TRP das Vorliegen dieser Komponenten als Signalkomplex erfordert.

2 Einleitung

Die Basis für Leben ist die Fähigkeit zur Interaktion mit der Umgebung: Lebende Zellen perzipieren Signale, leiten und verarbeiten diese weiter und reagieren in geeigneter Weise auf sie. Die spezifische Umwandlung von (externen) Reizen in adäquate (intrazelluläre) Antworten ist deshalb eine wichtige Funktion für lebende Zellen. Die Spezifität der Signalerkennung und -verarbeitung wird durch folgende Strategie garantiert: Zum einen exprimieren Zellen eine Vielzahl von (Oberflächen-)Rezeptoren, die ausgewählte Liganden detektieren. Auf der anderen Seite werden Komponenten eines Signalweges in einem Transduktionskomplex zusammengefaßt, um Signalfehlleitungen in nachgeschalteten Transduktionsinstanzen, die häufig gleich oder sehr ähnlich sind, zu vermeiden. Darüber hinaus ermöglicht die Multiproteinassoziation die Integration von Signalen verschiedener Rezeptoren (zur Übersicht: PAWSON AND NASH, 2003).

Die Transduktion von Lichtreizen im visuellen System der Diptere *Drosophila melanogaster* ist ein Paradigma für die Assemblierung von Signalproteinen in einem Multiproteinkomplex.

2.1 Das visuelle System der Diptere *Drosophila melanogaster*

Das visuelle System von *Drosophila* umfaßt drei Typen sensorischer Organe: das Bolwig Organ oder Larvalauge (bestehend aus 12 Zellen), drei Ocelli und zwei Komplexaugen. Die Ocelli exprimieren ein einziges Rhodopsin-Gen kodierend für einen violett-sensitiven Rezeptor (PAPATSENKO *et al.*, 2001). Das Expressionsmuster des Larvalauges ist unzureichend charakterisiert. Bekannt ist die Expression der Rhodopsine (Rh) Rh5 und Rh6 mit maximalen Absorptionen bei 442 nm bzw. 515 nm Wellenlänge (PAPATSENKO *et al.*, 2001).

Jedes der paarig angelegten Komplexaugen der adulten Fruchtfliege enthält ca. 750 elementare Einheiten, genannt Ommatidien oder Facetten (Abbildung 2.1). Die einzelnen Ommatidien setzen sich von der Augenoberfläche in Richtung optische Ganglien zusammen aus dem dioptrischen Apparat bestehend aus Cornea und Kristallkegel, aus vier Semperzellen und den primären Pigmentzellen sowie acht Photorezeptorzellen (R1 bis R8, Nummerierung nach DIETRICH, 1909). Vom einfallenden Licht aus benachbarten Ommatidien werden die Photorezeptorzellen durch die sekundären Pigmentzellen abgeschirmt. Proximal wird das Auge durch die Basallamina von dem ersten optischen Ganglion, der Lamina, abgegrenzt. Daran schließen sich Medulla und Lobula als weitere optische Gan-

glen an. Die Photorezeptorzellen eines Ommatidiums sind kreisförmig um einen intraommatidialen Raum angeordnet und bilden zur Mitte des Ommatidiums hin jeweils einen Saum aus dicht gepackten Mikrovilli aus. Diese als Rhabdomere bezeichneten Strukturen sind die lichtabsorbierenden Teile der Photorezeptorzellen. In diesen Membranen sind der jeweils photorezeptorspezifisch exprimierte Lichtrezeptor Rhodopsin (ein integrales Membranprotein) und die lichtabhängigen Ionenkanäle TRP, TRPL (TRP-like) und TRP γ lokalisiert. Weitere an der Phototransduktion beteiligte Komponenten (z.B. G-Protein, INAD, PLC β , ePKC) sind als periphere Membranproteine intrazellulär mit der rhabdomerischen Membran assoziiert. Im Gegensatz zu den peripher liegenden Rhabdomeren von R1 bis R6, die sich über die gesamte Länge des Ommatidiums erstrecken, sind die Mikrovillissäume von R7 und R8 übereinander angeordnet (R7 apikal, R8 basal, Abbildung 2.1) und bilden ein zentrales Rhabdomer aus. Die Gesamtheit der Rhabdomere eines Ommatidiums wird als Rhabdom bezeichnet. Bei *Drosophila* sind, wie bei anderen Dipteren, die einzelnen Rhabdomere durch extrazellulären Raum separiert, der von einer intraommatidialen Matrix ausgefüllt ist. Diese Anordnung wird als offenes Rhabdom bezeichnet. Von sieben benachbarten Rhabdomen sind die visuellen Achsen auf denselben Punkt der Umwelt ausgerichtet. Während die Axone von R1 bis R6 dieser Ommatidien mit dem gleichen visuellen Feld in der Lamina verschaltet werden, erfolgt die Verschaltung der Axone der Photorezeptorzellen R7 und R8 erst im zweiten optischen Ganglion, der Medulla oblongata. Aufgrund der speziellen Anordnung der Sehzellen und der komplexen Art der neuronalen Verschaltung zur Erhöhung der Lichtempfindlichkeit wird dieser Augentyp als neuronales Superpositionsauge bezeichnet (KIRSCHFELD, 1967).

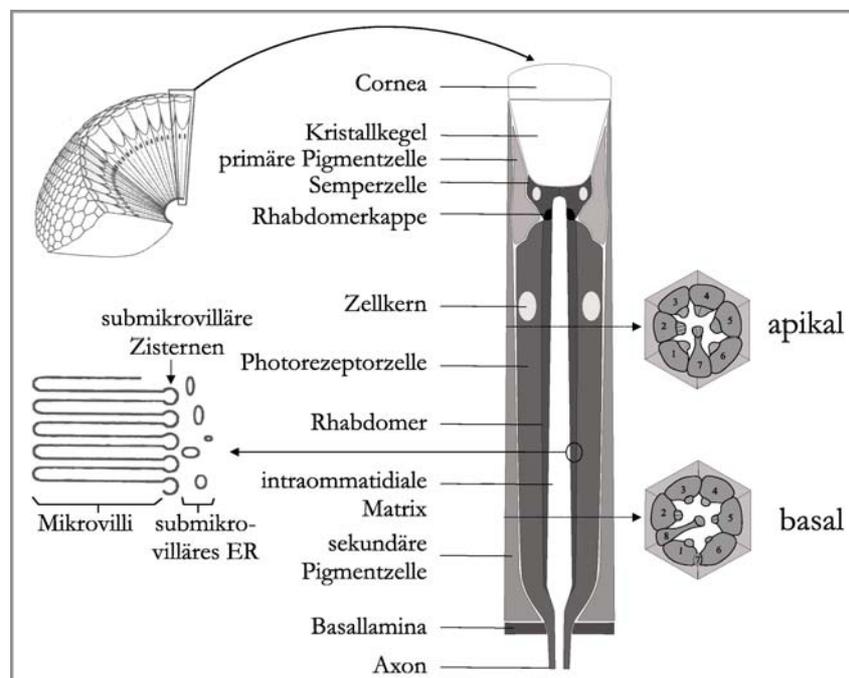


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Komplexauges und Aufbau eines Ommatidiums (mikrovillärer Photorezeptor)

2.2 Die visuelle Signaltransduktion in mikrovillären Photorezeptoren von Dipteren

Im Komplexauge von Dipteren löst einfallendes Licht, wie auch in lichtsensitiven Geweben, Organen, Organellen oder Membranbereichen anderer Organismen (z. B. Linsenauge der Vertebraten, Paraflagellarkörper von *Euglena gracilis* oder mikrobielle Rhodopsine, (Bakterio-)Phytochrome und Kryptochrome als Lichtrezeptoren in Membranen von Pflanzen, Algen, Pilzen, Bakterien und Archaea), eine Kaskade von Transduktionsschritten aus. Das Resultat in den Photorezeptoren von Dipteren ist eine Änderung der Ionenpermeabilität der Photorezeptormembran, wodurch eine Membranpotentialänderung generiert wird. Die Phototransduktionskaskade im Komplexauge ist ein Paradigma für einen G-Proteingekoppelten Signalweg mit einer Phospholipase $C\beta$ als zentralem Effektor.

Der erste Schritt der Signaltransduktion ist die Absorption von Photonen durch den Lichtrezeptor Rhodopsin. Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist Rhodopsin ein Transmembranprotein und durchspannt mit sieben α -Helices die mikrovilläre Photorezeptormembran. Der Chromophor 3-Hydroxyretinal, ein Retinal-Derivat, ist über eine Schiff'sche Base kovalent an das Apoprotein Opsin (in 7. Helix, bei Rh1 an Lysin 319) gebunden und ist parallel zur Membran orientiert (OVCHINNIKOV *et al.*, 1982; APPLEBURY AND HARGRAVE, 1986). Die durch Absorption eines Lichtquants verursachte Isomerisierung des Chromophors von 11-*cis*- zu all-*trans*-3-Hydroxyretinal induziert eine Konformationsänderung des Opsins. Das photoaktivierte Rhodopsin (Metarhodopsin) koppelt an ein visuelles heterotrimeres G-Protein, dessen α -Untereinheit zur Klasse der Gq-Proteine gehört. Visuelles G α q wird in *Drosophila* retinaspezifisch exprimiert (LEE *et al.*, 1990). Die Interaktion mit Metarhodopsin stimuliert den Austausch von GDP zu GTP an der G α q-Untereinheit und aktiviert damit das G-Protein, dessen Untereinheit G α q vom G $\beta\gamma$ e-Komplex dissoziiert. Im mikrovillären Photorezeptor von *Drosophila* fungiert die α -Untereinheit G α q des aktivierten G-Proteins als Agonist für eine Phospholipase $C\beta$ (PLC β , Genprodukt von *norpA*, BLOOMQUIST *et al.*, 1988) durch direkte Bindung an das Enzym (BÄHNER *et al.*, 2000). Die Interaktion zwischen G α q und PLC β ist bidirektional: PLC β wirkt für G α q als GAP (GTPase aktivierendes Protein) und vermittelt so die Inaktivierung des G-Proteins (COOK *et al.*, 2000). Die PLC β -katalysierte Reaktion hydrolysiert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) (DEVARY *et al.*, 1987). Sowohl IP $_3$ als auch DAG sind intrazelluläre sekundäre Botenstoffe und können individuell weitere biochemische Signalkaskaden steuern. Im Endeffekt resultiert die Signalkaskade in der Öffnung der Kationenkanäle TRP (Ca $^{2+}$ -selektiv, Einstrom bei hyperpolarisiertem Membranpotential: HARDIE AND MINKE, 1992), TRPL (PHILLIPS *et al.*, 1992, Ca $^{2+}$ -permeabler nicht-selektiver Kationenkanal: HU *et al.*, 1994) und TRP γ (XU *et al.*, 2000) in der Photorezeptormembran. Der genaue Mechanismus der Signalleitung nach Aktivierung von PLC β bis hin zur Öffnung der lichtabhängigen Ionenkanäle ist nicht vollständig charakterisiert. Es werden zwei konträre Modelle auf Grundlage der *second messenger* IP $_3$ (*store-operated Ca $^{2+}$ entry*-Modell) und

DAG (DAG-Metabolisierung zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die die Kanalaktivierung vermitteln) diskutiert (siehe dazu Kapitel 2.3.2). Durch den hauptsächlich Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen getragenen Ionenstrom entsteht ein depolarisierendes Rezeptorpotential an der Photorezeptormembran. Die Terminierung der Photorezeptoraktivierung ist Voraussetzung für eine erneute Aktivierung und erfordert die Inaktivierung aller beteiligten Komponenten des Signalweges.

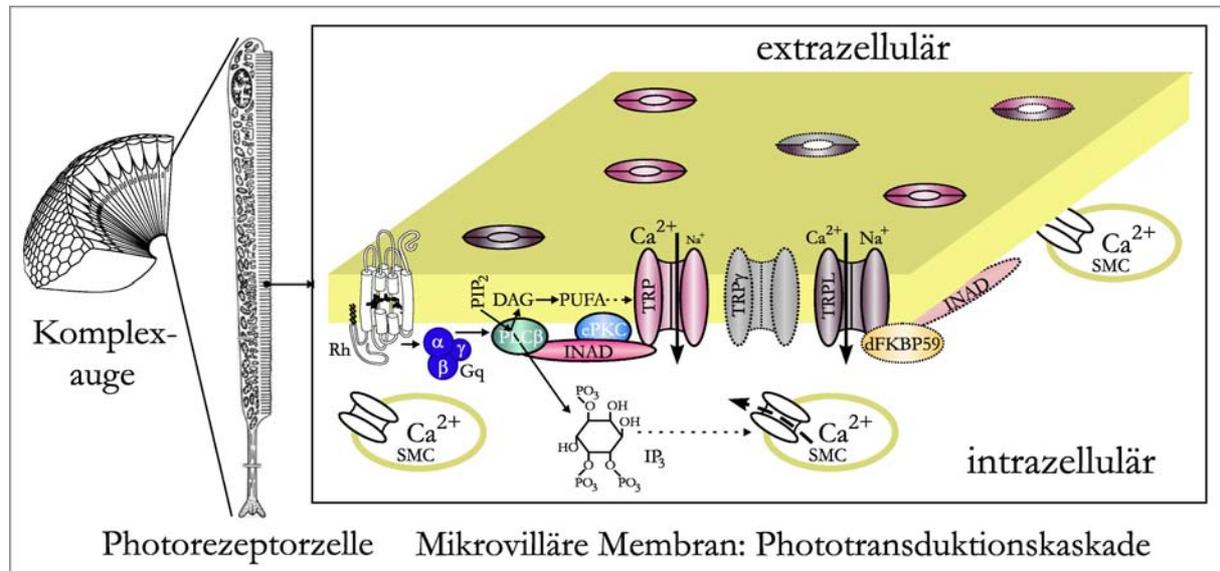


Abbildung 2.2: Schema der visuellen Signaltransduktionskaskade im Komplexauge von *Drosophila melanogaster*

Dargestellt sind ausgewählte Komponenten der Signalkaskade in einem Mikrovillus der Photorezeptorzelle. Rh: Rhodopsin, Gq: visuelles G-Protein, PLC β : Phospholipase C β , ePKC: augenspezifische Proteinkinase C, INAD: *inactivation no afterpotential D*, TRP: *transient receptor potential*, TRPL: TRP-like, TRP γ : Protein der TRP-Familie, dFKBP59: Immunophilin FKBP59, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat, DAG: Diacylglycerol, PUFA: *polyunsaturated fatty acids* – mehrfach ungesättigte Fettsäuren, IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat, SMC: submikrovilläre Zisterne. Erläuterungen siehe Text.

2.3 Der INAD-Signalkomplex

Für das Verständnis der Signaltransduktion in lebenden Zellen ist die Entdeckung der Organisation von Komponenten der Transduktionskaskaden in supramolekularen Komplexen von Bedeutung. Daten zur Organisation von Signalproteinen in Multienzymkomplexen deuten auf eine Förderung der Verschaltung verschiedener Signalleitungsmechanismen hin (MASLOV AND SNEPPEN, 2002). Die Komplexbildung erfolgt via Protein-Protein-Interaktionsdomänen (z.B. PDZ, SH2 und SH3, PH, PTB, 14–3–3). Beispielsweise werden durch 14–3–3-Proteine in Mammalia PKC, Raf und einige andere Signalproteine verankert (AITKEN, 1995); Leonardo oder 14–3–3 ζ (SWANSON AND GANGULY, 1992) ist ein Beispiel eines *Drosophila*-Proteins dieser Familie und in die Photorezeptorentwicklung involviert (KOCKEL *et al.*, 1997). Multiproteinkomplexe sind neben der Signaltransduktion für eine Vielzahl an Funktionen von Bedeutung, darunter: Vesikel- und Proteintransport, En-

dozytose, gezielte Proteolyse, Cytoskelettorganisation, Genexpression, Zellbewegung und Axonleitung sowie Zellpolarität in Epithelien und neuronalen Zellen (Übersicht: PAWSON AND NASH, 2003). In *Caenorhabditis elegans* vermittelt der LIN-2 / LIN-7 / LIN-10-Komplex die Lokalisation der LET-23 Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) in der basolateralen Membran von polarisierten Vulva-Epithelzellen durch direkte Bindung der LET-23 RTK an ein konserviertes Bindungsmotiv, das auch in Mammalia zu finden ist (KAECH *et al.*, 1998; LET-23 ist ein EGF-Rezeptor). Beispiele großer bekannter Proteinkomplexe sind das Inflammasom oder die „postsynaptische Dichte“ an neuronalen Synapsen, die die dendritische Antwort auf Neurotransmissionen kontrolliert (detaillierte Übersichten: PAWSON AND NASH, 2003).

Am Beispiel des INAD-Signalkomplexes wird neben höherer Geschwindigkeit der Signalwandlung die Sensitivität und Spezifität von Signalwegen als Ziel der Organisation von Proteinen in Komplexen diskutiert (TSUNODA AND ZUKER, 1999). In „Synaptosomen“ bindet, zum Beispiel, ausschließlich ϵ PKC an F-Aktin (MOCHLY-ROSEN AND GORDON, 1998). Durch Verankerung und damit restriktive subzelluläre Organisation können Signalkomponenten vielfältig und spezifisch eingesetzt werden. Proteinkinase C (PKC)-Isoformen zeigen trotz begrenzter Substratspezifität und Aktivatorsensitivität isoformspezifische Funktionen (MOCHLY-ROSEN AND GORDON, 1998).

Die Entdeckung, dass auch in die Phototransduktion involvierte Proteine sich nicht frei in der Photorezeptormembran bewegen sondern über das Gerüstprotein INAD in einem heteromeren Multiproteinkomplex organisiert sind (HUBER *et al.*, 1996a; TSUNODA *et al.*, 1997; CHEVESICH *et al.*, 1997), führte zu neuen Vorstellungen über die Aktivierung, Regulation und Deaktivierung der visuellen Signaltransduktion im mikrovillären Photorezeptor von Dipteren. Der INAD-Signalkomplex besteht aus vier integralen Bestandteilen: dem multivalenten Gerüstprotein INAD, der PLC β , dem lichtabhängigen Ionenkanal TRP sowie ePKC, einer augenspezifischen Proteinkinase C. Die Assoziation von ePKC mit TRP über INAD impliziert eine funktionelle Relevanz der Proteinkinase für die Aktivierung/Deaktivierung und Regulation des Ionenstroms durch den Ionenkanal, zumal sowohl TRP als auch das Gerüstprotein INAD Substrat der komplexassoziierten ePKC sind (HUBER *et al.*, 1996b; LIU *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird die temporäre oder dauerhafte Assoziation von einer Reihe weiterer an der Phototransduktion beteiligter Komponenten diskutiert (zum Beispiel Rhodopsin, TRPL: XU *et al.*, 1998 oder ninaC-Genprodukt: WES *et al.*, 1999; siehe Kapitel 2.3.5).

2.3.1 Das Gerüstprotein INAD

Das von PAK *et al.*, 1970 im Rahmen einer Suche nach Mutanten mit abnormalen Elektretinogrammen elektrophysiologisch als INAD (*inactivation no afterpotential D*: veränderte Rezeptordeaktivierung, kein verlängertes Nachpotential) charakterisierte Protein umfaßt fünf PDZ-Domänen (TSUNODA *et al.*, 1997, schematische Darstellung in Abbildung 2.3). PDZ-Domänen (auch DHR: *Discs-large homologous regions* oder GLGF: Gly-Leu-Gly-Phe-Motiv) sind 80–100 Aminosäuren lange Sequenzmotive, die Protein-

Protein-Interaktionen vermitteln. Sie interagieren vorzugsweise mit äußersten C-Termini definierter Konsensussequenz. Ebenso wurde allerdings die Interaktion mit internen Sequenzen beschrieben (VAN HUIZEN *et al.*, 1998; HILLIER *et al.*, 1999). Namensgebend für PDZ-Domänen sind die drei Proteine, bei denen dieser Domärentyp erstmals beschrieben wurde: post synaptic density (PSD-95), Discs-large (DLG) und zonula ocludens-1 (zo-1). PDZ-Domänen lassen sich nach ihren Erkennungskonsensusmotiven (Spezifität für Bindung verschiedener Peptidliganden) in zwei Klassen unterscheiden. PDZ-Domänen vom TypI erkennen bei Interaktionspartnern das C-terminal gelegene Konsensusmotiv S/T-X-V/I/L, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (S-Serin, T-Threonin, V-Valin, I-Isoleucin, L-Leucin). Die Interaktion erfolgt zwischen dem Histidinrest der PDZ-Domäne und dem Threonin/Serin des Bindungspartners (SONGYANG *et al.*, 1997). Das Erkennungsmotiv von PDZ-Domänen TypII lautet ϕ -X- ϕ , wobei ϕ eine große, hydrophobe oder aromatische Aminosäure am C-Terminus des Bindungspartners bezeichnet. Hier interagiert ein Valinrest der PDZ-Domäne mit Tyrosin/Phenylalanin des gebundenen Peptids (DANIELS *et al.*, 1998). Für einige PDZ-Domänen wurde Dimerisierung beschrieben. Diese Interaktion erfolgt über eine 30 Aminosäuren lange C-terminale Ausdehnung der PDZ-Domäne, die einen β -hairpin-Finger bildet, dessen erster Strang die C-terminale Struktur eines Peptidliganden nachahmt (HILLIER *et al.*, 1999; TOCHIO *et al.*, 1999). Die exakte Struktur von PDZ-Domänen ist beschrieben bei HATA *et al.*, 1998; MORAIS CABRAL *et al.*, 1996 und DOYLE, 1997. Auch für INAD ist die Interaktion mit einem weiteren INAD beschrieben, wobei homo- und heterophile Interaktionen der PDZ-Domänen 3 und 4 vorkommen (XU *et al.*, 1998; FANNING AND ANDERSON, 1999).

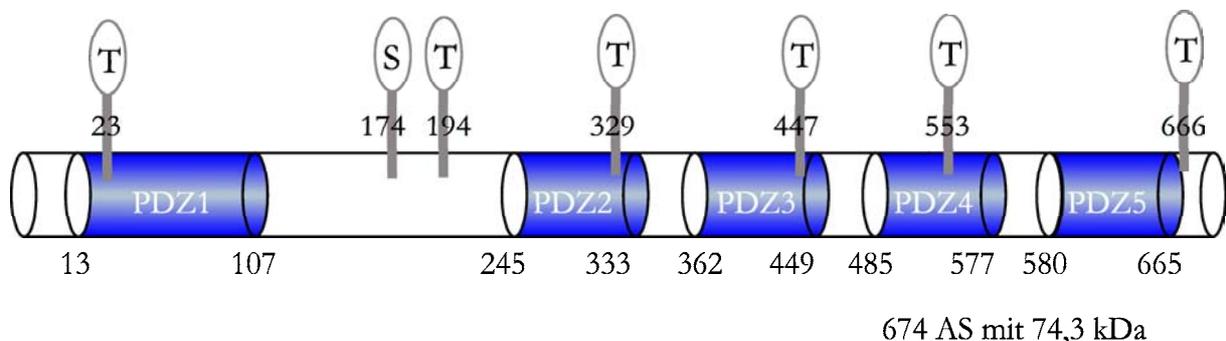


Abbildung 2.3: INAD von *D. melanogaster* in schematischer Darstellung

Die Struktur von INAD mit der Lage der fünf PDZ-Domänen (PDZ1–PDZ5) wurde nach TSUNODA *et al.*, 1997 dargestellt, wobei die Zahlen die Aminosäurepositionen angeben. S (Serin) und T (Threonin) indizieren potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C. Die Phosphorylierungsstellen wurden mit dem Programm *phosphorylation site prediction for sequence* (http://cbs.dtu.dk/htbin/pbase_predict.pl) unter Verwendung des PROSITE PKC-Musters ermittelt.

Die PDZ-Domänen von INAD erkennen die Bindungsmotive sowohl vom TypI (PDZ2, PDZ3, PDZ4) als auch vom Typ II (PDZ1). Für PDZ2 ist die Interaktion mit ePKC beschrieben (ADAMSKI *et al.*, 1998; KUMAR AND SHIEH, 2001). PDZ3 bindet TRP (SHIEH AND ZHU, 1996; VAN HUIZEN *et al.*, 1998) und darüber hinaus auch ePKC (WES *et al.*, 1999). Die vierte PDZ-Domäne interagiert entweder mit TRP (WES *et al.*, 1999) oder

assoziiert mit ePKC (WES *et al.*, 1999; TSUNODA *et al.*, 1997). Die Typ II-Domäne PDZ1 interagiert mit PLC β (VAN HUIZEN *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998) unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (KIMPLE *et al.*, 2001). Für INAD-PDZ5 wurde darüber hinaus eine Interaktion mit PLC β gezeigt (TSUNODA *et al.*, 1997), die auf einer Interaktion mit einer unbestimmten internen Sequenz beruht (VAN HUIZEN *et al.*, 1998). INAD-PDZ1 wird ferner im Zusammenhang mit Membranassoziation diskutiert (TSUNODA *et al.*, 2001). Experimentelle Belege der Ligandenbindung an die einzelnen PDZ-Domänen von INAD weisen auf Variationen beziehungsweise Mehrfachbindungen einzelner Komponenten hin; PLC β zum Beispiel zeigt eine C-terminale Interaktion mit PDZ1 sowie PDZ5-Assoziation über ein internes Motiv innerhalb der Gq α -Interaktionsstelle (VAN HUIZEN *et al.*, 1998, weitere Interaktionen: SHIEH AND ZHU, 1996; TSUNODA *et al.*, 1997; ADAMSKI *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998; WES *et al.*, 1999).

Die Redundanz der potentiellen Interaktionsstellen einzelner Komplexmitglieder sowie die Interaktion von INAD-Proteinen untereinander werden als Belege für Modelle der Bildung von makromolekularen Signalkomplexeinheiten (Transducisome, TSUNODA *et al.*, 1997) beziehungsweise Signalnetzwerken (*signaling plex*: LI AND MONTELL, 2000) interpretiert. Dabei kommt INAD mit seinen fünf PDZ-Domänen als Gerüstprotein eine zentrale Rolle zu (Übersichtsartikel: HUBER, 2001). INAD besitzt darüber hinaus eine Calmodulin-Bindungsstelle zwischen PDZ1 und PDZ2, die im Zusammenhang mit Ca²⁺-abhängiger Regulation diskutiert wird (XU *et al.*, 1998). Eine Assoziation mit NINAC Myosin III impliziert eine Interaktion zwischen INAD und dem Cytoskelett (WES *et al.*, 1999, siehe Kapitel 2.3.5). Funktional wirkt INAD als regulatorische Untereinheit des TRP-Ionenkanals (SHIEH AND ZHU, 1996). Das Protein ist in die negative *feed back*-Regulation der Phototransduktionskaskade involviert. Es ist als Mitglied des Kernkomplexes neben TRP auch für die dauerhafte Verankerung des Signalkomplexes in der rhabdomerischen Membran verantwortlich (LI AND MONTELL, 2000). Dabei werden TRP und INAD unabhängig voneinander zur Membran transportiert, jedoch in Abwesenheit des jeweils anderen Interaktionspartners nicht stabil verankert. Eine intrinsische Membranassoziation von INAD wird möglicherweise durch PDZ1 vermittelt, da INAD in Zellkultur ePKC co-lokalisiert (TSUNODA *et al.*, 2001).

2.3.2 TRP – Lichtabhängiger Kationenkanal der TRP-Proteinfamilie

Das integrale Membranprotein *transient receptor potential* (TRP, MONTELL AND RUBIN, 1989; WONG *et al.*, 1989) wurde funktional als Ionenkanal identifiziert. Der Kanal ist Ca²⁺-selektiv und operiert in Abhängigkeit von Licht (HARDIE AND MINKE, 1992). Für die Assoziation von TRP mit INAD und damit dem Signalkomplex werden zwei im C-terminalen Bereich lokalisierte Sequenzmotive diskutiert, zum einen ein distal vom C-Terminus gelegenes PDZ-Interaktionsmotiv (Aminosäure 1264–1266: 12 AS distal vom COOH-Terminus, TypI; SHIEH AND ZHU, 1996) für die Bindung an Domäne 3 sowie die

vier C-terminalen Aminosäuren von TRP (LI AND MONTELL, 2000).

Für TRP-Proteine wird angenommen, dass es sich um strukturelle Komponenten von Ca^{2+} -Einstromkanälen handelt (SELINGER *et al.*, 1993; BIRNBAUMER *et al.*, 1996). Die Proteinfamilie der TRP-Ionenkanäle ist durch gemeinsame Merkmale der Primärstruktur charakterisiert (Zusammenstellung: CLAPHAM *et al.*, 2001). Monomeres TRP enthält sieben hydrophobe Segmente. Sechs davon durchspannen die Membran mutmaßlich als Transmembrandomänen (S1–S6), wie aus Analogievergleichen zu spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen bei Vertebraten (CLAPHAM *et al.*, 2001) beziehungsweise zu spannungsgesteuerten Ca^{2+} - und Na^+ -Kanaltransmembrandomänen (BOULAY *et al.*, 1997) und Mutagenesestudien abgeleitet wurde. Die Analogievergleiche legen darüber hinaus eine Tetramerisierung von TRP zur Bildung eines funktionsfähigen Kanals nahe. Die Kanalpore wird dabei von den Aminosäuren gebildet, die sich jeweils zwischen der 5. und 6. Transmembranregion befinden. Zwischen den Mitgliedern der TRP-Familie bestehen die größten Unterschiede im C-terminalen Bereich. Den höchsten Konservierungsgrad erreichen Segmente in der S6-Transmembrandomäne, die vermutlich die größte Bedeutung für die Kanalsteuerung besitzt. Darüber hinaus zeigt die Primärstruktur von TRP-Kanälen am intrazellulären N-Terminus ankyrinähnliche Sequenzen (Ankyrin: Adaptormolekül zur Kopplung von Membranproteinen an das Spektrin-basierte Membrancytoskelett). Die Anzahl variiert zwischen einzelnen Unterfamilien: 2–4 Elemente bei kurzen und osm-9-ähnlichen TRPs, keine bei Mitgliedern der M-Familie (lange TRPs). Kurze und lange TRP-Proteine besitzen darüber hinaus eine prolinreiche, zytosolische Region im proximalen C-terminalen Bereich (CLAPHAM *et al.*, 2001). Gemeinsam ist den Proteinen der TRP-Familie (Ausnahme: osm-9-ähnliche TRP-Proteine) eine TRP Domäne, ein 25 aminosäureumfassendes hochkonserviertes Segment lokalisiert im Anschluß an die sechste Transmembrandomäne (MONTELL *et al.*, 2002). Sequenzähnlichkeiten unterteilen die TRP-Proteine (von Mammalia) in die Unterfamilien lange (oder Melastatin- = M), kurze (= C) und osm9- (oder Vanilloid- = V) ähnliche TRP-Proteine (HARTENECK *et al.*, 2000). Weitere Subfamilien sind TRPP und TRPML mit entfernter Verwandtschaft (nach den Gründungsmitgliedern der jeweiligen Subfamilie PKD2 beziehungsweise Mucolipidin, MONTELL, 2001). In Fliegen und Würmern ist darüber hinaus noch TRPN beschrieben (z.B. Mechanosensor NOMPC), eine TRP-Subfamilie mit einer großen Anzahl Ankyrinrepeats (MONTELL *et al.*, 2002). NOMPC wurde kürzlich auch für Vertebraten beschrieben (zum Beispiel Zebrafisch, SIDI *et al.*, 2003). Als Aktivierungsmechanismus gilt bei kurzen TRPs die rezeptorvermittelte Stimulation von PLC-Aktivität, bei langen TRP-Proteinen ist der Öffnungsmechanismus unbekannt. Osm9-ähnliche TRPs antworten auf physikalische oder chemische Stimuli.

Drosophila-TRP (DmTRP) und der zweite lichtabhängige Ionenkanal der Diptere, DmTRPL, sind die zuerst beschriebenen Mitglieder der TRP-Proteinfamilie. Drosophila-TRP und DmTRPL zählen zu den kurzen TRP-Kanälen. Sequenzanalysen ergeben für Drosophila-TRP folgende Struktur motive (Vergleich: Abbildung 2.4):

Kationenkanal-typische Transmembranregionen, eine TRP-Domäne (ein Motiv aus drei

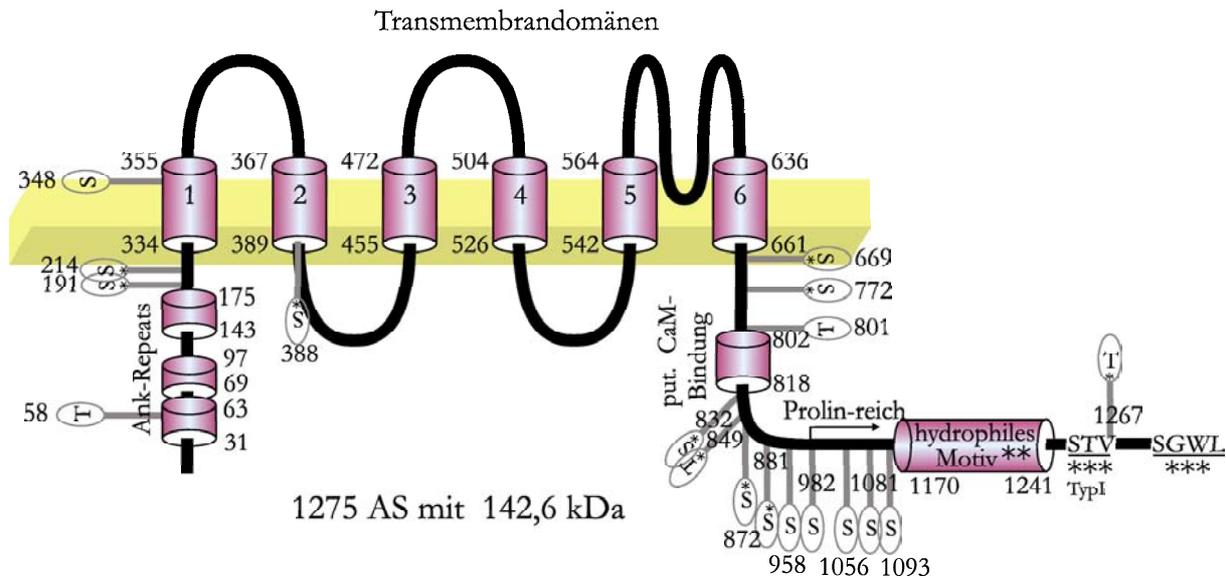


Abbildung 2.4: Strukturmodell von *D. melanogaster*-TRP

Die Aminosäurepositionen der sechs Transmembrandomänen (1–6) von TRP sind durch Zahlen gekennzeichnet. Durch Alignments von DmTRP, DmTRPL, *Anopheles*-TRP1, 2, 3 sowie Maus-TRPC1 und TRPC2 wurde ihre Lage verifiziert. Die Position potentieller PKC-Phosphorylierungsstellen (S–Serin, T–Threonin), bestimmt mit dem Programm *phosphorylation site prediction for sequence* (http://cbs.dtu.dk/htbin/pbase_predict.pl) unter Verwendung des PKC-PROSITE-Konsensusmotivs, ist ebenfalls angegeben.

Weiterhin wurden folgende Strukturmerkmale kenntlich gemacht: *: potentielle ePKC-Phosphorylierungsstelle konserviert zur Sequenz von *C. vicina*-TRP; Ank: Ankyrin (Adaptormolekül, das die Kopplung von Membranproteinen an das Spektrin-basierte Membrancytoskelett vermittelt); CaM: Calmodulin, in Verbindung mit einer putativen Bindungsstelle; **: neunfache Wiederholung des Motivs DKDKKP(G/A)(D/A); ***: PDZ-Domänen-Interaktionsmotiv.

Elementen, das eine Signatur für Proteine der TRP-Familie bildet; INTERPRO-Accession No: PR01097), drei Ankyrin-Motive sowie ubiquitin-ähnliche Bereiche (Referenzen: Flybase). Im ebenfalls intrazellulär gelegenen C-Terminus befinden sich eine Calmodulin-Bindungsstelle, eine prolinreiche Region (wird in Zusammenhang mit [Thapsigargin-induzierbarem] kapazitivem Ca^{2+} -Einstrom [CCE] gebracht, siehe VACA *et al.*, 1994) sowie eine neunfache Wiederholung des hydrophilen Motivs DKDKKP-(G/A)(D/A) (HUBER *et al.*, 1996a). Die Primärstruktur von DmTRP enthält 18 potentielle Konsensusmotive für PKC, zehn davon sind zwischen *Calliphora vicina* und *Drosophila* konserviert. Auffällig ist eine Häufung im Intrazellulärbereich am C-Terminus. Die Bedeutung der TRP-Phosphorylierung (HUBER *et al.*, 1996a; HUBER *et al.*, 1998 für TRP von *C. vicina*; LIU *et al.*, 2000 für DmTRP) durch ePKC, die mit TRP im INAD-Signalkomplex assembliert ist, wurde bisher nicht geklärt. Vermutet wird eine Inaktivierung des TRP-Kanals (HARDIE *et al.*, 1993; ADAMSKI *et al.*, 1998). Möglicherweise ändert sich die Kanalkonformation in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand und blockiert die Kanalpore.

Ionenkanäle liegen vielfach nicht in Form von Mono- oder Homomultimeren in Membra-

nen vor, sondern sind mit anderen Proteinen zu heteromeren Komplexen verbunden. Ein *store operated* (siehe unten), auswärts gerichteter Strom bei gemeinsamer rekombinanter Expression von TRP und TRPL (in HEK 293T-Zellen), der bei singulärer Expression einer der Kanäle nicht meßbar ist, legt eine heteromultimere Assoziation von TRP und TRPL nahe (XU *et al.*, 1997). Gestützt, jedoch modifiziert wird diese Hypothese von Daten die zeigen, dass nicht-INAD-gebundenes TRP nur in Anwesenheit von TRPL zur Photoantwort beiträgt (LEUNG *et al.*, 2000).

Der Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ vermittelt durch TRP (und TRPL) depolarisiert die Photorezeptorzelle. In Fliegen, mutant für TRP, ändert sich der elektrophysiologische Phänotyp von einer anhaltenden in eine transiente Lichtantwort. Kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom (*store-operated Ca^{2+} entry*), wonach Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (submikrovilläre Zisternen: ER direkt hinter mikrovillärer Photorezeptormembran) mobilisiert wird und die Aktivierung der Ionenkanäle vom Ca^{2+} -Status (Füllungszustand) dieser Speicher abhängt, wird als ein Modell für den noch nicht detailliert geklärten Aktivierungsmechanismus diskutiert. Aus extrazellulären Bereichen einströmendes Ca^{2+} regeneriert die intrazellulären Speicher demnach. Das Modell wurde aus dem Zeitverlauf der TRP-abhängigen Ströme in *Drosophila* abgeleitet (HARDIE AND MINKE, 1992). Die Kopplung dieses postulierten Mechanismus an den sekundären Botenstoff IP_3 , der im Prozess der TRP-Aktivierung durch $\text{PLC}\beta$ -Aktivität freigesetzt wird, widerspricht die Charakterisierung von IP_3 -Rezeptor-Mutanten, die keine Defekte in der Phototransduktion aufweisen (ACHARYA *et al.*, 1997; RAGHU *et al.*, 2000a). SWATTON *et al.*, 2001 zeigten, dass es in *D. melanogaster* nur einen IP_3 -Rezeptor gibt. Ein konträres Modell favorisiert die Involvierung des zweiten von $\text{PLC}\beta$ gebildeten Botenstoffes DAG in die Aktivierung der lichtabhängigen Ionenkanäle. Postuliert wird eine direkte Aktivierung der Kanäle durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), die sich aus DAG metabolisieren lassen (CHYB *et al.*, 1999). Arachidon-, Linol- und Linolensäure, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, aktivieren rekombinant in *Drosophila* S2-Zellen exprimiertes DmTRPL ebenso wie TRP- und TRPL-Kanäle *in vivo* (CHYB *et al.*, 1999). Die direkte Aktivierung der Kanäle durch PUFAs wird allerdings durch Arbeiten zum Einfluß von metabolischem Stress auf den Aktivierungsmechanismus in Frage gestellt (Übersicht: MINKE AND AGAM, 2003). Metabolischer Stress führt zum Abbau von zellulärem ATP. Im Dunkeln kann dadurch eine konstitutive Aktivität von DmTRP und DmTRPL ausgelöst werden. Dieser Aktivierungsmodus beeinflusst ein Stadium der Phototransduktionskaskade, das unterhalb der PLC -Aktivierung im Signalweg liegt. PUFAs (Linolensäure und andere langkettige Fettsäuren) wirken als effiziente mitochondriale Entkoppler, die zum ATP-Abbau in der Zelle führen können. Die PUFA-vermittelte Aktivierung von TRP und TRPL könnte demnach indirekt über einen unbekanntem ATP-abhängigen Mechanismus erfolgen.

2.3.3 Phospholipase C β ($\text{PLC}\beta$)

Der Begriff Phospholipase C (PLC) bezeichnet Phosphodiesterasen, die die Spaltung von PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat, einem Membranphospholipid) katalysieren.

Diese hydrolytische Spaltung generiert lösliches IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) und membranständiges DAG (Diacylglycerol). IP_3 führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie beispielsweise Untersuchungen der IP_3 -Rezeptoren einer embryonalen Zelllinie von *Drosophila melanogaster* zeigen (SWATTON *et al.*, 2001). DAG aktiviert verschiedene Isozyme der Proteinkinase C-Familie. PKC-Isozyme sind in verschiedene Signalübertragungsprozesse involviert.

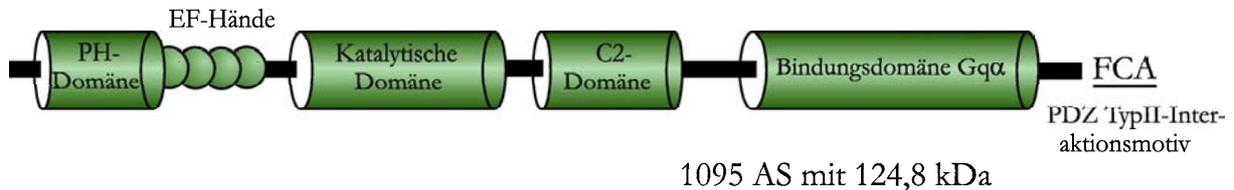


Abbildung 2.5: Modell der *norpA*-kodierten Phospholipase $C\beta$

Gekennzeichnet sind die funktionellen Regionen durch PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne (rund 100 AS, PIP_2 -Bindung), EF: Helix-Turn-Helix-Domäne (Ca^{2+} -bindende Domänen), C2-Domäne: Ca^{2+} /Lipidbindungsdomäne (Ca^{2+} -abhängige Phospholipidbindung oder IP_4 -Bindung; Übersicht: PROSITE-Pattern unter <http://www.expasy.ch/>) und Gqα: α -Untereinheit des visuellen G-Proteins.

Die Unterteilung der PLC-Isozyme erfolgt nach Primärstruktur und Regulationsmodus (Übersicht in: CLAPHAM *et al.*, 2001). Phospholipasen C werden in vier Subklassen unterteilt (CULLEN, 2001): $\text{PLC}\beta$, $\text{PLC}\gamma$, $\text{PLC}\delta$ und $\text{PLC}\epsilon$, wobei $\text{PLC}\epsilon$ erst 2001 charakterisiert wurde (SINGER *et al.*, 2002). Gemeinsam sind den Phospholipase C-Isozymen verschiedene Domänen: eine PH (Pleckstrin-homologe)-Domäne, vier EF-Hand-Motive, die katalytische Domäne und eine C2-Domäne. PH-Domänen sind Sequenzen von rund 100 Aminosäuren, die in vielen Signalmolekülen vorkommen. Die Funktion von Pleckstrin ist unbekannt. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass PH-Domänen spezifisch PIP_2 binden (GST-PH- $\text{PLC}\delta$: RAUCHER *et al.*, 2000; GST-PH-Grp1, GST-PH-DAPP1: FERGUSON *et al.*, 2000; EGFP-PH- $\text{PLC}\delta$, DsRed-PH- $\text{PLC}\delta$: ZIMMERMANN *et al.*, 2002). Prinzipiell sind PH-Domänen Substrat von PKC. Als EF-Hände werden Ca^{2+} -bindende Domänen bezeichnet, die ebenso als Helix-Turn-Helix-Domänen bekannt sind.

Charakteristisch für Phospholipasen $C\beta$ ist eine C-terminale Region mit signifikanten Sequenzhomologien über eine Spanne von etwa 250 Aminosäuren. Diese Region bindet spezifisch $\text{G}\alpha\text{q}$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und ist somit in die Aktivierung von $\text{PLC}\beta$ involviert (SINGER *et al.*, 1997; SINGER *et al.*, 2002). Inwieweit diese carboxyterminale Region die GAP-Aktivität von $\text{PLC}\beta$ vermittelt, ist nicht eindeutig geklärt. Jüngste Strukturanalysen der C-terminalen Domäne deckten auf, dass die Region drei Helices ausbildet, die als Überstruktur eine *coiled coil*-Form annehmen. Über diese Struktur werden $\text{PLC}\beta$ -Dimere ausgebildet, die zur simultanen Bindung zweier $\text{G}\alpha\text{q}$ -Untereinheiten befähigt sind. Möglicherweise lässt sich über diese Effektdimerisierung ein Regulationsmechanismus für G-Protein-gekoppelte Signalwege ableiten (SINGER *et al.*, 2002).

Die $\text{PLC}\beta$ (EC 3.1.4.11) im mikrovillären Photorezeptor von *Drosophila* wird von dem *norpA*-Gen (*no receptor potential A*) kodiert (BLOOMQUIST *et al.*, 1988). *NorpA* ist ein Homolog von $\text{PLC}\beta 4$ (KIMPLE *et al.*, 2001). Der Phänotyp von *norpA*-Nullmutanten

war bereits zuvor von PAK *et al.*, 1970 und HOTTA AND BENZER, 1970 charakterisiert worden: die elektrophysiologischen Ableitungen weisen kein Rezeptorpotential auf. Demnach kommt dem Enzym eine herausragende aktivierende Rolle in der Phototransduktion zu. PLC β ist ein integraler Bestandteil des INAD-Signalkomplexes und kann in diesem durch Bindung an INAD co-immunpräzipitiert werden (HUBER *et al.*, 1996a; TSUNODA *et al.*, 1997). Die Assoziation von PLC β mit INAD erfolgt über das C-terminale PDZ-TypII-Erkennungsmotiv FCA in PLC β (SHIEH *et al.*, 1997) an die erste (VAN HUIZEN *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998) und/oder fünfte (TSUNODA *et al.*, 1997; VAN HUIZEN *et al.*, 1998) PDZ-Domäne von INAD. Abweichend von TSUNODA *et al.*, 1997 charakterisiert VAN HUIZEN *et al.*, 1998 die Bindung von INAD-PDZ5 an eine PLC β -interne Region, die mit der G-Proteinbindungssequenz überlappt. Verglichen mit weiteren Interaktionspartnern von INAD weist die Assoziation von PLC β und INAD weitere Besonderheiten auf. Beide Proteine werden neben der PDZ-Domänen-Interaktion kovalent durch eine Disulfidbrücke (INAD-Cys₃₁ und PLC β -Cys₁₀₉₄; KIMPLE *et al.*, 2001) verknüpft.

Es wurde gezeigt, dass transgen exprimierte PLC β ohne INAD-Assoziation ein abnormales ERG (Elektroretinogramm) verursacht (langsamere Kinetik), was auf eine Regulation der Aktivierung und Deaktivierung durch INAD-Kopplung schließen läßt (SHIEH *et al.*, 1997). Die Assoziation von PLC β mit ePKC im INAD-Signalkomplex läßt eine Regulation vermuten, zumal *D. melanogaster*-PLC β 15 Konsensusmotive für PKC-Phosphorylierungen aufweist. In *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten am INAD-Signalkomplex sowohl von *C. vicina* (HUBER *et al.*, 1998) als auch von *D. melanogaster* (LIU *et al.*, 2000) wurden jedoch keine Hinweise für PLC β -Phosphorylierung durch ePKC gefunden.

NorpA-kodierte PLC β ist, unabhängig vom adaptierten Lichtzustand, hauptsächlich membranassoziiert (MCKAY *et al.*, 1994).

2.3.4 ePKC: die augenspezifische Proteinkinase C

Der im elektrophysiologischen Phänotyp als *inaC* auffälligen Mutante von *Drosophila* (Fehlen eines verlängerten Nachpotentials und Inaktivierung des Rezeptors) fehlt eine Proteinkinase C, die spezifisch in Photorezeptorzellen exprimiert wird (ePKC, SCHAEFFER *et al.*, 1989). Die Familie der PKCs umfaßt verwandte Serin- / Threoninkinasen, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Aktivatorsensitivität nur geringfügig unterscheiden. Aktiviert werden PKCs über einen Lipid-*second messenger*. Die Aktivierung der meisten Mitglieder der PKC-Familie ist abhängig von Phosphatidylserin (PS) und DAG sowie in verschiedenem Ausmaß von Ca²⁺. Aus Homologie und Aktivatorsensitivität ergibt sich die Aufgliederung in mindestens drei PKC-Subfamilien (Übersicht: MOCHLY-ROSEN AND GORDON, 1998). Klassische oder cPKCs (dazu zählen α , β I und β II, zwei alternative Spliceformen mit 50 AS Sequenzvariation, und γ) enthalten vier homologe Domänen (C1, C2, C3, C4), die durch isozymspezifische variable (V-) Regionen unterteilt werden. Ihre Aktivierung ist abhängig von Ca²⁺, PS und DAG oder Phorbol ester. Neuen oder nPKCs (δ , ϵ , η , θ) fehlt die C2-Domäne. Die Aktivierung ist Ca²⁺-unabhängig. Der Familie der atypischen oder aPKCs (ζ , λ / τ) fehlt die Homologiedomäne C2 sowie eine Hälfte von

C1. Atypische PKC sind unabhängig von DAG, PS und Ca^{2+} . PKC μ oder auch PKD entspricht keiner der bisher genannten PKC-Familien. PKC μ ist phospholipidabhängig, Ca^{2+} -insensitiv und wird durch Phorbolster aktiviert. Sie enthält zwei einzigartige hydrophobe Domänen im N-terminalen Bereich (putative Transmembransequenzen), besitzt eine putative Pleckstrin-Homologiedomäne sowie eine abweichende katalytische Domäne. InaC (ePKC) zählt zu den klassischen, Ca^{2+} -aktivierten PKCs, wie die strukturelle Unterteilung in C1–C4 und die entsprechenden V-Bereiche zeigt (Abbildung 2.6, EC 2.7.1.37). Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung sowie die ePKC-Aktivierung durch β -Phorbol-12-myristyl-13-acetat (PMA, DAG-Ersatz) und PS wurden experimentell gezeigt (SANDER, 1996). Katalysiert wird die Übertragung einer γ -Phosphatgruppe von Adenosin triphosphat (ATP) auf das Substrat. Spezifisch für ePKC ist die Kopplung der *in vivo*-Aktivität an die Assoziation von ePKC an INAD (ADAMSKI *et al.*, 1998). Für ePKC, sowohl von *D. melanogaster* als auch von *C. vicina*, ist das Vorhandensein einer PKC-typischen Pseudosubstratsequenz am Beginn der regulatorischen Domäne beschrieben (SANDER, 1996). Pseudosubstratregionen werden als Autoinhibitorsequenzen für die katalytische Domäne beschrieben.

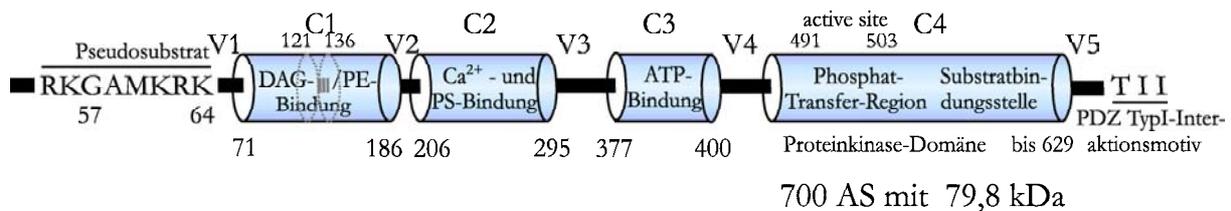


Abbildung 2.6: Strukturmodell von ePKC (EC 2.7.1.37)

Dargestellt ist die funktionelle Struktur mit Zahlenreferenz der Aminosäurepositionen, wobei DAG: Diacylglycerol, PE: Phorbolster (kann DAG ersetzen), PS: Phosphatidylserin, V1–V5: variable Regionen und C1–C5: konservierte Regionen kennzeichnet.

Sowohl TRP als auch INAD sind ePKC-Substrate (HUBER *et al.*, 1996a; HUBER *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2000), nicht aber die ebenfalls im INAD-Signalkomplex assoziierte PLC β (LIU *et al.*, 2000), obwohl auch sie potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen (Erkennungssequenz: PROSITE-Pattern X-S/T-X-R/K) aufweist (siehe 2.3.3). Die Bedeutung der Phosphorylierungen ist bisher nicht geklärt. Vermutet wird eine Deaktivierung der Rhodopsin-vermittelten Signaltransduktion (RANGANATHAN *et al.*, 1991), speziell eine Inaktivierung des TRP-Kanals (ADAMSKI *et al.*, 1998; HARDIE *et al.*, 1993). Ebenfalls nicht geklärt ist, wieviele und welche der 18 potentiellen Phosphorylierungsstellen in *Drosophila*-TRP (10 davon sind zwischen *C. vicina* und *D. melanogaster* konserviert) *in vivo* phosphoryliert werden oder ob es bei mehreren Phosphorylierungen eine bevorzugte Reihenfolge beziehungsweise Abhängigkeit gibt (Beispiel Proteinkinase CKI: N-terminales S/T muss phosphoryliert sein oder Proteinkinase GSK3: C-terminal und 4S müssen präphosphoryliert sein). Die Funktion der INAD-Phosphorylierung liegt gänzlich im Dunkeln, eventuell besteht ein Zusammenhang mit der negativen *feedback regulation* von INAD (SHIEH AND ZHU, 1996). Aber auch hier ist nicht beschrieben, welche der sieben (RFLP-Referenz: AE003458) potentiellen Phosphorylierungsstellen, die dem PKC-

Konsensusmotiv (PROSITE-Pattern: X-S / T-X-R /K) entsprechen, *in vivo* durch Phosphatgruppen modifiziert werden.

Inaktive PKCs mit vornehmlich cytosolischer Lokalisation werden durch ihre hydrophoben, membranlokalisierten Aktivatoren im aktivierten Zustand mit der Plasmamembran, Cytoskelettelementen, Kernen oder anderen subzellulären Bestandteilen assoziiert. Die PKC-Lokalisation ist abhängig von der Bindung an spezifische Ankermoleküle (RACK–*Receptor for activated C-kinase*, RICK–*Receptor for inactive C-kinase isozymes*), die selbst keine PKC-Substrate sein müssen. Einige PKC-bindende Proteine, die mit PKC über Phosphatidylserin (PS) oder Lipidbrücken verbunden sind (C2-Domäne oder bei nPKC variable Region), stellen auch Substrate der PKC dar. INAD verankert inaktive ePKC und kann somit eine Funktion als ePKC-selektiver RICK haben. Fehlt die Bindung an INAD wird ePKC proteolytisch abgebaut. Neben der Verankerung von PKC in der Nähe zum Aktionsort im Rhabdomer scheint eine weitere Rolle von INAD der Schutz von ePKC vor zellulären Proteasen zu sein (MOCHLY-ROSEN AND GORDON, 1998). Die Selektivität von INAD für ePKC im Vergleich zu anderen PKC-Isozymen sowie die aktivierungs- oder PMA-induzierte Freisetzung der ePKC von INAD wurde bisher nicht beschrieben (MOCHLY-ROSEN AND GORDON, 1998). Anzumerken ist, dass die *in vivo*-Aktivität von der ePKC-Assoziation mit INAD abhängig ist (ADAMSKI *et al.*, 1998).

2.3.5 Weitere Assoziationspartner

Neben den vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes (TRP: SHIEH AND ZHU, 1996, ePKC: HUBER *et al.*, 1996b; ADAMSKI *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998, PLC β : HUBER *et al.*, 1996a; CHEVESICH *et al.*, 1997 und INAD: HUBER *et al.*, 1996a; TSUNODA *et al.*, 1997) wird eine Reihe von Proteinen als weitere Interaktionspartner des Signalkomplexes diskutiert. Dazu zählen der Lichtrezeptor Rhodopsin (CHEVESICH *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1998; Interaktion mit PDZ3 und PDZ4), ein zweiter lichtabhängiger Ionenkanal TRPL (XU *et al.*, 1998; Interaktion: PDZ3 und PDZ4), Calmodulin (CHEVESICH *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1998) und das NINAC-Genprodukt (Myosin III: WES *et al.*, 1999; Interaktion: PDZ1). Die INAD-Bindungspartner lassen sich in drei Klassen einteilen (LI AND MONTELL, 2000): Klasse I-Bindungspartner sind für die Verankerung von INAD und dessen Liganden, deren Lokalisation signalkomplexabhängig ist, erforderlich. Diese Klasse umfaßt exklusiv TRP. Zur Klasse II zählen Proteine, deren Lokalisation und Stabilität von INAD abhängig ist: PLC und ePKC. Die dritte Klasse umfaßt die INAD-Interaktionspartner, die INAD-unabhängig in den Rhabdomeren lokalisiert werden (Rhodopsin, NINAC, TRPL). Bindungspartner der Klassen I und II sind aufgrund ihrer Lokalisationsabhängigkeit konstitutiv an INAD gebunden. Den mutmaßlich temporär assoziierten Mitgliedern der dritten Klasse kommt vermutlich eine direkte Rolle in der Photoantwort zu, möglicherweise sind sie an der schnellen Aktivierung und Deaktivierung beteiligt (LI AND MONTELL, 2000).

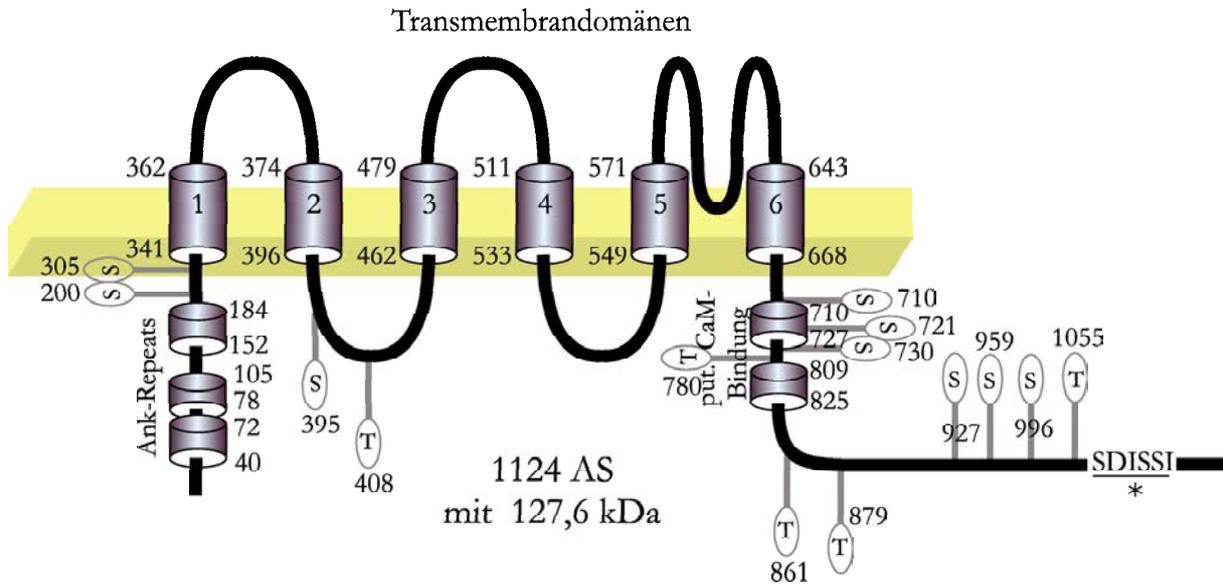


Abbildung 2.7: Modell von *D. melanogaster*-TRPL

In dieser Abbildung sind die Strukturdomänen von DmTRPL wiedergegeben als:

1–6: Transmembrandomänen, Ank: Ankyrin, put. CaM: putative Calmodulin-Bindungsstellen, *: TypI PDZ-Domänen-Interaktionsmotive, S: Serin und T: Threonin (potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen). Die Phosphorylierungsstellen entsprechen dem PROSITE PKC-Konsensusmotiv und wurden ermittelt unter Verwendung der *phosphorylation site prediction for sequence* (http://cbs.dtu.dk/htbin/pbase_predict.pl). Die Lage der Transmembrandomänen ist angegeben im Vergleich zu DmTRP, *Anopheles*-TRP1, 2, 3 und Maus-TRPC1 und C2.

Für TRPL, den zweiten lichtabhängigen Ionenkanal der mikrovillären Photorezeptormembran, wurde eine Interaktion mit dem INAD-Signalkomplex über Immunophilin FKBP59 dargestellt (GOEL *et al.*, 2001). Hinweise für eine Assoziation von TRPL mit dem INAD-Hauptkomplex via INAD (XU *et al.*, 1998) stehen im Gegensatz zu dem Fehlen geeigneter Interaktionsmotive für PDZ-Domänen im Vergleich von TRPL zu TRP (Abbildung 2.7). Denkbar ist ebenso eine indirekte Assoziation von TRPL durch Ausbildung heteromultimerer Ionenkanäle in Verbindung mit TRP (siehe Kapitel 2.3.2). Die nachgewiesene Translokation des TRPL-Kanals in Abhängigkeit von Licht (BÄHNER *et al.*, 2002) wirft weitere Fragen über die Assoziationen des Ionenkanals, auch in Hinblick auf stationäre und temporäre Protein-Protein-Interaktionen, auf. Ebenso ist wenig über mögliche TRPL-Regulationsmechanismen bekannt; eine lichtabhängige Phosphorylierung durch ePKC wie für TRP konnte bisher nicht belegt werden. Eine neuere Arbeit weist darüber hinaus das Vorhandensein eines dritten Ionenkanals, TRP γ (XU *et al.*, 2000) aus der TRP-Proteinfamilie nach. Seine Beteiligung an der Phototransduktion wird kontrovers diskutiert, da elektrophysiologische Effekte nur nach einer physischen Kopplung (Fusion) an TRPL detektierbar sind.

2.4 S2 – Embryonale Insektenzellen als rekombinantes Expressionssystem

S2-Kulturen gingen aus einer der von Schneider 1972 angelegten primären Zelllinien von *Drosophila melanogaster* [Oregon-R] (SCHNEIDER, 1972) hervor. Die primären Zellen stammen aus späten (20–24 Stunden) Embryonen, bei denen es sich mutmaßlich um eine Makrophagenlinie handelt. Ein Indiz dafür ist die Demonstration des Scavenger Rezeptor-vermittelten Endocytosemechanismus in S2, der für embryonale Makrophagen charakteristisch ist (ABRAMS *et al.*, 1992). In S2-Zellen ist ebenso die Expression von Cecropinen durch Lipopolysaccharide induzierbar. Die Expression dieser Defensivproteine mit wichtiger Rolle in der Immunantwort wird im larvalen Fettkörper und einer Auswahl an larvalen Haemocyten von *Drosophila* induziert (SAMAKOVLIS *et al.*, 1990). Darüber hinaus ist die Expression weiterer Gene beschrieben, die in Immunfunktionen involviert sind (zur Übersicht: FERNANDEZ *et al.*, 1999).

Molekular und biochemisch sind S2-Zellen bisher nur wenig charakterisiert, werden jedoch für die rekombinante Expression der verschiedensten Proteine erfolgreich (authentische Prozessierung) eingesetzt. Dazu zählen intrazelluläre, sekretierte und membranassoziierte Proteine. Sie bieten zudem eine Möglichkeit zur Charakterisierung von in S2 funktional exprimierten *Drosophila*-eigenen Proteinen in Zellkultur. Beispielhaft dafür ist die erste funktionelle Charakterisierung des *Drosophila*-IP₃-Rezeptors, der Ca²⁺-Kanäle in Membranen interner Ca²⁺-Speicher formt (SWATTON *et al.*, 2001). Der genetische Hintergrund von S2-Zellen wird als männlich charakterisiert (SMITH *et al.*, 2000). Diese Einordnung beruht einerseits auf dem Fehlen des Sxl1-(Sex-lethal-)Genproduktes, das für die weibliche Differenzierung notwendig ist (RYNER AND BAKER, 1991). Zum anderen wird in S2-Zellen MSL2 exprimiert, die limitierende Komponente für die Dosiskompensationsmaschinerie, deren Synthese durch SXL1 verhindert wird (BASHAW AND BAKER, 1995; BASHAW AND BAKER, 1997; KELLEY *et al.*, 1995; KELLEY *et al.*, 1997). Für die rekombinante Expression von Proteinen ist die Wahl eines geeigneten Expressionssystems von entscheidender Bedeutung. Neben Zugänglichkeit des Proteins und erzielter Ausbeute spielt vor allem die Expression der nativen Proteinkonformation eine wichtige Rolle. Funktionelle Analysen des Expressionsproduktes fordern nicht nur die korrekte Transkription und Translation (*codon usage*), sondern auch die geeigneten posttranslationalen Modifikationen (beispielsweise proteolytische Spaltungen, Veränderungen der Termini, Glykosylierung, Lipidmodifikationen, Phosphorylierungen oder Disulfidbrückenbildungen). S2-Zellen sind demnach ein prädestiniertes Expressionssystem für die funktionelle Analyse von *Drosophila*-Proteinen in Zellkultur. Sie bieten die Möglichkeit zur korrekten Prozessierung und Analyse von *Drosophila*-Proteinen in einem vom Ursprung differierenden Gewebe-/Proteomhintergrund.

S2-Zellen besitzen ebenso Charakteristika, die für Untersuchungen von *Drosophila*-Ionenkanälen und Neurorezeptoren ideal erscheinen (YAGODIN *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur weiten Verbreitung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen in Insektenzellen (SKEER

et al., 1995) besitzen S2-Zellen weder endogene spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle noch endogene Rezeptoren für verschiedene Klassen von Neurotransmittern und Neuromodulatoren (YAGODIN *et al.*, 1998). Die Untersuchung der intrazellulären Kompartimente Zytosol, Kern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum (ER) und Lysosomen deckte auf, dass nur ER und Lysosomen einen höheren Ca^{2+} -Basalgehalt aufweisen als das Zytosol (YAGODIN *et al.*, 1999).

2.5 Problemstellung

Zelluläre Signalleitung ist für lebende Zellen von universeller Bedeutung. Die Organisation einiger Proteine eines Signalweges zu makromolekularen Multiproteinaggregaten wurde als ubiquitäres Merkmal der zellulären Signaltransduktion identifiziert. Der INAD-Signalkomplex im mikrovillären Photorezeptor von Dipteren ist ein Beispiel einer solchen Multiproteinassoziation.

Diese Arbeit umfasst in erster Linie die Etablierung der rekombinanten Co-Expression der Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes von *Drosophila melanogaster* in dem rekombinanten Expressionssystem S2-Zellen. Die Charakterisierung und Analyse der co-exprimierten INAD-Kernkomplexkomponenten in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund in Referenz zu assoziierten Linien mit singulärer Komponentenexpression beziehungsweise Co-Expression von drei der vier Proteine kann helfen, offene Fragen zu Funktionen des INAD-Signalkomplexes zu klären. Neben rekombinanter Expression sind Untersuchungen einzelner Aspekte der Signaltransduktion in Photorezeptoren von *Drosophila melanogaster* Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Im Vordergrund der Untersuchungen stehen folgende Fragen:

- Werden die vier Hauptkomponenten TRP, INAD, ePKC, PLC β in dem gewählten Zellkultursystem (Schneider2-Zellen) vollständig und funktionsfähig exprimiert?
- Wo sind die exprimierten Proteine lokalisiert und existiert eine Abhängigkeit der Lokalisation von co-exprimierten Komplexkomponenten?
- Erfolgt die Assemblierung eines rekombinanten INAD-Signalkomplexes (rINAD-Komplex) außerhalb des Photorezeptorproteomhintergrundes?
- Resultiert die Co-Expression einer Auswahl von Komplexkomponenten in der Bildung rekombinanter Teilkomplexe?
- Welchen Einfluss haben die einzelnen Komponenten des INAD-Signalkomplexes auf elektrophysiologische Messungen? Hat das Fehlen von Komponenten im rINAD-Komplex ähnliche Auswirkungen wie im mikrovillären Photorezeptor?
- Welche Aussagen resultieren aus der Charakterisierung der rekombinanten Co-Expression der Ionenkanäle TRP und TRPL?
- Können temporär assoziierte Interaktionspartner des INAD-Signalkomplexes identifiziert werden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Radiochemikalien, Verbrauchsmaterialien, Antibiotika, Enzyme und Kits

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchst erhaltlicher Reinheit („per analysi“). Wenn nicht anders vermerkt, wurden sie von den Firmen VWR International (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Weitere Materialien wurden bezogen von:

Radiochemikalien:

β -[³⁵S]-Methionin
(1000 Ci/mmol)

ICN Biomedicals GmbH (Eschwege)

Enzyme:

Restriktionsendonukleasen und
Puffer

MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Stratagene (Heidelberg), Invitrogen life technologies (Karlsruhe)

T4-DNA-Ligase

MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Invitrogen life technologies (Karlsruhe)

QUICK-STICK™ Ligation Kit

Bioline (Luckenwalde)

Alkalische Phosphatase

Roche Diagnostics (Mannheim)

Pfu-DNA-Polymerase

Stratagene (Heidelberg)

Taq-DNA-Polymerase

MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Invitrogen life technologies (Karlsruhe)

weitere DNA-Polymerasen
(BIOTAQ™, ACCUZYME™, IM-
MOLASE™)

Bioline (Luckenwalde)

Antibiotika:

Ampicillin, Kanamycin, Chlor-
amphenicol, Tetracyclin

Sigma-Aldrich (München)

Penicillin+Streptomycin
(10 000 U/ml+10 mg/ml)

Sigma-Aldrich (München), PAA Laborato-
ries (Cölbe)

Hygromycin B	Invitrogen life technologies (Karlsruhe), PAA Laboratories (Cölbe)
Zellkulturmaterial:	
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ²	A. Hartenstein Laborbedarf (Würzburg), Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzen	B. Braun (Melsungen)
serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht)
90 mm-Platten	Nunc über A. Hartenstein Laborbedarf (Würzburg), Sarstedt (Nümbrecht)
6-, 12-, 96-well-Platten	Nunc über A. Hartenstein Laborbedarf (Würzburg), Greiner Bio-One (Frickenhau- sen)
Fötale Kälberserum (FCS Gold, synthetisch)	PAA Laboratories (Cölbe)
S2-Zellkulturmedium:	
DES Expression Medium,	Invitrogen life technologies (Karlsruhe)
Drosophila-SFM	PAA Laboratories (Cölbe)
InsectExpress Sf9-S2	
Transfektionsreagentien	Calcium Phosphate Transfection Kit, Lipofectin: Invitrogen life technologies (Karlsruhe) Insectogen, Metafectene: Biontex Laboratories (München) jetPEI: Polyplus transfection SAS BP (Illkirch, Frankreich)
Verbrauchsmaterialien:	
HiTrap TM -Säulen, Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PVDF-Blotmembranen, Protein A-Agarose, Molekulargewichtsstandard: Precision Plus Protein TM Standards 10–250 kDa	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Röntgenfilme X-OMAT XAR-5-Filme, bezogen über Sigma-Aldrich (München)	EASTMAN KODAK Company (Rochester)
Adjuvantien: ABM-ZK und ABM-N	Linaris (Bettingen)

DES Expression System, TRIzol®-Reagenz, DNA-Größenstandards: SeeBlue Plus2- Leiter, 1 kb-Leiter, 1 kb Plus-Leiter	Gibco-BRL/Invitrogen life tech- nologies (Karlsruhe)
Ni-NTA, QiaExpressionist-System	Qiagen (Hilden)
CDP-Star™, Trypsin rekombinant Proteo- mics Grade	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein A/G-Agarose	Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn)
Blotpapier Whatman 3MM	Schleicher&Schuell (Dassel)
Kanülen: 26G x 1/2", 21G x 2", 23G x 2 2/5"	B. Braun (Melsungen)
CDP-Star, TNT® Coupled Reticulocyte Ly- sate System	Promega (Mannheim)
Kits zur Nukleinsäurereinigung:	
Mini Plasmid Preparation Kit	Qiagen (Hilden)
NucleoBond® Mega Plasmid Preparation	BD Biosciences (Heidelberg)
UltraMobiustm Plasmid Preparation 1000 Kit	Novagen (Bad Soden)
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
GLASSMILK®	(BIO 101, Inc., La Jolla, USA)

3.1.2 Zellstämme

Für rekombinante Expressionen sowie zur Amplifikation von Konstrukten wurden die im Anschluß aufgeführten Zellstämme verwendet.

3.1.2.1 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> M15[pREP4]	Qiagen, Hilden

3.1.2.2 Eukaryotische Zellen

S2-Zellen (Drosophila-Schneider2-Zellen)	Invitrogen life technologies, Karls- ruhe
S2-Zellen, Linie Wü-P15 (S2P15)	Martin Roth, Universität Würz- burg (Biozentrum)

3.1.3 Nukleinsäuren

3.1.3.1 Vektoren und Konstrukte

pMT/V5-HisA	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
pCoHygro	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
pBSCII SK ⁻ ,	Stratagene, Heidelberg
pBSC KS ⁻ ,	Stratagene, Heidelberg
pBSCII SK ⁺	Stratagene, Heidelberg
pEGFP-1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGNorpA650/10	laboreigen (Klonierung: aus cDNA-Subklon SH181 in pIB131, Referenz: W.L. Pak)
pcDNA3/DmTRP	laboreigen
DD7.1a – DmePKC	SANDER, 1996
inaDN2	laboreigen (Klonierung: EST GH22204 und HL04263, pBSC/DmINAD)
RTIE4	laboreigen (Klonierung: DmTRPL-EGFP-Fusion unter Rh1-Promotor, pBSCII/Rh1-DmTRPL-EGFP)
DmTRP3.1	Antigenexpression: BÄHNER, 2001
pMT-DEST48	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
pENTR TM A1- TRPL _K -HcRed	laboreigen (Klonierung: DmTRPL-HcRed-Fusion, pENTR TM A1-Vektor)

3.1.3.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Die in Auftragssynthese von MWG Biotech AG, Ebersberg produzierten Oligonukleotide wurden für PCR-Reaktionen eingesetzt. PCR-Produkte für die Erstellung von Fusionsproteinsequenzen enthalten Primer-vermittelte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (grafische Unterlegung der Sequenz). Für Sequenzierungen erfolgte die Markierung mit Cy5. Ein Teil der Sequenzierungsprimer wurde für Auftragssequenzierung durch die Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg erstellt.

Name	Sequenz	Anmerkungen
Sp6-Cy5 (MWG)	5'-CATTTAGGTGACACTA-3' G(pOT2-Vektor)	Angabe aus pcDNA3-Vektor (Invitrogen)
T7-Cy5	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	laboreigener Primer
NA1 (MWG)	5'-AAAGACGACATTCGTAACGATGC-3'	<i>in frame</i> -Fusion C-Term Dm <i>norpA</i> EcoRI/XhoI mit V5-His in pMT/V5-HisA

NA2(rev) (MWG)	5'-AATACTCGAGATTGATCTGGGAATCT TTGGCAC-3'	—XhoI	<i>in frame</i> -Fusion C-Term Dm <i>norpA</i> EcoRI/XhoI mit V5-His in pMT/V5- HisA
FU1 (MWG)	5'-GACAATACCCGGAGATTGACAGC-3'		Fusion INAD-EGFP
FU2 (MWG)	5'-AATAGGTACCGTGGCCTTGGGTGCCT CCGTACG-3'	—KpnI	Fusion INAD-EGFP
INAD1 (MWG- Auftrag)	5'-GATTCTATTGACTCTCAAGAGC-3'		Sequenzanalyse GH27648/b, GH22204/1
MTF (MWG- Auftrag)	5'-CATCTCAGTGCAACTAAAGG-3'		Sequenzanalyse GH22204/1 (INAD) in pMT
pc (MWG- Auftrag)	5'-AATCTTCCGTGTCAGCTCCG-3'		Sequenzanalyse GH22204/1 in pMT
INADX (MWG- Auftrag)	5'-CGTCAGAAGCATAGTAACTACG-3'		Sequenzanalyse GH22204/1, GH27648/b
INADY (MWG- Auftrag)	5'-GATCTTGAGGCGCTTGTCGG-3'		Sequenzanalyse GH22204/1
IN27A (MWG- Auftrag)	5'-ATGTCCGGTTCAGTGAGTCGCG-3'		Sequenzanalyse GH27648
IN27B (MWG- Auftrag)	5'-CATGCTGCTGGCCGTTAATCAG-3'		Sequenzanalyse GH27648
IN27C rev (MWG- Auftrag)	5'-CCCATCCACGTTCTTGAACACG-3'		Sequenzanalyse GH27648
IS1-Cy5 (MWG)	5'-GAGCAGTCGATCTCAAGCAGCG-3'		Sequenzanalyse
IS2-Cy5 (MWG)	5'-GTCAGATCCGCGGAGCAATGGC-3'		Sequenzanalyse
IS3-Cy5 (MWG)	5'-CAGGAAGATGAATTTGGCTACACG-3'		Sequenzanalyse
IS4-Cy5 (MWG)	5'-GTCTGATGAGACTAAGTTTATCTTCG-3'		Sequenzanalyse
IS5-Cy5 (MWG)	5'-CCAAGAAAGAGGAGGAAAAGCCAC-3'		Sequenzanalyse
IS6-Cy5 (MWG)	5'-CGTTGACCTTATGAAAAAAGCAGGC-3'		Sequenzanalyse

3.1.3.3 cDNA-Banken und ESTs

Als Quelle für kodierende INAD-Sequenzen wurden folgende EST-Klone aus den Drosophila-Kopf-cDNA-Banken GH und HL des Berkeley Drosophila Genom-Projekts bezogen: HL04263, GH22204, GH27648, HL01354, GH15701, GH06072.

Darüber hinaus wurde eine λ -cDNA-Bank (SANDER, 1996), generiert aus Drosophila-Köpfen, auf das Vorhandensein von INAD-Sequenzen untersucht.

3.1.4 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

TXWP-Tritonwaschpuffer:

0,1 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 4°C, 1 mM PMSF (frisch)

TXEP-Tritonextraktionspuffer/Tritonlysepuffer:

1 % (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 4°C, 1 mM PMSF (frisch)

3 %-TXEP-Tritonextraktionspuffer:

3 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 4°C, 1 mM PMSF (frisch)

5 x SDS-Probenpuffer (Laemmli):

325 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch)

6 x Glycerin/Bromphenolblau (BPB)-Puffer:

72 % (v/v) Glycerin, 0,06 % (w/v) BPB

1 x SDS-Probenpuffer:

65 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 12 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) BPB, 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch)

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 (Tris/Glycin zur pH-Einstellung)

1 x PBS (Phosphat-gepufferte Saline, S2-Zellkultur):

137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4

1 x PBS (Phosphat-gepufferte Saline):

1,9 mM NaH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,4

1 x TBS-T (Tris-gepufferte Saline mit Tween)

50 mM Tris/HCl pH 7,3, 50 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

BSA-Blockierungslösung

2 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Gelatine, 100 mM NaCl, 0,1 % (w/v) NaN_3 , in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,2

Äquilibrierungspuffer Western Blot NBT/BCIP

100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2

semi dry-Blotpuffer

50 mM Tris-Base, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol (frisch)

10 x TA-Puffer

330 mM Tris/Acetat pH 7,8, 660 mM KAc, 100 mM MgAc, 25 mM DTT,
1 mg/ml BSA

MP-Lösung I

50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA (100 µg/ml RNase A)

MP-Lösung II

0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS

MP-Lösung III

3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure, pH 5,8

3 x DNA-Probenpuffer

1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) BPB, 0,1 M EDTA, 50 % (v/v) Glycerin

0,2 M Phosphatpuffer pH 6,2

27,6 g/l NaH₂PO₄ mit 35,6 g/l Na₂HPO₄

Mowiol

29 % (v/v) Glycerin, 17 % (w/v) Mowiol 4.88, 66 % (v/v) PBS (1,7 % (w/v)
n-propyl-Gallate)

3.1.5 Kulturmedien

3.1.5.1 Kultur von *Escherichia coli*

LB (Luria Bertani)-Medium:

1 % (w/v) Bactopepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5
mit NaOH, steril

Permanentkulturmedium für *E. coli*

67 % Glycerin, 13,3 mM MgCl₂

Zur Selektion wurden Flüssigkulturen in LB-Medium supplementiert mit:

Ampicillin 50 bis 100 µg/ml	Chloramphenicol 12,5 µg/ml
Kanamycin 25 bis 50 µg/ml	Tetracyclin 12,5 µg/ml.

Für LB-Platten (LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar, steril) erfolgte der Einsatz der Antibiotika in zweifacher Konzentration.

3.1.5.2 Kultur von Schneider2-Zellen (S2)

Die Haltung der Zellen erfolgt in Medien der gegebenen Zusammensetzung:

Serumhaltiges Expressionsmedium (a):

DES Expression Medium (mit 2 mM L-Glutamin), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin G + 50 µg/ml Streptomycin

Serumhaltiges Expressionsmedium (b):

Drosophila-SFM + 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin G + 50 µg/ml Streptomycin

Serumhaltiges Expressionsmedium (c):

InsectExpress Sf9-S2, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin G + 50 µg/ml Streptomycin

Serumfreies Expressionsmedium:

Drosophila-SFM + 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin G + 50 µg/ml Streptomycin

Selektionsmedium (Hygromycin B-Selektion):

Serumhaltiges Expressionsmedium (a), (b) oder (c) supplementiert mit 300 µg/ml Hygromycin B

Einfriermedium:

45 % (v/v) frisches Expressionsmedium, 45 % (v/v) Expressionsmedium aus der Kultur, 10 % (v/v) DMSO

3.1.6 Versuchstiere

3.1.6.1 Fliegen

Drosophila melanogaster

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der verwendeten *Drosophila*-Stämme

Name	Charakterisierung	Primäreffekt	Referenz
<i>inaC</i> ^{P207}	Punktmutation T ₆₀₂ A, Primärstruktur V ₂₀₁ D	Expressionsprodukt nicht funktionell	PAK, 1979; SMITH <i>et al.</i> , 1991
<i>inaC</i> ^{P209}	Punktmutation G ₂₇₉ A, Translation bis W93	Nullmutante	PAK, 1979; SMITH <i>et al.</i> , 1991
<i>inaD</i> ^{P215}	Punktmutation T ₁₃₉₉ A, Primärstruktur M ₄₄₂ L	Mutation in PDZ-Domäne 3 verhindert Interaktion mit TRP	PAK, 1979; SHIEH AND NIEMEYER, 1995
<i>inaD1</i>	<i>amber</i> nonsense Mutation an Pos. 811	Nullmutante	TSUNODA <i>et al.</i> , 1997
<i>norpA</i> ^{P24}	28 bp-Deletion	Nullmutante (Pos. 2710–2737)	PAK, 1979
<i>trp</i> ^{P343}	Mutation unbestimmt	Nullmutante	PAK, 1979
<i>trpl</i> ^{β02}	nonsense Mutation (<i>amber</i>) an Pos. 302	Nullmutante	NIEMEYER <i>et al.</i> , 1996
<i>trp/trpl</i>	Doppelmutante <i>trp</i> ^{P343} und <i>trpl</i> ^{β02}	Nullmutante	SCOTT <i>et al.</i> , 1997
<i>trp</i>	unbekannt	in adulten Individuen kein TRP-Protein nachweisbar	—

Neben den als Wildtyp bezeichneten weißäugigen *Drosophila* A35 (*white*^{A35}) (Stamm Oregon R.) wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten Mutanten und transgenen Linien für Experimente verwendet. Die Fliegenstämme wurden auf Maismehlmedium bei 24°C gehalten. Das Alter der zur Präparation verwendeten Fliegen betrug zwischen einem und sieben Tagen, für Mutanten des INAD-Signalkomplexes vorzugsweise 2–4 Tage.

3.1.6.2 Kaninchen

Kaninchen beider Geschlechter (Gewicht: 1,5–2,0 kg) des Stammes „New Zealand White“ wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen und für die Immunisierung verwendet.

3.1.7 Verwendete Antikörper

Die folgende Zusammenstellung enthält alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit für immunocytochemische Markierungen, Western Blot Analysen und Immunpräzipitationen eingesetzt wurden.

Antiserum/gereinigte Antikörper	erzeugt in:	Verdünnung		Referenz
		WB	IC	
α -DmTRP _{#053}	Kaninchen	1:1000	1:50	BÄHNER, 2001
α -DmTRP _{#088}	Kaninchen	1:1000	1:50	diese Arbeit
α -DmINAD	Kaninchen	1:1000	1:50	BÄHNER, 2001
α -DmPLC β	Kaninchen	1:1000	—	BÄHNER, 2001
α -CvePKC _[312–685]	Kaninchen	1:2000	1:50	SANDER, 1996
α -EGFP	Maus-Hybridoma	1:1500	—	Anti-GFP Product Description
α -V5	Maus-Hybridoma	1:4000	1:200	Anti-V5 Product Description
α -DmTRPL III	Kaninchen	1:1000	—	BÄHNER, 2001
α -Maus-IgG-AP*	Ziege	1:25000	—	Anti-mouse IgG Product Description
Protein A-AP*	—	1:1000	—	Sigma-Aldrich, München
α -Kaninchen-A1F488	Ziege	—	1:150	MoBiTec GmbH, Göttingen
α -Kaninchen-A1F568	Ziege	—	1:150	MoBiTec GmbH, Göttingen
α -Maus-IgG-A1F660	Ziege	—	1:150	MoBiTec GmbH, Göttingen
α -Maus-IgG-A1F488	Ziege	—	1:150	MoBiTec GmbH, Göttingen
α -Kaninchen-TRITC/Rhodamin	Ziege	—	1:100	Sigma-Aldrich, München
α -Maus-IgG-Cy5	Schaf	—	1:100	Dianova, Hamburg

*AP: alkalische Phosphatase-Konjugat

3.1.8 Soft- und Hardware, spezielle Geräte

BioCapt Geldokumentationssystem	LTF Labortechnik, Wasserburg; BioCapt-Software: Version 99.02s
Mikroskop Leica TCS SP (Leica DMIRBE)	Leica Camera AG, Solms
LSM-Software:	TCS NT Version 1.6.582 von Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg Leica Confocal Software von Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg
Alignmentprogramme	Vector NTI (Informax, Los Angeles, USA) jellyfish (LabVelocity Inc., San Francisco, USA)
CCD-Kamera Kamera-Software	Leica DC200 (Leica Camera AG, Solms) Leica DC Twain Version 4, 1, 5, 0 (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Schweiz; 2001)
öffentliche Internetquellen	NCBI (National Center for Biotechnology Information): Pubmed, Sequenzdatenbanken Flybase (National Institutes of Health, USA (NIH) und Medical Research Council, London) SIB (Swiss Institute of Bioinformatics): ExPASy proteomics Server, Swiss-Prot and TrEMBL Datenbank, PROSITE-Datenbank
Bildbearbeitung	CorelDRAW 9, CorelDRAW 10, CorelPHOTO-Paint 10 (Corel, Ottawa, Kanada) Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems GmbH, Unterschleissheim) CADET V1.60 (2003) by Oscar Contreras Neat Image v2.2 Demo (1999-2002) by ABSOft
Digitalisierung: Western Blot Membranen und Filme	Flachbettscanner JX 330 (Sharp, Hamburg)
Statistische Analysen	Microsoft Excel in Office 2000 (Microsoft, Unterschleissheim)
Dokumentensatzsystem	LATEX (Autoren: L. Lamport, D. E. Knuth)

biflex IV MALDI-TOFF-Spektrometer Bruker Daltonics (Bremen)

SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator, HD2070 (UW2070 und GM2070 mit Sonotrode MS 72), Leistung: 70 W Bandelin electronics (Berlin)

3.2 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Standardprozeduren, die in SAMBROOK *et al.*, 1989 nachgelesen werden können.

3.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren: Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(Mini-)Präparation durch Alkalische Lyse

Nach BIRNBOIM AND DOLY, 1979 werden die Bakterien bei 37°C als 2 ml-Kulturen in LB-Amp-Medium über Nacht (6 bis 8 h) angezogen (Schüttler). Zum Ernten der Zellen werden die Kulturen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 20 800 x g 20 s in der Tischzentrifuge sedimentiert. Dem Dekantieren des Überstands folgt die Resuspension der *E. coli*-Zellen in 100 µl MP-Lösung I (vortexen). Nach Zugabe von 200 µl MP-Lösung II wird mehrfach umgeschüttelt (nicht vortexen). Die Addition von 150 µl MP-Lösung III und das Mischen des Ansatzes schließen sich an. Zentrifugiert wird für 10 min bei 20 800 x g in der Tischzentrifuge. Vom Überstand werden 500 µl abgenommen, mit 1 ml technischem Ethanol vermischt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmide werden durch Zentrifugation (10 min, 20 800 x g) sedimentiert und anschließend zweimal mit 500 µl 80 % (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min, 20 800 x g). Die DNA wird für 15 min luftgetrocknet und das Pellet in 25 µl aqua bidest aufgenommen.

Mini- und Mega-Präparationsprotokoll mittels Anionenaustausch an Silica-Material

Negative geladene DNA bindet unter Niedrigsalzbedingungen an positiv geladenes Silica-Material (z.B. Membran, Säule). Das Material mit gebundener DNA wird unter höheren Salzbedingungen gewaschen zur Entfernung von RNA und Proteinen. Unter Hochsalzbedingungen erfolgt abschließend die Elution der gereinigten DNA. Diese Methode der Plasmidpräparation aus *E. coli* dient der Gewinnung von hochreiner, besonders RNA-freier DNA für Anwendungen wie Transfektionen oder Sequenzierung. Teilweise ist eine Endotoxin-freie Aufreinigung von Plasmid-DNA möglich (UltraMobius-Kit, Fa. Novagen, Bad Soden), die für Transfektionen von Bedeutung ist. Für die Präparation unterschiedlicher DNA-Mengen werden verschiedene Kits verwendet (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers

(Manuals sind dem jeweiligen Kit beigelegt: NucleoBond® Plasmid Purification; Ultra-Mobius™ Plasmid Preparation 1000 Kit; QIAprep Miniprep Handbook).

3.2.2 Reinigung von Nukleinsäuren

3.2.2.1 PCR- und Gelbanden-DNA-Reinigung

Die DNA-Reinigung mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Für die DNA-Reinigung aus Lösungen (beispielsweise PCR-Ansatz) beträgt das Maximum der eingesetzten DNA-Lösung 100 µl pro Säule. Eine GFX-Säule wird in einem *collection tube* plaziert. Auf die Säule werden 500 µl *Capture Buffer* aufgetragen. Die DNA-Lösung (bis 100 µl) wird in diesen Puffer transferiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren schließt sich eine Zentrifugation für 30 s bei 10 000 bis 16 000 x g an. Zur DNA-Reinigung aus Agarose-Gelbanden wird ein Maximalgewicht DNA-haltiger Agarose von 300 mg pro Säule eingesetzt. Nach dem Auswiegen eines 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßes wird die Agarose/DNA auf 10 mg genau im Gefäß gesammelt (Zerlegung des Agaroseblocks in kleinere Fragmente). Für jede 10 mg erfolgt die Zugabe von 10 µl *Capture Buffer* (max. 300 mg Agarose/DNA + 300 µl *Capture Buffer*). Nach kräftigem Mischen wird der Ansatz zur Auflösung der Agarose bei 60°C für 5 bis 15 min inkubiert. Der gesamte Ansatz (max. 600 µl) wird auf eine GFX-Säule, plaziert in einem *collection tube*, transferiert. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wird für 30 s bei 10 000 bis 16 000 x g zentrifugiert. Der gesammelte Durchfluß der jeweiligen Präparation wird aus dem *collection tube* entfernt. Auf die Säule im *collection tube* werden nun 500 µl Waschpuffer appliziert. Nach 30 s Zentrifugation bei 10 000 bis 16 000 x g wird die Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß plaziert. Direkt auf die Oberseite der Glasfasermatrix der Säule werden 50 µl Elutionspuffer (Tris/HCl pH 8,0, 1 x TE pH 8,0 oder steriles aqua bidest) verbracht. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur erfolgt die Elution der gereinigten DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10 000 bis 16 000 x g.

Alternativ erfolgt die Reinigung von PCR-DNA oder DNA in Gelbanden an Silica-Material in ähnlicher Weise mit dem Promega Wizard Purification Kit (Spritzenaufsatz) oder über GLASSMILK® (Fa. BIO 101, Inc., La Jolla, USA) gemäß den Herstelleranweisungen.

3.2.2.2 Ethanolpräzipitation und Isopropanolpräzipitation

Zur Reinigung und Anreicherung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten aus wäßrigen Lösungen werden zum Ansatz 1/20 vol. 5 M NaCl und 2,5 vol. technisches Ethanol zugesetzt. Nach Inkubation bei -20°C oder Raumtemperatur für mindestens 10 min (Temperatur und Dauer abhängig von Größe der DNA-Moleküle und von der zu erzielenden Ausbeute) wird bei 4°C und 10 000 x g bis 20 000 x g für 10 bis 15 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 4°C, 5 min, 10 000 x g bis 20 000 x g) und nach dem Lufttrocknen in aqua bidest aufgenommen.

Um das Volumen des Fällungsansatzes gering zu halten, empfiehlt sich statt der Verwendung von Ethanol Isopropanol. Dazu werden der wäßrigen DNA-Lösung 0,5 bis 1 vol. Isopropanol zugesetzt. Die Inkubation erfolgt bei -20°C bis Raumtemperatur für mindestens 10 min. Nach der Fällung wird die DNA mittels Zentrifugation (bei 4°C und $10\,000 \times g$ bis $20\,000 \times g$ für 10 bis 15 min) sedimentiert. Das Waschen erfolgt in 80 % (v/v) Ethanol, zentrifugiert wird bei 4°C , 5 min und $10\,000 \times g$ bis $20\,000 \times g$. Die luftgetrocknete DNA wird in aqua bidest aufgenommen. Nachteilig an der Isopropanolfällung kann sich das leichter mitgefällte NaCl erweisen. Außerdem ist auf sorgfältiges Auswaschen des Isopropanols zu achten, da Isopropanol schwerer flüchtig ist als Ethanol.

3.2.2.3 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient vorrangig der Abtrennung von Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen. Zum Ausgangsvolumen wird im Verhältnis 1:1 ein Gemisch von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt. Dem Vortexen folgt eine Zentrifugation für 5 min bei $20\,000 \times g$. Die wäßrige (obere) Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Nach kräftigem Vortexen wird für 5 min bei $20\,000 \times g$ zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird abgenommen. Sie enthält die gelösten Nukleinsäuren, die beispielsweise durch Ethanolpräzipitation gewonnen werden können. Dabei wird die Inkubation des Fällungsansatzes bei -20°C zur Erhöhung der Ausbeute empfohlen.

3.2.3 PCR und Sequenzierung

3.2.3.1 PCR

Die Generierung und Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten erfolgt durch Einsatz der *polymerase chain reaction* mit spezifischen Primerpaaren (siehe Kapitel 3.1.3.2). In Abhängigkeit von Länge und Verwendungszweck des zu amplifizierenden DNA-Fragments (Klonierung von kodierenden Sequenzen oder analytischer Nachweis definierter DNA-Bereiche) finden verschiedene DNA-Polymerasen Verwendung: Taq (Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe; Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Roth), Native Pfu-Polymerase (Fa. Stratagene, Heidelberg), BIOTAQTM, ACCUZYMETM und IMMOLASETM (Fa. Bionline, Luckenwalde). Diese DNA-Polymerasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Genauigkeit (*proof reading activity*), ihrer Thermostabilität und in Bezug auf die Fähigkeit zur Amplifikation von Bereichen mit ausgeprägter Sekundärstruktur. Die PCR-Ansätze werden unter Verwendung enzymespezifischer Puffer in Anlehnung an ein Standardprotokoll erstellt und nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers zur Optimierung der PCR-Reaktion modifiziert. Für Nachweisreaktionen können die Volumina der Reaktionsansätze auf ein Endvolumen von $25 \mu\text{l}$ oder $12,5 \mu\text{l}$ angepasst werden.

Standard-PCR-Protokoll:

Komponente	Volumen	f.c.
10 x Puffer (-MgCl ₂)	5 μ l	1 x
dNTP 10 mM	1 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ 50 mM	2 μ l	2 mM
<i>upstream</i> Primer 25 μ M	0,6–2 μ l	0,3–1 μ M
<i>downstream</i> Primer 25 μ M	0,6–2 μ l	0,3–1 μ M
<i>template</i> DNA	x μ l	50 pg–0,75 μ g
DNA-Polymerase 5 U/ μ l	0,5 μ l	2,5 U
aqua bidest	ad 50 μ l	

Thermocycler-Programm:

1 x	Schritt 1 (fakultativ)	94°C	2 min
25–35 x	Schritt 2	94°C	30 s
	Schritt 3	primerabhängig *	30 s–1 min
	Schritt 4	72°C (Polymerase-abhängig)	1 min pro kb**
1 x	Schritt 5 (fakultativ)	72°C (Polymerase-abhängig)	5 min–7 min
1 x	Schritt 6	4°C	24 h

*: Schmelztemperatur des Primers vermindert um 4–8°C

** : fakultativ + 5 s dt (Zeitinkrement) pro Zyklus

3.2.3.2 Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA erfolgen mit Cy5-fluoreszenzmarkierten Primern (siehe Abschnitt 3.1.3.2) in Verbindung mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der Kettenabbruch-Methode nach SANGER *et al.*, 1977. Dazu werden für jede DNA-Sequenz PCR-Reaktionen nach folgendem Schema erstellt:

1 Sequenzieransatz	1 μ g DNA
á 4 Reaktionen:	2 μ l 10 x Reaktionspuffer (Kit)
	2 μ l Primer 2,5 pmol/ μ l (5–10 pmol)
	2 μ l Thermosequenase (DNA-Polymerase)
	ad 17 μ l aqua bidest

In vier PCR-Gefäße, die nach Basen markiert sind und je 4 μ l des basenspezifischen (G, A, T, C) ddNTP-Terminationsmixes enthalten, werden je 4 μ l des Sequenzieransatzes überführt. Das Cycling Programm setzt sich wie folgt zusammen:

Denaturierung der Proben	95°C	5 min
40–60 x	95°C	30 s
	56°C (55–60°C)	30 s
	72°C	90 s
1 x	72°C	5 min – 10 min
1 x	4°C	24 h

Nach Beendigung der DNA-Amplifikation werden jedem Reaktionsansatz 4 μ l Stopplösung (5 mg/ml Dextranblau in 100 % (v/v) deionisiertem Formamid) zugesetzt. Die Sequenzierreaktionen sind bis zur Ladung des Sequenziergels bei -20°C für maximal 1 Woche lagerbar.

Die Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgt halbautomatisch mit dem Sequenziergerät ALFexpress-Sequencer (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung von Acrylamidgelen beziehungsweise *Long Ranger*-Gelen. Die Gellösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Acrylamidlösung: 7 M Harnstoff, 6 % (w/v) Acrylamid (19:1 AA zu Bis-AA), 54 mM Tris, 54 mM Borsäure, 1,2 mM EDTA pH 8, 0,035 % (w/v) APS und 0,088 % (v/v) TEMED;

Long Ranger-Gellösung: kommerziell erhältliche Lösung gemäß den Herstelleranweisungen.

Die 0,45 μ m steril filtrierten Lösungen werden entgast und mit TEMED sowie APS versetzt. Die Polymerisation erfolgt bei Raumtemperatur für 2–3 h zwischen den Thermo- glasplatten des Sequencer. Die Elektrophorese erfolgt für 420 Minuten bei 1500 V, 38 mA und 34 W und 50°C in Elektrodenpuffer (54 mM Tris, 54 mM Borsäure, 1,2 mM EDTA pH 8). Vor Ladung von 4 μ l jeder Sequenzierreaktion wird die DNA der Proben durch Denaturierung für 2–3 min bei 80–90°C in Einzelstrangform überführt.

3.2.4 Modifikation von DNA

3.2.4.1 DNA-Restriktion

Für die Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen werden Restriktionsansätze nach dem unten angegebenen Schema erstellt. Die Ansätze werden zur vollständigen Restriktion ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zu beachten ist, daß verschiedene Restriktionsenzyme ein davon abweichendes Temperaturoptimum besitzen. Für präparative Zwecke wird das Ansatzvolumen unter Beibehaltung der molaren Verhältnisse der Komponenten zueinander vergrößert. Eine verlängerte Inkubation des Ansatzes zur vollständigen Restriktion kann dabei die Reduktion der Endonukleasemenge kompensieren.

Volumen	Komponenten
$x \mu\text{l}$	DNA
$1 \mu\text{l}$	10 x TA-Puffer*
$1 \mu\text{l}$	RNase A (0,1 mg/ml)
$0,5 \mu\text{l}$	Restriktionsenzym (2,5 U bis 5 U)
$y \mu\text{l}$	aqua bidest ad $10 \mu\text{l}$

*330 mM Tris/Acetat pH 7,8, 660 mM KAc, 100 mM MgAc, 25 mM DTT, 1 mg/ml BSA

Für die Generierung von Klonierungsfragmenten, die intern weitere der Erkennungssequenzen für die Klonierungsrestriktion tragen, wird Partialrestriktion vorgenommen. Dazu erfolgt die Erstellung eines präparativen Restriktionsansatzes mit verminderter Konzentration an Restriktionsendonuklease. Die Veränderung der Menge an partiell und vollständig geschnittenen DNA-Fragmenten wird in regelmäßigem Zeitabstand durch Agarosegelelektrophorese von $5 \mu\text{l}$ -Aliquots des Ansatzes überprüft. Ist das Verhältnis der DNA-Fragmente von unverdaut zu partiell und vollständig verdaut verlagert, wird die Fraktion partiell verdauter DNA durch Gelelektrophorese abgetrennt und gereinigt.

3.2.4.2 Dephosphorylierung von Vektorenden

Für Klonierungen über eine singuläre Restriktionsschnittstelle werden die Enden des Vektors zur Vermeidung der Vektorreligation ohne Insert dephosphoryliert. Nach Abschluß der Inkubation des Restriktionsansatzes wird die DNA mit Ethanol gefällt (Prozedur siehe 3.2.2.2). Das Pellet wird in $44 \mu\text{l}$ TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von $5 \mu\text{l}$ Dephosphorylierungspuffer und $1 \mu\text{l}$ (1 U) Alkalische Phosphatase wird der Ansatz bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Zugabe von $0,5 \mu\text{l}$ 0,5 M EDTA pH 8 stoppt die Reaktion. Der gesamte Ansatz wird anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert. Die DNA wird durch zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 3.2.2.3) mit anschließender Ethanol-fällung wiedergewonnen.

3.2.4.3 DNA-Ligation

Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert unterscheidet sich bei dem Einsatz von *sticky-* und *blunt-end*-Fragmenten. Bei *sticky-end*-Ligation beträgt es 2 - 3 : 1 (Insert : Vektor), bei *blunt*-Ligation bis zu 50 : 1. Ein Ligationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

Volumen	Komponenten
$x \mu\text{l}$	Vektor-DNA
$y \mu\text{l}$	Insert-DNA
$1 \mu\text{l}$	10 x Ligase-Puffer
$0,5 \mu\text{l}$	Ligase (0,5 U bis 1 U)
$z \mu\text{l}$	aqua bidest ad $10 \mu\text{l}$

Das Ansatzvolumen kann unter Beibehaltung der molaren Verhältnisse der Komponenten zueinander variiert werden. Das Volumen der zugesetzten Ligase sollte so gering wie möglich gehalten werden, da das zur Lagerung enthaltene Glycerin die Reaktion beeinträchtigt. Nach dem Mischen wird der Ansatz bei 14°C (bei *blunt*-Ligation höher) über Nacht oder bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert.

3.2.5 Gentechnische Veränderung von Organismen: *E. coli*

Proteinkodierende Sequenzen werden zur Amplifikation und Expression in Vektoren eingebunden. Die Amplifikation dieser Plasmide erfolgt durch Einbringung (Transformation) in *Escherichia coli* und Nutzung der bakteriellen Replikationsmaschinerie. Die Einbringung von Plasmid-DNA in die Bakterien ist nur möglich, wenn diese transformationskompetent sind. Die Überführung in diesen Zustand erfolgt auf Basis von Rubidiumchlorid. Aus einer Vorkultur werden 50–200 ml Kultur in LB-Medium in einem großvolumigen Behälter (Volumenverhältnis 1:10–1:30) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3–0,6 inkubiert. Nach Inkubation auf Eis für 1 h (für Stamm XL-1 Blue MRF') in Zentrifugenröhrchen (steril) werden die Zellen bei 750–1000 x g und 4°C für 15 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden vorsichtig in 1/3 des Ausgangsvolumens RF1-Lösung (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure, steril) resuspendiert. Im Anschluß an die erneute Pelletierung (750–1000 x g und 4°C für 15 min) erfolgt die Aufnahme der Zellen in 1/12,5 des Ausgangsvolumens RF2-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH 6,8 mit NaOH, steril) mit Inkubation auf Eis für 15 min. Unmittelbar anschließend werden die Zellen auf Eis aliquottiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots sind bei -80°C lagerbar.

Kompetente Zellen des zu transformierenden *E. coli*-Stammes werden 15 min auf Eis aufgetaut. Jedes 200 µl-Aliquot wird mit Ligationsprodukt versetzt. Nach vorsichtigem Mischen (nicht vortexen) wird der gesamte Ansatz 45 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt für 3 min bei 37–42°C, gefolgt vom Abkühlen auf Raumtemperatur für maximal 10 min und dem Zusatz von 200 µl LB-Medium. Die Inkubation erfolgt bei 37°C unter leichtem Schütteln für 60–90 min. Die Zellen werden nun mit dem Trigalski-Spatel auf Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei ausreichend Transformationsmaterial (z.B. bei Retransformation isolierter Plasmide zur Amplifikation) kann die Transformationsprozedur verkürzt werden. Dazu werden 200 µl kompetente Zellen zum Ansatz gegeben. Das ausplattierte Gemisch wird bei 37°C inkubiert.

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

Antigenexpression

Aus 20 ml einer Vorkultur von M15[pREP4] mit Expressionsvektor in LB-Amp (100 µg/ml)/Kan (25 µg/ml) wird eine 1 l-Kultur angeimpft. Die Kultur wächst bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6

bei 37°C. Von der Kultur wird 1 ml zur Analyse als uninduzierte Kontrolle abgenommen, bei 20 800 x g für 1 min pellettiert und bei -80°C gelagert. Die Proteine werden mit 50 µl 1 x SDS-Extraktionspuffer solubilisiert. In der verbliebenen Kultur wird mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) die Expression der expressionsvektorkodierten Sequenzen induziert (Expressionsvektoren: pQE30, pQE40; siehe auch: The QIAexpressionist). Die Proteinexpression erfolgt während des weiteren Wachstums der Kultur bei 37°C für 4–5 h. Der Kultur wird anschließend ein weiteres Aliquot (1 ml) als induzierte Kontrolle zur Analyse entnommen und wie die erste Probe prozessiert. Die Bakterien der restlichen Kultur werden bei 4000 x g für 10–15 min pellettiert. Das Pellet ist bei -80°C lagerbar. Zur Aufreinigung des Expressionsproduktes wird das Bakterienpellet in 16 ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris/HCl pH 8) vollständig resuspendiert und aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 8000 x g und Raumtemperatur werden 50 µl Proteinüberstand bei -80°C zur Analyse gelagert (Lysat, unaufgereinigte Kontrolle). Der verbliebene Überstand wird mit 4 ml Nickel-Agarose (Ni-NTA, Fa. Qiagen, Hilden) versetzt und 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird 10 min bei 3000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Von dem Überstand werden 100 µl als *flow through*-Kontrolle bei -80°C gelagert. Davon werden 10 µl auf einer SDS-PAGE überprüft. Das Nickel-Agarose-gebundene Expressionsprodukt wird nach folgendem Schema gewaschen: 2 x 8 ml Puffer B, 2 x 8 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris/HCl pH 6,3) sowie 1 x 4 ml Puffer C mit 25 mM Imidazol, Zentrifugation jeweils 10 min bei 3000 x g und Raumtemperatur. Die Elution des gereinigten Expressionsproduktes erfolgt mit 3 ml Puffer C mit 250 mM Imidazol für 15 min bei Raumtemperatur unter Drehung. Die Nickelagarose wird durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, Raumtemperatur) separiert. Von einem 50 µl-Aliquot aufgereinigter Proteinlösung (Lagerung: -80°C) werden 10 µl aufgereinigtes Protein mittels SDS-PAGE analysiert sowie 5 und 10 µl zur Proteingehaltsbestimmung eingesetzt. Die gereinigte Proteinlösung ist bis zur Dialyse bei -80°C lagerbar. Zur Immunisierung von Kaninchen (siehe Abschnitt 3.6.8) eingesetztes Expressionsprodukt (Antigen) wird vor der Verwendung zur Immunisierung dialysiert. Dazu werden vorbereitete Dialyseschläuche (siehe unten) mit aqua bidest gespült, die Proteinlösung luftblasenfrei eingefüllt und die Schläuche mit Dialyseklammern verschlossen. Die Dialyse erfolgt über Nacht unter Rühren in 4 l Dialysepuffer (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7,22). Das dialysierte Protein (für eine komplette Immunisierung ca. 1 mg benötigt) wird bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Vorbereitung von Dialyseschläuchen wird wie folgt vorgenommen:

Schläuche zuschneiden	10–20 cm	
Schläuche kochen	10 min	großes Volumen 2% (w/v) NaHCO ₃ 1 mM EDTA pH 8,0
Schläuche spülen		aqua bidest steril
Schläuche kochen	10 min	1 mM EDTA pH 8,0
Lagerung bei 4°C		bedeckt in EDTA-Lösung
vor Gebrauch Schläuche spülen		aqua bidest steril.

3.3 Rekombinante Expression in eukaryotischer Zellkultur: S2-Zellen

3.3.1 S2-Zell-Kultivierung

Die Kultivierung der in Suspension wachsenden S2-Zellen erfolgt in flachen Einweggefäßen (25 cm², 75 cm², 6- und 12-well-Platten, 90 mm-Schalen). Die Zellen werden in den unter 3.1.5.2 angegebenen Medien mit einer Dichte zwischen 1×10^6 und 2×10^7 Zellen/ml bei 24°C kultiviert, wobei die minimale Zelldichte $0,5 \times 10^6$ beträgt. Ab 5×10^6 Zellen/ml Kultur beginnen S2-Zellen in serumhaltigem Medium zu verklumpen, wodurch die optimale Kultivierung nicht länger gegeben ist. Ein erhöhter CO₂-Partialdruck ist zur Kultivierung der Zellen nicht notwendig. S2-Zellen werden durch Zentrifugation für 2-3 min bei 1000 x g gesammelt, der Überstand dekantiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Zur langfristigen Lagerung können von S2-Zellen gefrorene Zellstöcke angelegt werden. Zuerst wird von der Zellsuspension einer Kultur hoher Dichte ($1,0 - 2,0 \times 10^7$ Zellen/ml) mittels Hämacytometer die exakte Zelldichte ermittelt (hohe Viabilität erforderlich). Die Zellen werden bei 1000 x g für 2–3 min bei 4°C pellettiert. Der Überstand wird als Teil des Einfriermediums aufbewahrt. Das Zellpellet wird in 1 x PBS resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (siehe oben). Die Zellen werden in einer Dichte von $1,1 \times 10^7$ Zellen/ml in Einfriermedium (siehe 3.1.5.2) resuspendiert und als 1 ml-Aliquots in vorgekühlte Kryogefäße überführt. Das Einfrieren erfolgt kontrolliert in Raten. Langfristig werden die Stöcke bei -80°C beziehungsweise in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Etablierung von Kulturen aus gefrorenen Stöcken werden Kryoröhrchen schnell bei 30°C aufgetaut. Kurz vor dem vollständigen Auftauen der Zellsuspension wird die Außenseite der Röhrchen chemisch dekontaminiert. Die Zellen werden, in 5 ml frisches Medium transferiert, für 5–16 h bei 24°C kultiviert. Sie sollten nach dem Auftauen eine Lebensfähigkeit von 60–70 % aufweisen. Durch Zentrifugation bei 1000 x g für 2–3 min wird das DMSO-haltige Medium von den Zellen separiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Kulturen werden bei 24°C weiter kultiviert, bis die Dichte zur Teilung der Kultur beziehungsweise zur Erneuerung des Mediums erreicht wird.

3.3.2 Gentechnische Veränderung eukaryotischer Zellen - transiente und stabile Transfektionen

Die Einbringung der pMT-Vektor-basierten Expressionskonstrukte in S2-Zellen erfolgt hauptsächlich durch CaPO₄-vermittelte Transfektion. Dazu wird hoch gereinigte DNA der verwendeten Plasmide eingesetzt (siehe 3.2.1).

Für jeden Transfektionsansatz werden in einer 6-well-Platte 3×10^6 Zellen in 3 ml serumhaltigem Expressionsmedium (1×10^6 Zellen/ml) ausgesät. Die Zellen werden für 6–16 h bis zu einer Dichte von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Pro Transfektion werden folgende Lösungen separat vorbereitet: Lösung A umfasst 36 µl 2 M CaCl₂, x µl rekombinante DNA

(19 μg) sowie zellkultur-steriles Wasser ad 300 μl ; Lösung B enthält 300 μl 2 x HBS (50 mM HEPES, 1,5 mM NaH_2PO_4 , 280 mM NaCl pH 7,1). Unter ständigem Mischen wird langsam Lösung A tropfenweise zu Lösung B gegeben. Das Mischen wird weiter fortgesetzt und der Ansatz für 30–40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das nach 30 min gebildete feine Präzipitat wird durch das bläuliche Schimmern der Lösung erkennbar (Tyndall-Effekt). Anschließend wird die Präzipitatlösung unter Mischen tropfenweise den vorbereiteten Zellen zugesetzt. Nach Inkubation für 16–24 h im Inkubator wird die Calciumphosphatlösung von den S2-Zellen entfernt. Die Zellen werden zweimal mit frischem serumhaltigen Medium gewaschen. Nach zweitägigem Wachstum kann die Induktion der rekombinanten Expression in der logarithmischen Wachstumsphase vorgenommen werden. Dazu wird den transfizierten Zellen aus einer 100 mM Lösung CuSO_4 bis zu einer Endkonzentration von 500–750 μM zugesetzt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgt nach 24–96 h, i.d.R. werden die Zellen 48 h nach der Expressionsinduktion untersucht. Die Effizienz für CaPO_4 -vermittelte Transfektion beträgt gemäß den S2-Zell-Vertreiberangaben 5–15%. Die beschriebene transiente gentechnische Veränderung der S2-Zellen kann ebenso stabil erfolgen. Dazu wird neben der Plasmid-DNA für die rekombinante Expression der Zielsequenz ein weiteres Plasmid (zum Beispiel pCoHygro) co-transfiziert, das für eine Antibiotika-Resistenz (beispielsweise gegen Hygromycin B) unter einem konstitutiven Promotor kodiert. Das empfohlene Verhältnis Expressionsplasmid : Selektionsplasmid beträgt bei CaPO_4 -vermittelter Transfektion 20 : 1. Durch Zusatz des Antibiotikums zum Kulturmedium erfolgt die Anzucht der mit dem Selektionsplasmid transfizierten S2-Zellen.

3.3.3 Selektion stabil transfizierter Linien

Zur Selektion stabil transfizierter Linien werden stabile Transfektionsansätze unter Verwendung von pCoHygro erstellt (siehe 3.3.2). Zwei Tage nach Abschluß der Transfektionsprozedur (Entfernung des CaPO_4) beginnt die Selektion co-transfizierter Zellen. In einem Teil des Transfektionsansatzes wird zur Bestimmung der Transfektionseffizienz die Expression wie beschrieben induziert. Das verbleibende Aliquot wird zur Selektion eingesetzt. Durch Zugabe von 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B werden die Zellen innerhalb der Kultur angereichert, die pCoHygro enthalten. Durch die Selektion entsteht eine polyklonale Kultur, die keine untransfizierten Zellen mehr enthält. Die Wahrung des optimalen Verhältnisses von Expressions- zu Selektionsplasmid soll gewährleisten, dass die selektierte Kultur ausschließlich co-transfizierte Zellen umfaßt. Während der Selektionsprozedur ist eine Reduktion des Kulturvolumens erforderlich, um die minimal erforderliche Zelldichte für den Erhalt der Kultur nicht zu unterschreiten. Nach Abschluß der Selektionsprozedur, die mindestens vier Wochen umfaßt, erfolgt die Expansion der Kultur.

3.3.4 Proteinextraktion aus S2-Zellen

Zum Nachweis rekombinant exprimierter Proteine und somit der Charakterisierung von S2-Linien erfolgt die Proteinextraktion durch Zellyse und Solubilisierung von Membran-

proteinen mittels 1 x SDS-Probenpuffer ohne BPB und Glycerin (siehe 3.1.4). Die induzierten Zellen werden durch Zentrifugation bei 1000 x g für 2–3 min pellettiert, das Medium entfernt und die Zellen in 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Pellettierung erfolgt die Resuspension der Zellen in 1/90 vol. des Kulturvolumens im SDS-Puffer. Die DNA der Lysate wird durch eine 23-gauge-Nadel geschert. Zentrifugation der Lysate bei 20 000 x g für 10 min trennen die verbliebenen Zelltrümmer vom Lysat ab. Bis zur Analyse können die Proteinextrakte bei -80°C gelagert werden.

Der Nachweis von Proteininteraktionen ist nur in Zellextrakten möglich, die Proteine nicht vollständig denaturieren. Die Extraktion von Membranproteinen erfolgt in diesem Fall mit Triton X-100. Die gewaschenen Kulturpellets werden dazu in 1/60 vol. Tritonlysepuffer mit 1 mM PMSF resuspendiert. Die Lyse erfolgt für 10 min bei 37°C mit anschließendem Vortexen beziehungsweise für 20 min auf Eis bei instabilen Proteinen. Ungelöste Zellbestandteile werden durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g für 10 min–30 min abgetrennt. Die geklärten Lysate sind bei -80°C lagerbar.

3.4 Präparation biologischen Materials aus Köpfen von *D. melanogaster*

Die Köpfe von *D. melanogaster*-Fliegen werden mit einer Rasierklinge auf einem Kühlisch abgetrennt und auf flüssigem Stickstoff gesammelt. Für die Gewinnung von relativ reinem augenspezifischen Material können die Augenkappen mittels Rasierklinge von den abgetrennten Köpfen separiert und für die weitere Verwendung gesammelt werden. Eine Lagerung des gefrorenen Materials ist bei -80°C möglich. Für die Präparation von Membranvesikeln werden bis zu 250 Köpfe mit einem Mikro-Pistill in 100 µl Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) auf Eis homogenisiert. Die Abtrennung der Chitinreste erfolgt durch Zentrifugation bei 1000–2000 x g und 4°C für 1 min. Der Überstand wird 30 min bei 100 000 x g und 4°C zur Sedimentation der Membranen zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes, der die löslichen Proteine enthält, kann durch Resuspension der pellettierten Membranen in entsprechenden Puffern die Proteinextraktion erfolgen.

Die Gewinnung aller enthaltenen Proteine aus Köpfen und Augenkappen erfolgt durch die direkte Homogenisation des Materials in TXEP/PMSF beziehungsweise in 1 x SDS-Probenpuffer. Das Material wird dazu mit einem Mikro-Pistill im Extraktionspuffer aufgeschlossen. Die Extraktion der Proteine erfolgt für mindestens 10 min auf Eis (Tritonpuffer) beziehungsweise bei Raumtemperatur (SDS-Puffer). Anschließend werden die Proben 10 min bei 4°C und 100 000 x g (Tritonextrakte) beziehungsweise 18°C und 20 000 x g (SDS-Extrakte) zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert. Die Extrakte werden bei -80°C gelagert. Die Extraktion der Membranproteine isolierter Kopfmembranen erfolgt in analoger Weise. Nach Resuspension der Membranen in Extraktionspuffer ist jedoch eine Homogenisation nicht notwendig.

3.5 Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1 Analyse rekombinant exprimierter Fluorophore

Die Erstellung von Fusionskonstrukten aus der kodierenden Sequenz (CDS) für Fluorophore und der CDS des zu analysierenden Proteins ermöglicht den schnellen, exakteren Nachweis rekombinant exprimierter Proteine und erleichtert Lokalisationsstudien. Die Expression von EGFP und HcRed wird direkt überprüft. Für die Fluoreszenzmikroskopie werden induzierte Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension kann zur Dokumentation in Mowiol 4.88 eingebettet werden. Ebenso ist eine direkte Dokumentation lebender Zellen in einem begrenzten Zeitraum möglich. Die Analyse der Proben erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm (EGFP) und 513 nm (HcRed). EGFP emittiert Licht mit $\lambda = 507$ nm (FITC-Filter), HcRed kann mit dem TRITC-Filter analysiert werden. Wurde der Fluorophor C-terminal an das zu untersuchende Protein angefügt, belegt detektierte Fluoreszenz die Expression der gesamten Fusions-CDS. Fluoreszenzmikroskopie von (fusions-)exprimierten Fluorophoren kann, durch den Nachweis der rekombinanten Expression, auch zur Bewertung der Viabilität einer Kultur eingesetzt werden.

3.5.2 DAPI-basierte Kernfärbung

Zur Färbung chromosomaler DNA wird der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Dihydrochlorid) verwendet. Aus einer Stammlösung (0,2 mg/ml (w/v) in aqua bidest) wird eine wäßrige DAPI-Lösung der Konzentration 4 μ g/ml mit 0,01 % (v/v) TX-100 zur Permeabilisierung der Proben erstellt. Die Proben werden für 15–25 min inkubiert. Die Dokumentation der Färbung am Fluoreszenzmikroskop mittels CCD-Kamera ist umgehend möglich mit einer Anregungswellenlänge von 358 nm (Emissionsmaximum: 461 nm). Alternativ ist eine Versiegelung der Proben mit DAPI-haltigem Mowiol möglich. Dazu wird der DAPI-Farbstoff in entsprechender Konzentration dem Versiegelungsmedium zugesetzt. Nach Aushärtung des Mediums kann die Kernfärbung dokumentiert werden.

3.5.3 Immunomarkierung von S2-Zellen

Aliquots induzierter Kulturen werden vor der Verwendung für die Immuncytochemie mit 1 x PBS gewaschen, um die vom Medium ausgehende Fluoreszenz der Proben zu senken. 20–50 μ l der erstellten Zellsuspensionen in 1 x PBS werden auf einen Objektträger aufgebracht, der zuvor mit einem Tropfen 0,01 % (v/v) Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet wurde. Die Inkubation der Proben für 15 min bei Raumtemperatur ermöglicht eine Sedimentation der Zellen auf dem beschichteten Objektträger. Die Zellen werden durch Zugabe von PFA (50–100 μ l 4 % (v/v) in PBS) für 5 min fixiert. Nach Entfernung der PFA-Lösung werden die Proben dreimal für 10 min mit 100 μ l 1 x PBS gewaschen. Es folgt die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation der Proben in Blockierungslösung (0,5 % (v/v)

Fischgelatine, 1 % (w/v) Ovalbumin, 98,5 % PBS) für mindestens 30 min (100 μ l). Während dieser Inkubation erfolgt ebenfalls die Permeabilisierung der Zellen durch 0,1 % (v/v) Triton X-100 im Blockierungspuffer, um intrazelluläre fixierte Proteine für Antikörper zugänglich zu machen. Primäre Antikörper werden mit einem Verdünnungsfaktor (siehe Tabelle 3.1.7) in Blockierungslösung inkubiert. Die Antigenerkennung erfolgt bei 37°C für 1 h in einer feuchten Kammer oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluß an dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für mindestens 5 min werden die fluorophorgekoppelten sekundären Antikörper (1:100–200) in Blockierungspuffer auf die Proben aufgebracht und für 1–5 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch Waschen in PBS für dreimal 10 min entfernt. Die Objektträger werden kurz mit aqua bidest gespült. Die Einbettung der Proben für die Dokumentation erfolgt in Mowiol 4.88 (Aushärtung über Nacht). Die Präparate sind, mit Ausnahme von rekombinant exprimierten Fluorophoren, im Dunkeln bei 4°C mehrere Tage bis Wochen lagerbar.

3.5.4 Dokumentation von Fluoreszenzsignalen

Die Dokumentation von Fluoreszenzsignalen und korrespondierenden lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgt durch konfokale Laserscanning Mikroskopie (Leica TCS SP) beziehungsweise durch Aufnahme mikroskopischer Bilder mit einer CCD-Kamera (Leica DC200). Konfokale Laserscanning Mikroskopie (kLSM) ermöglicht die Darstellung dünner optischer Ebenen eines Präparates ohne Streusignale aus anderen Ebenen. Die ermittelte Intensität der Fluoreszenzsignale im Verhältnis zu Kontrollen ermöglicht die Vergleichbarkeit und Bewertung von Proben. Es können mehrere verschiedene Fluoreszenzsignale sowie ein Transmissionsbild gleichzeitig aufgenommen und die Überlagerung verschiedener Kanäle dargestellt werden. Diese Überlagerungsbilder (*overlays*) ermöglichen die Dokumentation von Co-Lokalisationen. Die detektierten Signalbilder können aus der mikroskopeigenen Software in übliche Grafikprogramme zur Bearbeitung transferiert werden (Kapitel 3.1.8). Für die Detektion von UV-basierten Fluoreszenzsignalen (DAPI-Kernfärbung) und deren Lokalisation im Vergleich zu anderen Proteinen/Zellstrukturen werden die durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie erzeugten Signale (Anregung_{DAPI}: 358 nm, Emission_{DAPI}: 461 nm) mittels CCD-Kamera dokumentiert. Die einzelnen Kanäle (Transmission, verschiedene Fluoreszenzsignale) werden separat nacheinander dokumentiert. Eine Überlagerung einzelner Kanäle ist mit kommerziellen Grafikprogrammen (Kapitel 3.1.8) möglich.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Proteingehaltsbestimmung: Bicinchoninsäure-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen wurde nach SMITH *et al.*, 1985 vorgenommen. Als Nachweisreagenz wird 1 ml Bicinchoninsäurelösung (Fa. Sigma-Aldrich, München: Na₂CO₃, NaHCO₃, Na-Tartrat und Bicinchoninsäure in 0,2 M NaOH) mit 20 μ l

4 % (w/v) CuSO_4 (Fa. Sigma-Aldrich) pro $50 \mu\text{l}$ Probenvolumen versetzt. Die Inkubationszeit der Mischung aus Probe und Nachweisreagenz bei 60°C beträgt 30 min. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Anhand einer mitzuführenden Eichreihe mit BSA als Standard kann aus den gemessenen Werten die Proteinkonzentration der untersuchten Probe errechnet werden. Diesem *Assay* liegt folgendes Prinzip zugrunde: Im alkalischen Milieu werden Cu(II) -Ionen durch Peptidbindungen zu Cu(I) -Ionen reduziert. Die Menge an Cu(I) -Ionen ist direkt proportional zur Proteinmenge. Bicinchoninsäure bildet mit Cu(I) -Ionen stabile Komplexverbindungen mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

3.6.2 SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgt in vertikalen Flachgelen (Abmessungen: $6 \text{ cm} \times 8 \text{ cm} \times 0,75 \text{ cm}$). Verwendet werden homogen konzentrierte Trenngelle mit einer totalen Acrylamidkonzentration von 8 % (w/v) beziehungsweise 12 % (w/v) in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgelpuffer: pH 6,8, Trenngelpuffer: pH 8,8, Elektrodenpuffer: pH 8,3) nach LAEMMLI, 1970. Die exakte Zusammensetzung der Tris-Glycin-Gele gibt Tabelle 3.3 wieder.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

	Trenngel 8 % T	Trenngel 12 % T	Sammelgel 6 % T
Acrylamid	8 % (w/v)	12 % (w/v)	6 % (w/v)
Bisacrylamid	0,2 % (w/v)	0,3 % (w/v)	0,15 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,8	0,375 M	0,375 M	—
pH 6,8	—	—	0,125 M
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
APS	0,05 %	0,05 %	0,1 %
TEMED	0,075 %	0,075 %	0,15 %

Die Einstellung der Acrylamid- und Bisacrylamid-Konzentration erfolgt aus kommerziell erhältlicher 40 %-Lösung (Fa. Serva, Heidelberg; Mischungsverhältnis 37,5:1). Die Länge des Sammelgels beträgt 1 cm, die Trennung erfolgt über eine Distanz von 5 cm. Bis zur vollständigen Polymerisation werden die mit H_2O oder 96 % (v/v) Ethanol überschichteten Trenngelle sowie die kompletten Gele nach Anfügen der Sammelgele bei 55°C für 15 min inkubiert. Die Elektrophorese wird in einer „2050 Midget“-Elektrophoresekammer (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei konstant 20 mA pro Gel durchgeführt. Die Zusammensetzungen von Puffern zur Ladung von Proben (1 x und 5 x SDS-Probenpuffer, 6 x Glycerin/BPB-Puffer) und zum Lauf der SDS-PAGE (Elektrodenpuffer) sind im Abschnitt 3.1.4 aufgeführt.

Für die Dokumentation von Proteinen mit geringerem Molekulargewicht erfolgte die Erstellung von Tricin-Gelen. Die Vorgehensweise sowie die verwendeten Apparaturen entsprechen den Beschreibungen für Tris-Glycin-Gele. Die homogenen Trenngele, die Sammelgele und die Elektrodenpuffer besitzen folgende Zusammensetzung:

Trenngel:	16,5 % totale Acrylamidkonzentration mit 0,87 % Bisacrylamid (40 %-Lösung, Fa. Serva, Mischungsverhältnis 19:1), 1 M Tris/HCl pH 8,45, 0,1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,125 % (w/v) APS, 0,125 % (v/v) TEMED
Sammelgel:	4 % totale Acrylamidkonzentration mit 0,21 % Bisacrylamid (40 %-Lösung, Fa. Serva, Mischungsverhältnis 19:1), 0,75 M Tris/HCl pH 8,45, 0,075 % (w/v) SDS, 0,07 % (w/v) APS, 0,07 % (v/v) TEMED
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,2
Anodenpuffer:	0,2 M Tris pH 8,9

Die Elektrophorese der vertikalen Flachgele erfolgte unter Kühlung der Gelapparatur (4°C, Kühlkreislauf) für 3 h bei 35–50 mA pro Gel.

3.6.3 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Das SDS-PAGE-Gel wird in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Serva Blue R, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) unter leichtem Schütteln für 30–60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Proteinfärbung gilt die RGT-Regel, d.h. bei 40°C erfolgt die Färbung in 15 min bis 20 min. Zur Hervorhebung der Proteinbanden wird die Gelhintergrundfärbung mit Entfärberlösung der Zusammensetzung 25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure über Nacht auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (bei 40°C 45 min) gesenkt. Während der Entfärbung wird das Wechseln der Entfärbungslösung empfohlen (Regeneration der Lösung: Adsorption des Coomassie-Farbstoffs an Aktivkohle). Für zeitverzögerte Dokumentation erfolgt die Geltrocknung auf Blotpapier (Whatman 3MM) mittels Geltrockner (Fa. Fröbel Labortechnik, Typ G2000) mit Vakuumsaugpumpe bei ca. 90°C für 1 h.

3.6.4 Silbernitratfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Nach dem Protokoll von HEUKESHOVEN AND DERNICK, 1988 wird das SDS-PAGE-Gel für 40–60 min oder über Nacht bei Raumtemperatur in Silberfärbelösung 1 (30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) leicht geschüttelt. Der 60-minütigen Inkubation (oder über Nacht) in Silberfärbelösung 2 (30 % (v/v) Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,2 % (w/v) Natrium-Thiosulfat, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd (frisch, 25 % Stammlösung)) folgt dreimaliges Waschen in aqua bidest. Anschließend wird das Gel für 30 min in Silbernitratlösung (0,1 % (w/v) AgNO₃, 0,01 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Nach zweimaligem

kurzen Spülen in H₂O wird das Gel in Silberfärbelösung 3 (2,5% (w/v) NaCO₃, 0,01% (v/v) Formaldehyd) überführt und entwickelt, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist. Die Entwicklungsreaktion wird gestoppt durch Austausch der Lösung gegen 0,05 M EDTA-Lösung (pH 8). In dieser Lösung ist auch die Aufbewahrung des Gel für längere Zeit unter Abdunklung möglich.

3.6.5 Western Blot Analysen

3.6.5.1 Elektroblothing (Semi-Dry und Tankblot)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen auf Membranen (z.B. PVDF) erfolgt durch Elektroblothing. Dabei können die Proteine sowohl im *semi-dry*-Verfahren transferiert werden als auch mittels Tankblothing.

semi-dry:

Das SDS-PAGE-Gel wird ebenso wie die PVDF-Blotmembran in *semi-dry*-Blotpuffer (50 mM Tris-Base, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol (frisch)) für 10 min äquilibriert. Um die hydrophobe Oberfläche der Blotmembran benetzbar zu machen wird die Membran zuvor kurz in Methanol getaucht. Die Elektroden der Blotapparatur werden zur Herstellung der Leitfähigkeit mit aqua bidest benetzt. Anschließend erfolgt der Zusammenbau des Blots luftblasenfrei in der gegebenen Reihenfolge: 3 Whatman-Papiere (3 MM, Blotpapier) getränkt mit Blotpuffer, PVDF-Membran, Gel (Markierung der Taschen und Gelorientierung), gegebenenfalls Parafilmstreifen zur Abdeckung der Ränder sowie weitere 3 Blotpuffer-getränkte Whatman-Papiere als Pufferreservoir für die Blotprozedur. Das Elektroblothing erfolgt für 1 h bei 0,8-1 mA pro cm² Gelfläche.

tankblothing:

Das Tankblotten wird äquivalent zum *semi-dry*-Blotten mit folgenden Änderungen vorgenommen: Der Blotpuffer setzt sich aus 192 mM Glycin, 20 mM Tris-Base, 0,01% (w/v) SDS sowie 20% (v/v) Methanol zusammen. Dem Zusammenbau des beidseitig von zwei Schwämmen umgebenen Blots in den Halterungen der Tankblotapparatur folgt die Füllung des Tanks mit Blotpuffer. Zusätzlich wird ein Kühlaggregat in die Apparatur eingesetzt. Das Blotten erfolgt unter Rühren des Blotpuffers für 1 h bei 80 V.

Zur Aufbewahrung kann die Blotmembran nach dem Blotvorgang luftgetrocknet bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert werden.

3.6.5.2 Immunologische Detektion und Visualisierung membrangebundener Proteine

Die Benetzbarkeit getrockneter Blotmembranen wird durch Inkubation in Methanol wieder hergestellt. Im Anschluß erfolgt die Äquilibrierung in TBS-T (50 mM Tris/HCl pH 7,3, 50 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20) für 10 min unter Schütteln. Zur Blockierung unspezi-

fischer Bindungsstellen folgt die Inkubation in Blockierungslösung (5 % (w/v) Skim milk in TBS-T) für mindestens 1 h oder über Nacht. Der primäre Antikörper wird in TBS-T verdünnt (i.d.R. 1:1000, Abweichungen siehe 3.1.7) und die Blotmembran über Nacht unter leichtem Drehen oder Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 10 min folgt für die Verstärkung der Visualisierung die Detektion des primären Antikörpers durch entweder sekundären Antikörper gegen IgG (bei monoklonalen primären Antikörpern) oder Protein A (IgG-Erkennung bei polyklonalen primären Antikörpern). Für die Nachweisreaktion ist Alkalische Phosphatase (AP) an den sekundären Antikörper/Protein A gekoppelt. Der Einsatz von Protein A-AP erfolgt 1:1000 einer Stammlösung von 325 U/ml, für α -IgG-AP (IgG_{Maus}-AP, Fa. Sigma-Aldrich) 1:25 000. Die Inkubationszeit der Blotmembran im sekundären Nachweisreagenz beträgt 1 h. Dem dreimaligen Waschen mit TBS-T folgt das Schwenken der Membran für mindestens 2 min in Äquilibriumspuffer (Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Nachweisreaktion). Die Visualisierung der detektierten Proteinbanden erfolgt über eine Farbreaktion (mit NBT/BCIP-Substrat) oder alternativ mittels Chemolumineszenz (CDP-Star™).

NBT/BCIP-Nachweis:

Der Farbnachweis wird im Dunkeln ohne Schütteln in Äquilibriumspuffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) supplementiert mit 0,03 % (w/v) NBT und 0,015 % (w/v) BCIP (X-Phosphat) vorgenommen, bis eine blau-violette Färbung erscheint. Dieser Vorgang dauert einige Minuten. In Ausnahmefällen erfolgt die Inkubation der Membran für mehrere Stunden in der Entwicklungslösung. Die Reaktion wird durch Spülen der Membran mit Wasser gestoppt und die Membran getrocknet.

CDP-Star-Nachweis:

Die Blotmembran inkubiert für 5 min in 1 % (v/v) CDP-STAR™-haltigem Äquilibriumspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl). Die Membran wird in Folie eingeschweißt und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert (Substratumsatz durch AP). Durch Auflegen von Röntgenfilmen kann die Chemolumineszenz spezifisch detektierter Proteinbanden visualisiert werden.

3.6.5.3 Amidoschwarzfärbung von PVDF-Blotmembranen

Das Anfärben von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgt mit Amidoschwarz-Färbelösung (0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Die Membran wird zur Herstellung der Benetzbarkeit kurz in Methanol getaucht und anschließend in die Färbelösung überführt. Nach kurzer Inkubation wird der proteinfreie Membranhintergrund mit Entfärberlösung (Zusammensetzung siehe Coomassiefärbung) entfärbt.

3.6.6 Proteinanreicherung und Proteinaufreinigung

Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation Triton X-100- und PBS-extrahierter Proteine werden spezifische monoklonale Antikörper aus Maus an Protein A/G-Agarose (Fa. Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) und polyklonale Antikörper aus Kaninchen an Protein A-Agarose (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) als Matrix gekoppelt. Die Menge an gekoppeltem Antikörper variiert in Abhängigkeit vom Proteinextrakt, vom verwendeten Antikörper und von der eingesetzten Menge an Matrix. Abweichungen von den zwei im folgenden beschriebenen Standardprotokollen sind an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

In einzelnen Immunpräzipitationsexperimenten nach der unter 3.6.6.2 beschriebenen Methode mit monoklonalen Antikörpern können zur Erhöhung der Ausbeute aus dem ungebundenen Proteinüberstand die noch enthaltenen Immunkomplexe aus Antigen und Antikörper erneut mit Protein A/G-Agarose präzipitiert werden.

IMAC (immobilisierte Metallaffinitätschromatografie)

Die Anreicherung und Separation von spezifischen Proteinen aus Proteingemischen durch IMAC basiert auf der Fähigkeit von Hexahistidinresten Ni^{2+} und Co^{2+} zu chelatieren. Durch fusionierte Expression von Proteinen mit einer Hexahistidinsequenz können die Proteine über diese Chelatbildung an Ni^{2+} - oder Co^{2+} -gebundene Agarose an der Matrix immobilisiert und damit sowohl separiert als auch angereichert werden. Für IMAC können Urea-, Triton X-100- und PBS-Extrakte eingesetzt werden. Die Aufreinigungen unterscheiden sich hinsichtlich der Ausbeute.

3.6.6.1 Immunpräzipitation aus Drosophila-Kopf- oder Augenkapp-Extrakten

Für eine Immunpräzipitation aus Proteinextrakten gewonnen aus 50–100 Köpfen beziehungsweise Augenkappen werden zwischen 3 und 4 μg polyklonaler Antikörper (Abhängigkeit von Antikörperqualität) an 10–25 μl Protein A-Agarose gekoppelt. Bei monoklonalen Antikörpern werden 0,5–4 μg an 20–80 μl Protein A/G-Agarose-Matrix verankert. Dazu wird die Matrix viermal mit 500 μl TXWP gewaschen. Die Matrix wird durch Zentrifugation für 1 min bei 4°C und 20 800 x g abgetrennt. Die Überstände können mit 1 ml-Spritzen und Kanülen (0,45 mm x 25 mm) abgezogen werden. Die Inkubationzeit der Matrix mit Antikörper (affinitätsgereinigt, siehe 3.6.9) beträgt 1 h bei 4°C unter Schütteln. Das Volumen des Ansatzes wird mit TXWP auf 200–500 μl erhöht. Nach Entfernung der Antikörperlösung durch Zentrifugation wird die antikörpergekoppelte Matrix viermal mit 500 μl TXWP gewaschen. Die Inkubation des Proteinextrakts mit den matrixgekoppelten Antikörpern erfolgt für 60 min–90 min bei 4°C unter Schütteln. Nach Zentrifugation wird der Extraktüberstand abgetrennt. Die Immunpräzipitate werden viermal mit TXWP gewaschen. Die Extraktion von der Matrix erfolgt durch Zugabe von 15 μl 1 x SDS-Probenpuffer und Inkubation für 10 min bei 80°C. Die Matrix wird durch Zentrifugation abgetrennt.

Das erhaltene Proteingemisch kann mittels SDS-PAGE separiert werden.

3.6.6.2 Immunpräzipitation aus S2-Zellextrakten

Die Immunpräzipitation aus S2-Zellextrakten erfolgt in Bezug auf die verwendeten Massen an Antikörper und Matrix in Anlehnung an Protokoll 3.6.6.1. Pro Ansatz werden 100–200 μl S2-Zellysate (Lysefaktor 1/60 Kulturvolumen, TX-100- oder PBS-Extrakte) verwendet. Abweichend von oben angegebenem Protokoll werden die Extrakte zuerst mit Antikörpern für 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Gewinnung der gebildeten Immunpräzipitate erfolgt durch Supplementation mit der Matrix (Protein A- oder Protein A/G-Agarose), Inkubation für 1 h bei 4°C unter Schütteln, mindestens viermal Waschen mit TXWP und Extraktion mit 15 μl 1xSDS-Probenpuffer unter Inkubation für 10 min bei 80°C.

3.6.6.3 IMAC-Aufreinigung aus S2-Extrakten

Von einer S2-Linie, die stabil mit einem Hexahistidin-Fusionskonstrukt transfiziert wurde, werden Zellen im logarithmischen Wachstum angezogen. Nach Induktion der Expression des kodierten Fusionsproteins und ausreichender Kultivierung zur Akkumulation von Expressionsprodukt in den Zellen werden 20 ml Kultur bei 1000 x g pelletiert. Das Pellet wird in PMSF-haltigem 1xPBS aufgenommen und die Zellen werden durch Ultraschall aufgeschlossen (auf Eis: 6 x 10 s 70 W). Membranen und Zelltrümmer werden aus der löslichen Zellfraktion durch Zentrifugation für 4 min bei 4°C und 20 800 x g abgetrennt. Die Membranproteine des Pellets werden für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 ml Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100) extrahiert und das Lysat mittels Zentrifugation (siehe oben) von Zellfragmenten geklärt. Jeder der beiden gewonnenen Überstände wird mit 330 μl Ni-NTA für zwei Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 3000 x g) separierte Nickelagarose zweimal mit 660 μl PBS/PMSF gewaschen. Die Abreicherung von relativ unspezifisch an die Ni-NTA gebundenem Material erfolgt durch Waschen mit 750 μl PBS/PMSF/0,1 M Imidazol. Die Agarose wird durch Zentrifugation wiedergewonnen: 1 min, 4°C, 20 800 x g. Die Elution der Hexahistidin-Fusionsproteine von der von ihnen chelatierten Nickelagarose erfolgt durch zunehmende Verdrängung in drei Schritten: i) 750 μl PBS/PMSF/0,25 M Imidazol, ii) 750 μl PBS/PMSF/0,5 M Imidazol sowie iii) 740 μl PBS/PMSF/0,1 M EDTA. Die Ni-NTA wird jeweils separiert bei 20 800 x g und 4°C für 1 min. Die Proteinlösungen können bei -80°C gelagert werden.

3.6.7 Proteinfragmentierung für massenspektrometrische Analysen

Die kontrollierte Fragmentierung von Proteinen mit Endoproteinasen für massenspektrometrische Analysen wird nach dem folgenden Standardprotokoll vorgenommen. Nach

Exzision der gewünschten Proteinbanden aus Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen werden die Gelstücke in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten. Zur Entfärbung erfolgt das Waschen dieser Stücke in 15 μl 10 mM NH_4HCO_3 (Puffer): dem Vortexen folgen 10 min Inkubation der Probe mit anschließender Abnahme des Überstandes. Die Gelfragmente werden nachfolgend für 10 min mit 15 μl 50 % Acetonitril in 5 mM Puffer inkubiert. Zur Reduktion der Proteinsulphydrylgruppen werden die Proben mit 10 mM DTT in Puffer versetzt und die Reaktion für 15 min bei 60°C ermöglicht. Zur irreversiblen Blockierung der Sulphydrylgruppen wird die DTT-Lösung entfernt und die Gelstücke mit 55 mM Iodacetamid (IA) bei Raumtemperatur für 15 min behandelt. Dabei kommt es zur Modifikation der freien Cys-Gruppen zu Cys-CAM (CAM: Carbamidomethylgruppe). Abwechselnd werden die Gelstücke dreimal je 10 min in 15 μl Puffer beziehungsweise in 15 μl 5 mM Puffer/50 % Acetonitril gewaschen. Die Trocknung erfolgt in einer *speed vac* für 30 min. Die Trypsinierung erfolgt durch Zugabe von 2 μl Trypsinlösung (1:3-Verdünnung mit Puffer einer 100 ng/ μl Trypsinstammlösung) zu den getrockneten Gelstücken. Die Proben werden für 4–16 h bei 20–37°C verdaut. Die Zugabe von 5 μl 0,1 % TFA stoppt die Reaktion. Optional wird die Probe im Ultraschallbad behandelt. Vor der Verwendung erfolgen mindestens 10 min Inkubation zur Diffusion der Probe aus den Gelstücken. Die Proteinlösung kann nun auf dem Probenträger mit Matrix co-kristallisiert werden. Dazu erfolgt die Mischung von 0,5 μl Probe mit dem gleichen Volumen an Matrix. Bei Verwendung von chromatografischem Material zur weiteren Reinigung der Peptide ist ebenso eine direkte Elution der Proben mit Matrix möglich. Die Matrix wird wie folgt erstellt: Eine Spatelspitze pulverförmiger Matrixsubstanz (i.d.R. 4-OH- α -cyano-Zimtsäure, Fa. Sigma-Aldrich, München) wird mit ca. 100 μl TA-Lösung (0,1 % TFA und Acetonitril 70:30) überschichtet. Nach dem Vortexen inkubiert diese Mischung, bis sich ein Teil der Matrix gelöst hat. Der Überstand aus der sich anschließenden kurzen Zentrifugation wird als Matrix zur Co-Kristallisation eingesetzt. Die Kristallisation auf dem Probenträger erfolgt an der Luft und ist nach 5–10 min abgeschlossen.

3.6.8 Immunisierung von Kaninchen

Zur Produktion von polyklonalem Antiserum wird ein Kaninchen mit rekombinant exprimiertem Antigen immunisiert. Die Immunisierung wird nach folgendem Schema vorgenommen: das Antigen wird in einer Konzentration von 0,25 mg/ml in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2) gelöst und für die Immunisierungen im jeweiligen Adjuvans (5–10 min bei 37–45°C im Wasserbad vorinkubiert) durch 5-minütige Mischung emulgiert. Die ersten beiden Immunisierungen erfolgen mit komplettem Adjuvans (ABM-ZK) im Abstand von 14 Tagen, die letzten beiden am Tag 28 und 56 mit unvollständigem Adjuvans (ABM-N, beide Fa. Linaris, Bettingen). Pro Immunisierung wird 1 ml Antigen/Adjuvans-Emulsion am Rücken *subcutan* mit einer Kanüle 0,55 x 25 mm in ca. drei Portionen injiziert. Die Testblutungen zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs werden nach 38 beziehungsweise 66 Tagen an der Ohrvene vorgenommen. Mittels Western Blot Analyse kann das Serum charakterisiert werden. Am 80. Tag nach der er-

sten Immunisierung wird das Kaninchen zur Gewinnung des Antiserums ausgeblutet. Im Anschluß an die Betäubung mit Ketamin (Ketavet®, Fa. Parke-Davis GmbH, Freiburg) erfolgt die Blutentnahme durch Herzpunktion. Das Immunsrum wird nach Gerinnung (15 min, 37°C) und Kontraktion des Koagulats (bei 4°C über Nacht) mittels wiederholter Zentrifugation (15 min, 3000 x g, 4°C) gewonnen.

3.6.9 Affinitätsreinigung von Antiserum

Die Affinitätschromatografie zur Aufreinigung von Antikörpern aus Antiserum erfolgt an HiTrap-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zwischen 0,5 mg und 10 mg Antigen werden gegen Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) unter Zusatz von Natriumlaurylsarcosinat (f.c. 0,1 % (w/v)) zur Solubilisierung dialysiert. Die Kopplung des Antigens an die Säulen wird ebenso wie die Aufreinigung des Antikörpers entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgenommen.

3.6.10 *in vitro*-Translation

In vitro-Translationen werden mit dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Mannheim) gemäß den Empfehlungen des Herstellers (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems) unter Verwendung von [³⁵S]-Methionin (>1000 Ci/mmol bei 10 mCi/ml) durchgeführt. Abweichend vom Protokoll werden die Ansätze mit einem Endvolumen von 25 µl erstellt. Als Kontrolle dient die *in vitro*-Translation von Luciferase Control DNA sowohl mit dem T3- als auch dem T7-Primer. Die Kontrolle ist Teil des verwendeten Systems.

3.7 Spezifische Methoden dieser Arbeit

3.7.1 Verankerung vitaler S2-Zellen auf Oberflächen

Insbesondere für elektrophysiologische Messungen aber auch für die immunocytochemische und fluoreszenzmikroskopische Differenzierung löslicher und membrangebundener Proteine ist die Verankerung von vitalen rekombinant exprimierenden S2-Zellen auf Oberflächen erforderlich. Die Fixierung auf Glas und Kunststoff ist durch Beschichtung mit Poly-L-Lysin möglich. Dazu werden Tropfen einer wäßrigen 0,1 % (v/v) Poly-L-Lysin-Lösung auf die Oberfläche aufgebracht. Die Trocknung und Sterilisierung erfolgt unter einer Sicherheitswerkbank mit UV-C-Bestrahlung über Nacht. Die Probenträger werden in Kulturgefäßen mit exponentiell wachsenden S2-abgeleiteten Kulturen überschichtet. Nach zweitägigem Wachstum erfolgt unter Erneuerung des Mediums die Induktion der rekombinanten Expression für 2 Tage. Die mit Zellen dicht behafteten Probenträger werden steril aus den Kulturschalen entnommen, mit PBS gewaschen und sind für weitere Anwendungen

einsatzbereit. Die erreichte Induktionsrate bei auf den Probenträgern verankerten Zellen ist nur unwesentlich geringer als bei Zellen in Suspension.

3.7.2 Immuncytochemische/fluoreszenzmikroskopische Differenzierung löslicher und membrangebundener Proteine in S2-Zellen

Das Prinzip der Differenzierung beruht auf der Entfernung löslicher Proteine aus den Zellen vor der Fixierung. Die Auswertung erfolgt im Vergleich zu unbehandelten Proben. S2-Zellen werden wie unter 3.7.1 beschrieben auf Objektträgern beziehungsweise Deckgläsern verankert und die rekombinante Proteinexpression induziert. Proben, in denen die löslichen Proteine aus den Zellen entfernt werden sollen, werden für 5 min in Permeabilisierungspuffer (140 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,1 mM CaCl₂, 1,1 mM EGTA pH 7,2, 0,01 % (v/v) Triton X-100) inkubiert. Unmittelbar nach Entfernung der Lösung erfolgt die Fixierung der Zellen in 2% (w/v) PFA in PBS für 5 min. Im Anschluß an die Fixierungsprozedur von Proben und Kontrollen werden die Präparate wie unter 3.5.1 beziehungsweise 3.5.3 beschrieben weiter behandelt. Für bereits Triton-permeabilisierte Proben entfällt der Zusatz von Triton X-100 zur Blockierungslösung während der immuncytochemischen Markierung.

3.7.3 Affinitätsreinigung von Serum an S2-Lysaten

Der Einsatz des Serums α -CvePKC für Immunmarkierungen resultiert in einem sehr hohen Hintergrund, der beispielsweise bei immuncytochemischer Markierung von S2-Zellen die realen Signale maskiert. Eine Affinitätsaufreinigung des Serums an seinem rekombinant exprimierten Antigen ist nicht möglich. Zur Senkung der unspezifischen und Erhöhung der spezifischen Signale bei Immunmarkierungen erfolgt eine Abreicherung der unspezifischen Bindungen. Das Serum wird dazu auf PVDF-Membranen inkubiert, auf denen S2-Gesamtprotein fixiert ist.

PVDF-Membranstreifen (gefaltet zur Oberflächenvergrößerung) werden mit SDS-Extrakten von S2-Zellen für mindestens 1 h inkubiert. Nach Trocknung der Membranstreifen erfolgt die partielle Absättigung unspezifischer Proteinbindungen durch Inkubation in Blockierungspuffer für S2-Immuncytochemie. Auf den kurz in TBS-T-Puffer gewaschenen PVDF-Membranen wird anschließend Serum bei 4°C inkubiert. Daraus resultiert eine Adsorption von den Serum- und Hämolytbestandteilen an den beschichteten Membranen, die an S2-Zellproteine binden. Die Prozedur wird mehrfach wiederholt, bis das Serum farblos erscheint.

4 Ergebnisse

4.1 Erzeugung und Aufreinigung von Antiseren gegen Komponenten des INAD-Signalkomplexes

4.1.1 α -DmTRP

Für den Nachweis von TRP durch Western Blot Analysen, vor allem aber zur Aufreinigung durch Immunpräzipitation von rekombinant exprimierten und nativen INAD-Signalkomplexen werden größere Mengen eines spezifisch gegen DmTRP gerichteten Antikörpers benötigt. Zur Erzeugung eines α -DmTRP-Immuserums wurde ein zur Expression kloniertes *Drosophila melanogaster* TRP-Antigen-Konstrukt (DmTRP3.1, Referenz: BÄHNER, 2001) heterolog in *E. coli* M15p[REP4] exprimiert. Das Antigen umfaßt den C-Terminus des TRP-Proteins (Aminosäuren 906–1275) mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,6 kDa, der an Dehydrofolatreduktase (27 kDa) und Hexahistidin fusioniert ist. Die Antigenexpression und -aufreinigung erfolgte nach den Angaben in Abschnitt 3.2.6. Das exprimierte Antigen im Bakterienlysat ebenso wie die aufgereinigte Form zeigt Abbildung A.1 im Anhang. Im Anschluß an Reinigung und Dialyse wurde das Antigen zur Immunisierung von Kaninchen zur Produktion polyklonaler Antikörper verwendet (siehe 3.6.8). Für Immunpräzipitationsexperimente erfolgte die Aufreinigung des generierten Antiserums #088 durch Affinitätschromatografie am Antigen DmTRP3.1 (Prozedur unter 3.6.9). Die Spezifität der Detektion von DmTRP in *D. melanogaster*-Extrakten wurde durch Western Blot Analysen vom Serum der Endblutung und der daraus gereinigten Antikörper im Vergleich zu gereinigten Antikörpern aus dem Serum #053, ebenfalls erzeugt mit dem verwendeten Antigenkonstrukt, bestimmt (Abbildung A.2). Dabei zeigte sich, dass die Antikörper im Serum #088 das Antigen spezifischer erkennen als die Antikörper der Aufreinigung von #053. Die Charakterisierung der Antigenerkennung in Wildtypfliegen im Vergleich zu einer TRP-Nullmutante belegt die Spezifität von α -DmTRP_{#088} für DmTRP. Unterstützt werden diese Daten durch den Nachweis von TRP in PLC β -Nullmutanten und jungen INAD-Nullmutanten. In älteren Fliegen ist aufgrund der Instabilität komplexungebundener Proteine kein TRP mehr nachzuweisen.

4.1.2 α -DmINAD

Die Erkennung des *D. melanogaster* Proteins INAD erfolgte via α -DmINAD_{#049}-Antiserum (Referenz: BÄHNER *et al.*, 2000). Das polyklonale Kaninchenantiserum ist gegen Epitope des INAD-Proteins im Bereich der Aminosäuren 281–465 (partiell PDZ-Domäne 2 sowie PDZ3) gerichtet. Zur Erhöhung der spezifischen Erkennung des Antigens, im besonderen für Immunpräzipitationsexperimente, wurde das bereits vorhandene Antiserum durch Affinitätschromatografie am Antigen aufgereinigt (Prozedur unter 3.6.9). Die Charakterisierung einer Antikörperaufreinigung gibt Abbildung 4.1 wieder. Die Spezifität des α -DmINAD_{#049}-Antikörpers für das DmINAD-Protein wird durch den Vergleich der Antikörperreaktionen bei Wildtypfliegen und der INAD-Nullmutante deutlich. Im Wildtyp wird das 75 kDa-Protein INAD erkannt. Das schwächere INAD-Signal der TRP-Nullmutante wird durch die geringere Stabilität der Komplexproteine bei fehlender TRP-Expression verursacht.

Im Vergleich zwei verschiedener S2-Zelllinien mit rekombinanter Expression (siehe unter Punkt 4.4.2) werden rekombinante DmINAD-Expressionsprodukte ebenfalls spezifisch erkannt. Die Überprüfung der α -DmINAD-Antikörper an *trp*-Nullmutanten im Vergleich zu Wildtypfliegen sowie an S2-Zellen mit rekombinanter Expression von DmTRP erfolgte vor dem Hintergrund der Kreuzreaktion des Immunsersums #049 und verschiedener daraus gereinigter Antikörperfraktionen mit dem TRP-Protein.

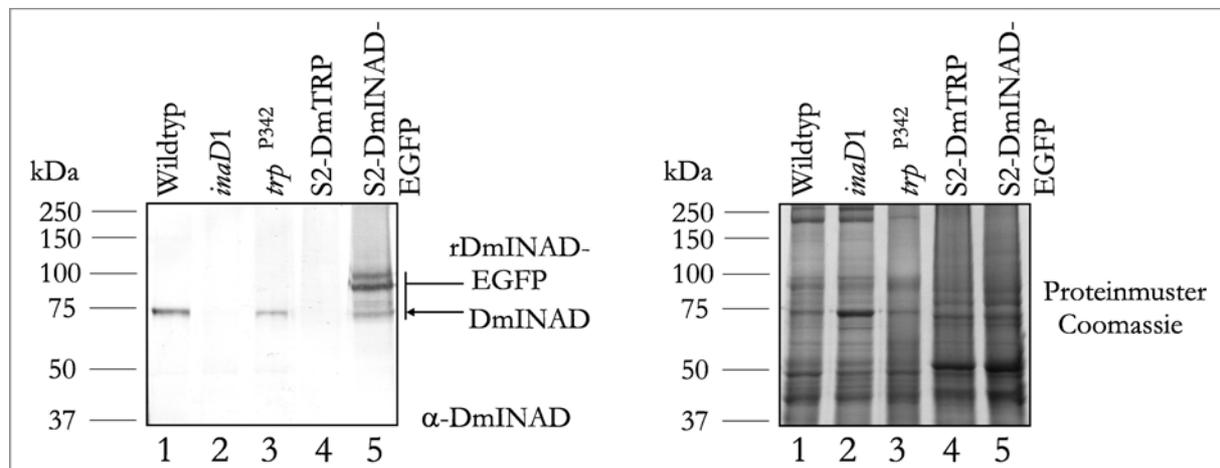


Abbildung 4.1: Spezifität der Antikörper α -DmINAD_{#049} in Western Blot Analysen
 SDS-Extrakte aus je 4 Köpfen von Wildtypfliegen (Spur 1), der INAD-Nullmutante (Spur 2) sowie der TRP-Nullmutante (Spur 3) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert (Coomassie-gefärbtes Proteinmuster als Ladungskontrolle). Die Immunodetektion zeigt für die Antikörper α -DmINAD_{#049} die spezifische Erkennung von DmINAD. In der dargestellten Antikörperreinigung wird keine bekannte Kreuzreaktion des Antiserums #049 mit DmTRP beobachtet. Die Charakterisierung der Antikörperspezifität erfolgte darüber hinaus an SDS-Extrakten von S2-Zellen mit rekombinanter Expression von DmTRP (Spur 4) und DmINAD-EGFP (Spur 5, S2-Linien charakterisiert unter 4.4.2) zur Überprüfung des Ausmaßes der TRP-Kreuzreaktion mit rekombinantem DmTRP.

4.2 Sequenzvariationen bei Komponenten des INAD-Signalkomplexes von *D. melanogaster*

Verschiedene kodierende Nukleinsäuresequenzen weisen populations- und individuenspezifische Differenzen auf. Vielfach handelt es sich um stille Mutationen, die keine funktionellen Auswirkungen haben. Resultieren Sequenzabweichungen der DNA in einer veränderten Primärstruktur kodierter Proteine, sind Einflüsse auf die Funktion der Proteine möglich. Für Komponenten des INAD-Signalkomplexes wurde deshalb geprüft, ob abweichende Sequenzen bekannt sind.

4.2.1 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) innerhalb der kodierenden Sequenz von INAD

Die Analyse publizierter Nukleinsäuresequenzen zu Beginn der vorliegenden Arbeit ergab für die Signalkomplexkomponente INAD Sequenzabweichungen. Um mögliche Auswirkungen bestehender Sequenzunterschiede bewerten zu können, erfolgte ein Alignment der Sequenzen INAD-N (NCBI Annotation Project, Accession: XM080984, mRNA), INAD-S (publiziert von SHIEH AND NIEMEYER, 1995, NCBI Accession: U15803) und INAD-V (Celera-Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms, NCBI Accession: AE003458) zur Lokalisation von Basenpaaraustauschen sowie möglicherweise resultierenden Veränderungen der Primärstruktur des INAD-Proteins. Das Alignment zeigt 20 Basenpaaraustausche innerhalb der kodierenden Nukleinsäuresequenz (CDS, Anhang A.13), die jedoch zu keinem Aminosäureaustausch führen (Anhang A.12). Die Primärstruktur von INAD ist konserviert. Aus dem Sequenzunterschied an Position 1107 der DNA-Sequenzen in Anhang A.13 resultiert für INAD jedoch ein RFLP für die Restriktionsendonuklease AflII (Pos. 913–918 ORF, Exon 4). Im Gegensatz zu INAD-DNA-Sequenzen, die der Sequenz INAD-V bzw. INAD-N entsprechen, wird die INAD-S-Sequenz an dieser Position von AflII gespalten. Da die Sequenzanalysen keine Veränderung der Primärstruktur von DmINAD zeigen, können sequenzabhängige Änderungen der funktionellen Proteinstruktur zwischen den verschiedenen INAD-Formen ausgeschlossen werden. Abweichungen treten lediglich in PDZ2 auf, wie spätere stammspezifische Analysen zeigen (KUMAR AND SHIEH, 2001).

4.2.2 Primärstrukturvariationen des TRP-Proteins

In öffentlichen Sequenzdatenbanken finden sich gegenwärtig sechs publizierte differierende Primärstrukturen des TRP-Proteins von *Drosophila melanogaster*. Zum einen ergeben sich Unterschiede zwischen *D. melanogaster*-Wildtypstämmen (z.B. Q9VAE1: Stamm Berkley im Vergleich zu Stamm Oregon R). Darüber hinaus finden sich Unterschiede auch innerhalb verschiedener Analysen eines Stammes (Oregon R: P19334, JU0092, AAA56928). Die Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen DmTRP-Sequenzen und relevante Unterschiede.

Tabelle 4.1: Differierende Primärstruktur von DmTRP

Sequenz <i>Accession No</i>	Molekular- gewicht [Da]	Länge [Aminosäuren]	Variation [Position]	Stamm
JU0092	143227	1275	5, 85, 86, 785	Oregon R
AAA28976	143242	1275	222, 785	unbekannt
Q9VAE1	142592	1275	188, 1008	Berkeley
JN0015	142737	1274	147, 285–288, 326–329, 365, 367–374, 925, 1008	unbekannt
AAA56928	142773	1274	285–288, 326–329, 365, 367–374	Oregon R
P19334	142589	1275	222, 785	Oregon R

4.3 Klonierung der INAD-Komplexkomponenten zur rekombinanten Expression in S2-Zellen

Rekombinante Expression von Proteinen erfordert die Einschleusung der für das gewünschte Protein kodierenden Sequenz in das rekombinante Expressionssystem. Um eine korrekte Übersetzung der Nukleinsäuresequenz in die Proteinprimärstruktur zu gewährleisten, wurden alle Konstrukte mit cDNA hergestellt.

Die vollständige cDNA der *norpA*-kodierte PLC β stand für die Expressionsklonierung zur Verfügung (Konstrukt pGNorpA650/10). Für DmINAD, DmPKC und DmTRP war im Rahmen dieser Arbeit die Verifizierung vorhandener Sequenzen beziehungsweise die Isolierung einer kodierenden Sequenz erforderlich. Geeignete Mittel zur Überprüfung einer vollständigen und fehlerfreien Kodierung sind die beidseitig terminale Ansequenzierung der kodierenden Sequenzen in Verbindung mit *in vitro*-Translationsanalysen sowie die Sequenzierung der Konstrukte.

4.3.1 Analyse von cDNA-Klonen auf Eignung zur Expressionsklonierung

Vor Verwendung zur Expressionsklonierung wurde der Klon pcDNA3-DmTRP auf vollständige Kodierung für *D. melanogaster*-TRP analysiert. Die Ansequenzierung erfolgte 5'-terminal mit T7 und 3'-terminal mit Sp6. Die erhaltenen Sequenzen ließen sich dem Exon 1 beziehungsweise Exon 14 der TRP-DNA-Sequenz von *D. melanogaster* zuordnen

(Daten nicht gezeigt). Sie decken somit die gesamte TRP-kodierende Region ab. Die Eignung des pcDNA3-DmTRP-Klons zur rekombinanten Expression wurde darüber hinaus mittels *in vitro*-Translation überprüft. Das erhaltene *in vitro*-Translationsprodukt hat eine apparente Größe von ca. 140 kDa (siehe Abbildung 4.2) und entspricht somit dem Molekulargewicht von TRP (142,6 kDa), wie auch der Vergleich mit der *C. vicina*-TRP-Kontrolle (CvTRP, ähnliches Molekulargewicht) zeigt.

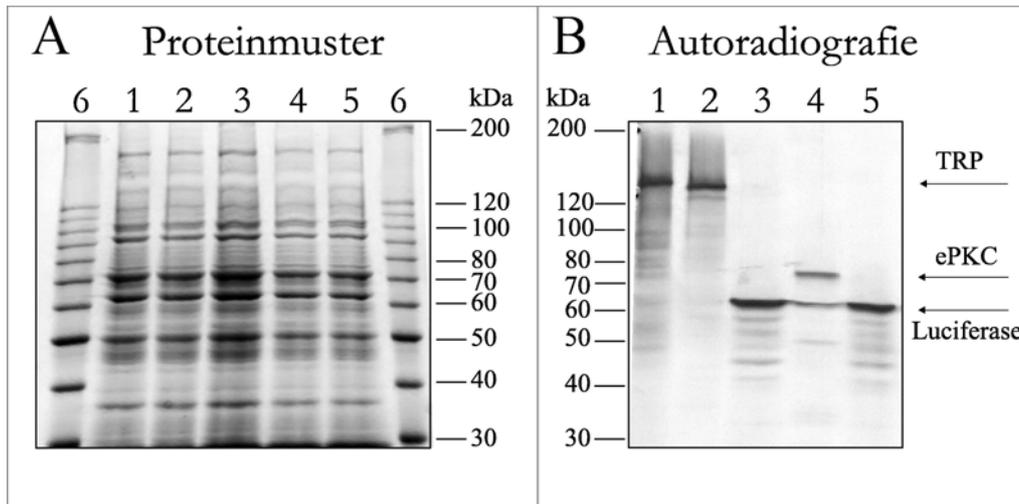


Abbildung 4.2: *In vitro*-Translationen von DmTRP- und DmePKC-cDNAs

Der Abbildungsteil A enthält das Proteinmuster (Coomassie-Färbung) der durch SDS-PAGE aufgetrennten *in vitro*-Translationen. B zeigt die Autoradiografie des Polyacrylamidgels. Die Spuren dokumentieren die Ergebnisse der *in vitro*-Translation folgender cDNA-Konstrukte unter den jeweils angegebenen Promotoren: 1) CvTRP mit T7-Promotor, 2) DmTRP mit T7-Promotor, 3) Luciferase mit T7-Promotor (Positivkontrolle), 4) DmePKC mit T3-Promotor und 5) Luciferase mit T3-Promotor. Die Spuren 6 enthalten den Molekulargewichtsstandard.

Klon DD7.1a entstammt einer Ausschleusung aus einer kopfspezifischen λ -cDNA-Bank von *D. melanogaster* (SANDER, 1996). Die inserierte cDNA war bereits durch terminale Sequenzierung als vollständig für ePKC kodierend identifiziert worden. Die Überprüfung des DD7.1a-Konstruktes auf expressionsfähige Kodierung für ePKC erfolgte ebenfalls durch *in vitro*-Translation. Das resultierende Produkt mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 75 kDa entspricht fast der berechneten Größe von 79,8 kDa für ePKC (Abbildung 4.2).

4.3.2 Isolierung einer cDNA-Sequenz mit vollständiger Kodierung für INAD von *D. melanogaster*

Grundlage der rekombinanten INAD-Expression ist die Isolierung einer cDNA, die fehlerfrei für das gesamte INAD-Protein kodiert. Die *expressed sequence tag* (EST)-Klone GH22204 und GH27648 (Fa. ResGen, Groningen [Niederlande]) wurden hinsichtlich ihrer Vollständigkeit und der fehlerfreien Kodierung für DmINAD analysiert. Die Restriktions-

analyse beider EST-Klone ergab ein Muster, das den Erwartungen bei INAD-Kodierung entspricht (Daten nicht gezeigt). *In vitro*-Translationsversuche beider cDNA-Klone mit dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Fa. Promega, Mannheim) ergaben jedoch nicht das erwartete INAD-Expressionsprodukt von ca. 75 kDa (Abbildung 4.3). Die Translationsversuche lieferten kein identifizierbares Translationsprodukt bei GH27648 beziehungsweise resultierten bei GH22204 und einem weiteren EST-Klon (HL04263) in der Produktion von Peptiden, die deutlich unter dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 75 kDa liegen, was auf partielle Translation mit frühzeitigem Abbruch hindeutet. Zur Ermittlung der exakten Nukleotidabfolge wurden die EST-Klone GH22204 vollständig und GH27648 größtenteils (es fehlen: 1–569 sowie 1312–1383 CDS) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte partiell als Auftragsleistung (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg; Primer: INAD1, MTF, pc, INADX, INADY, IN27A, IN27B, IN27C rev) in Verbindung mit eigenen Sequenzierungsansätzen mit sequenzspezifischen Primern (IS1-Cy5 bis IS6-Cy5). Diese Analysen ergaben, dass GH22204 eine 29 bp-Deletion in Exon 2 aufweist (Pos. 584–612 CDS), die in einer Verschiebung des Leserahmens resultiert. Das neue Leseraster endet nach insgesamt 281 Aminosäuren mit einem Stop-Codon. Der *open reading frame* (ORF) von GH27648 weist eine Punktmutation auf: Der Austausch G₈₉₅T erzeugt eine *amber*-Mutation in Exon 4, wodurch auch hier ein unvollständiges INAD-Expressionsprodukt von 298 Aminosäuren entsteht. Ein weiterer INAD-EST-Klon (HL04263, Fa. ResGen, Groningen [Niederlande]) weist ein Intron im Exon 5 (Pos. 1395 CDS, AS 465 zwischen PDZ3 und PDZ4) auf, das ein Stop-Codon im ORF enthält (erwartetes Expressionsprodukt 481 AS).

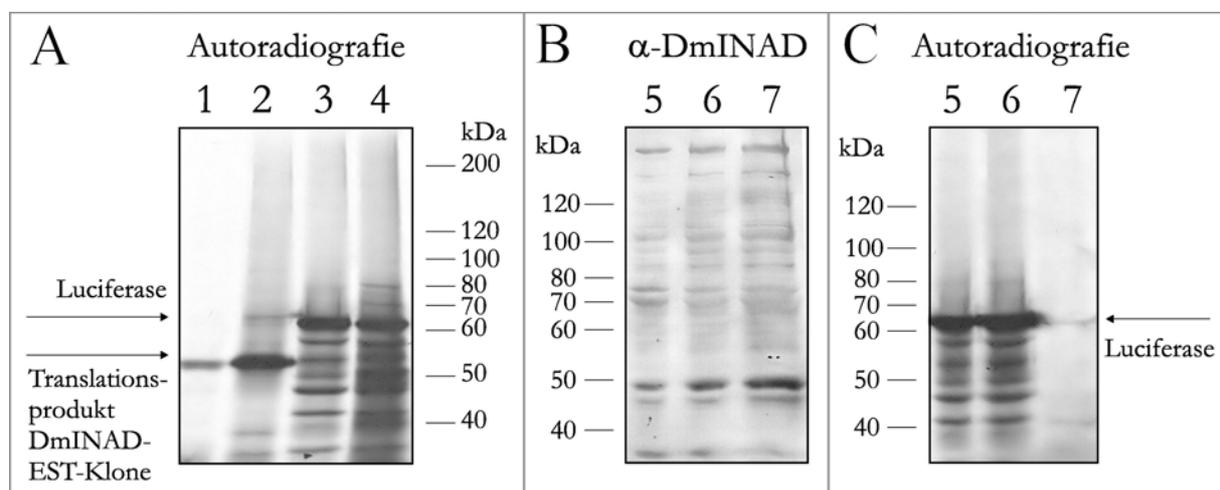


Abbildung 4.3: *In vitro*-Translationsexperimente von DmINAD-EST-Klonen zur Überprüfung der vollständigen und fehlerfreien Kodierung für DmINAD

Die Autoradiografie in A zeigt die *in vitro*-Translationen der DmINAD-EST-Klone GH22204 unter dem T7-Promotor (Spur 1) und HL04263 unter dem T3-Promotor (Spur 2) sowie der Positivkontrolle Luciferase unter dem T7-Promotor (3) und dem T3-Promotor (Spur 4). Die Überprüfung des EST-Klons GH27648 unter dem T7-Promotor (Spur 7) in Referenz zur Luciferasekontrolle unter T7 (Spuren 5 und 6, verschiedene cDNA-Konzentrationen) dokumentieren die Abbildungsteile B (Western Blot: Nachweisversuch eines INAD-Translationsproduktes) und C (Autoradiografie). Keiner der untersuchten DmINAD-EST-Klone führt zur Translation des 75 kDa-Proteins DmINAD.

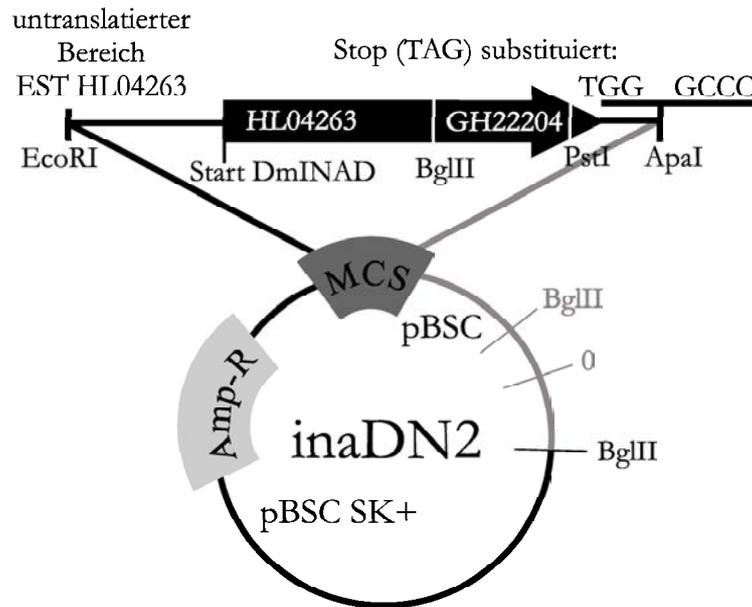


Abbildung 4.4: Vollständige und fehlerfreie cDNA kodierend für *D. melanogaster*-INAD: inaDN2 generiert aus HL04263 und GH22204

Der DmINAD-cDNA-Klon inaDN2 ist integriert in den Vektor pBSC, wobei MCS die *multiple cloning site* und AmpR die Kodierung für vermittelte Ampicillinresistenz bedeutet.

Die hohe Fehlerquote von EST-Klonen für INAD-Sequenzen erforderte einen Wechsel der Methodik zur Isolierung der gewünschten cDNA. Das Scheitern verschiedener Versuche zur Isolierung einer nativen expressionsfähigen INAD-Sequenz führte zur Strategie der Generierung der gewünschten Sequenz durch Kombination bereits vorhandener Sequenzteile. Der gewünschte INAD-cDNA-Klon entstand durch Klonierung aus den EST-Klonen HL04263 und GH22204. Dabei wurde der 5'-Bereich aus HL04263 bis zur BglII-Schnittstelle in INAD (Pos. 1203–1213 CDS) mit dem 3'-Bereich von GH22204 ab der BglII-Schnittstelle kombiniert (Abbildung 4.4). Der erzeugte Fusionsklon inaDN2 entspricht in seiner Sequenz dem RFLP von NCBI-Accession: AE003458 (siehe Anhang A.13). Das Vorhandensein des in GH22204 fehlenden Nukleinsäurebereichs in inaDN2 wurde durch Sequenzierung mit den Primern IS2 und IS3 verifiziert (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Herstellung von Konstrukten zur induzierbaren Expression in S2

Auf Basis des S2-Expressionsvektors pMT/V5-His (3,5 kb, Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe) ist die Generierung von Konstrukten möglich, die induzierbar in S2-Zellen exprimiert werden. Die Induktion erfolgt durch Aktivierung des Metallothioninpromotors mit CuSO_4 . Der Expressionsvektor pMT/V5-His bietet die Möglichkeit zur C-terminalen Fusion der vektorkodierten Epitope Hexahistidin und V5 an die inserierte kodierende Sequenz (CDS). Sie können zur Detektion der Expressionsprodukte (z.B. Immunocytochemie, Western Blot Analysen) sowie zur Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine ge-

nutzt werden (6 x His: Immobilisierte Metallaffinitätschromatografie (IMAC) mittels Ni²⁺- oder Co²⁺-Ionen, V5: α -V5-Immunpräzipitation). Für die Expression in S2-Zellen erfolgte die Generierung folgender Konstrukte:

- pMT/EGFP: kodiert für EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)
- pMT/DmTRP: kodiert für *D. melanogaster*-TRP
- pMT/DmINAD-EGFP: kodiert für ein Fusionskonstrukt aus DmINAD und EGFP
- pMT/DmePKC: kodiert für *D. melanogaster*-ePKC
- pMT/DmnormpA-V5-His: kodiert für DmPLC β fusioniert mit V5 und Hexahistidin
- pMT/DmTRPL-EGFP und pMT-DEST/DmTRPL-HcRed: kodieren für DmTRPL fusioniert mit EGFP oder HcRed.

Die Klonierung der Konstrukte, Vektorkarten und die erwarteten Expressionsprodukte sind detailliert in Anhang A.2 dargestellt.

4.4 S2-Zellkultursystem: Rekombinante Expression in polyklonalen Linien

4.4.1 Charakterisierung von Ausgangslinien und Etablierung der rekombinanten Expression

Als Stammkulturen für die Arbeit mit S2-Zellen standen die Linien S2 (Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe) und S2P15 (Bezug von Herrn Martin Roth, Würzburg) zur Verfügung. S2-Zellen wachsen nicht-adhärenz in Suspensionskultur, bilden unter Schwerkrafteinwirkung jedoch instabile Zellablagerungsschichten aus. Lichtmikroskopisch erscheinen S2-Kulturen inhomogen bezüglich ihrer Größe und Morphologie. Beide Parameter hängen vom Zellzyklusstadium der einzelnen Zellen ab. S2-Zellen können nicht synchronisiert werden. Abbildung 4.5 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Stammkultur S2.

Das Wachstum von S2-Kulturen ist auf eine minimale Zelldichte von 5×10^5 limitiert. S2-Zellen verdoppeln sich unter optimalen Wachstumsbedingungen alle 3–4 Tage. Die Kultur S2P15 weist eine leicht höhere Amplifikationsrate als die Kultur S2 auf (Daten nicht gezeigt). Bei längerfristiger Kultivierung unter optimalen Wachstumsbedingungen (logarithmische Wachstumsphase) etabliert ein geringer Teil einer S2-Kultur Adhärenz begleitet von morphologischen Veränderungen (Abflachung der Zellen, Ausbildung von Filopodien, siehe Abbildung 4.5 C und D), was als lichtmikroskopischer Wachstumsindikator genutzt werden kann. Trypanblau-Viabilitätstests können die Bewertung des Wachstumszustandes

von S2-Kulturen unterstützen. Biochemische und immuncytologische (Referenzen in IC-Dokumentationen, beispielsweise Abbildung 4.21 a oder 4.22 a und c) Charakterisierungen von S2-Zellen dienen als Referenz für rekombinant exprimierende S2-Zellen. Die Western Blot Analysen von Zellextrakten zeigen, dass die mutmaßliche Makrophagenlinie S2 weder die vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes der Phototransduktionskaskade noch TRPL oder das visuelle G-Protein exprimiert und somit einen Nullhintergrund darstellt (Abbildung 4.6).

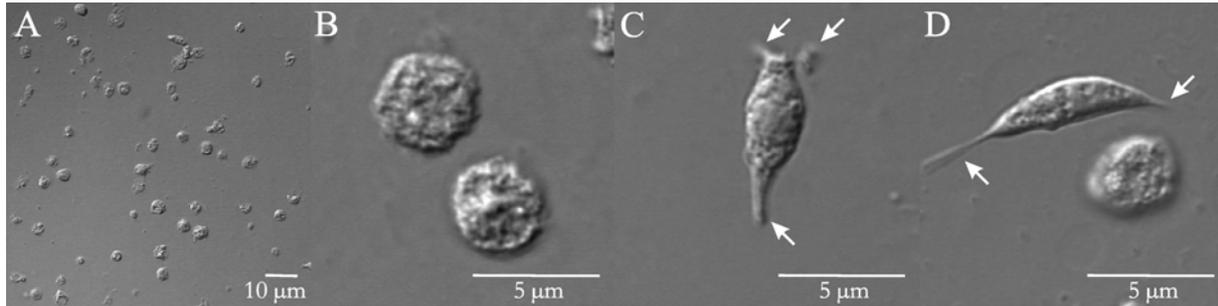


Abbildung 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von S2-Zellen

Dargestellt sind im Differentiellen Interferenzkontrast die Übersicht einer S2-Kultur (A), einzelne Zellen typischer Form (B) sowie ausgewählte adhärierende S2-Zellen (C und D) mit Filopodienbildung (weiße Pfeile).

Die Lokalisation rekombinanter Expressionsprodukte in Bezug auf mögliche Restriktion auf subzelluläre Kompartimente erfordert Marker, die spezifisch bestimmte Zellkompartimente markieren. Die Etablierung entsprechender Marker für S2-Zellen war aufbauend auf Erkenntnissen von *Drosophila*-Photorezeptoren vorgesehen. Die Lektine *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) und ConA (Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*; Affinität zu terminalen α -D-Mannosyl- und α -D-Glykosylresten; Aktivität erfordert Ca^{2+} und Mn^{2+}) binden die Glykoproteine an Membranen der Photorezeptoren von *D. melanogaster*. In S2-Zellen markieren sie entweder die Plasmamembran sehr ungleichmäßig in unpermeabilisierten Zellen (Anhang A.7) oder neben der Plasmamembran weitere intrazelluläre Strukturen bei Permeabilisierung der S2-Zellen und sind somit nicht zur exklusiven Markierung der äußeren Membran geeignet. Für Mammalia-Zellkulturen etablierte Marker subzellulärer Kompartimente wie der Mitochondrien-markierende Antikörper gegen Cytochrom C (α -Cytochrome C mAb clone 6H2.B4, Fa. Promega) markieren weder in Photorezeptorzellen von *D. melanogaster* noch in S2-Zellen entsprechende Strukturen (Daten nicht gezeigt). Die Kernlokalisierung in S2-Zellen ist durch DAPI-Färbung möglich (Bild 4.35).

Zur Etablierung der Transfektion von S2-Zellen mittels CaPO_4 -Transfektion, der vom Vertreter empfohlenen Methode zur Herstellung von rekombinanten S2-Linien, wurde das Konstrukt pMT/EGFP eingesetzt. Die bestimmte CaPO_4 -Transfektionseffizienz für dieses Konstrukt schwankt zwischen ca. 0,5% und 10% (Referenzwert der Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe: 5–15%). Die Limitierung der Transfektionsrate auf einen Wert unter 10% in Verbindung mit schlechter Reproduzierbarkeit höherer Transfektionsraten verhindert den Einsatz von transienten Transfektionen für die nachfolgende biochemische

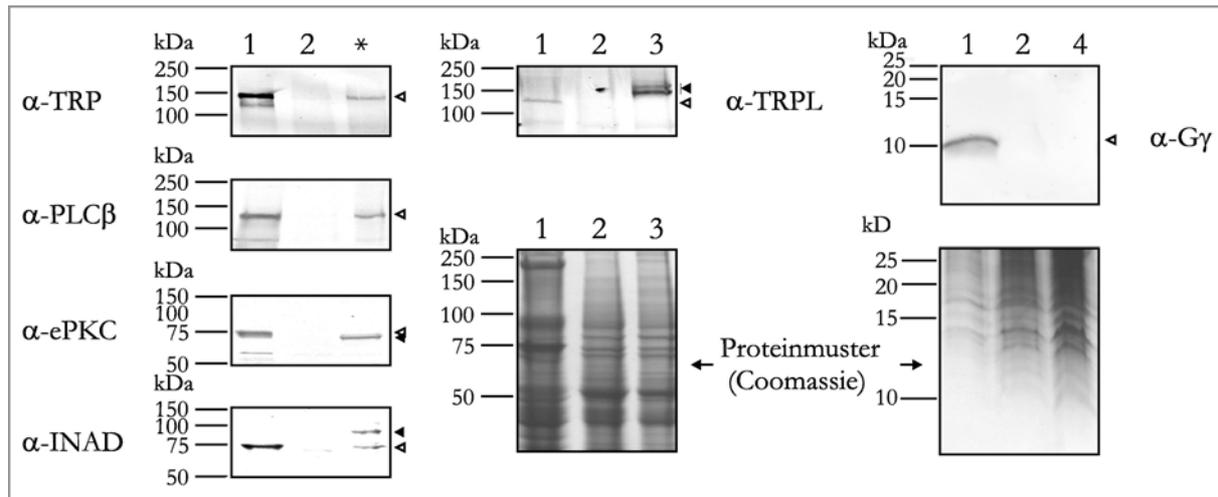


Abbildung 4.6: Charakterisierung von S2-Zell-Extrakten: Fehlen photorezeptorspezifischer Proteine in Western Blot Analysen

S2-Zellen wurden unter Verwendung von SDS-Extrakten zur vollständigen Extraktion aller Proteine auf intrinsische Expression ausgewählter Phototransduktionsproteine überprüft. Eine positive Referenz (1) sind SDS-Extrakte aus Köpfen von *D. melanogaster*-Wildtypfliegen (abhängig vom Nachweisantikörper 2–5 Köpfe/Spur). Bei der zweiten Positivkontrolle handelt es sich um 2–4 μ l SDS-Extrakt aus transfizierten S2-Zellen nach Expressionsinduktion: * – im Rahmen dieser Arbeit hergestellte stabile Linien mit vorwiegend singulärer Expression des nachzuweisenden Proteins, 3 – Linie S2-DmTRPL-EGFP und 4 – Linie S2-[TRP;TRPL-EGFP;INAD] Klon B8 (im verwendeten Extrakt wurde zuvor rDmINAD nachgewiesen). Die Spuren 2 enthalten SDS-Extrakt der überprüften Stammlinie S2P15. Das Proteinmuster im mittleren Abbildungsteil dokumentiert exemplarisch die Separierung der extrahierten Proteine durch SDS-PAGE. Zu beachten ist die Molekulargewichtsdifferenz zwischen nativem (\triangleright) und rekombinantem INAD beziehungsweise TRPL durch EGFP-Kopplung sowie ein leicht differierendes Molekulargewicht rekombinanter DmePKC.

Analyse der transfizierten Zellkultur. EGFP-exprimierende Zelllinien zeigen deutlich die Bedeutung des Verhältnisses von rekombinant exprimiertem Protein zum Gesamtproteingehalt für den direkten biochemischen Nachweis von Expressionsprodukten in Western Blot Analysen aus Zellextrakten. Durch EGFP-Fluoreszenz gekennzeichnete S2-Linien liefern bei niedrigen Expressionsraten (abhängig unter anderem von der Transfektionseffizienz) keine Signale in EGFP-Western Blot Analysen mit unterschiedlichem Gesamtproteingehalt pro Probe. Abbildung 4.7 B belegt, dass durch spezifische Anreicherung mittels α -EGFP-Immunpräzipitation das Vorhandensein des rekombinanten Expressionsproduktes EGFP im Immunpräzipitat im Gegensatz zum Extrakt gezeigt werden kann. Eine Abschätzung des Verhältnisses von rekombinantem Protein zu Gesamtproteingehalt ist in polyklonalen wie auch monoklonalen Linien bei fluoreszenzmarkiertem Expressionsprodukt durch Bestimmung des Anteils an detektierten exprimierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl in Verbindung mit der Einschätzung der Expressionsstärke innerhalb der Kultur (Intensitäten der Fluoreszenzsignale) möglich.

Die limitierende Effizienz der für S2-Zellen etablierten Transfektionsmethode erfordert für biochemische Analysen und aussagekräftige immunocytochemische Untersuchungen die Etablierung stabil transfizierter S2-Linien durch den Einsatz von Selektionsmarkern zur

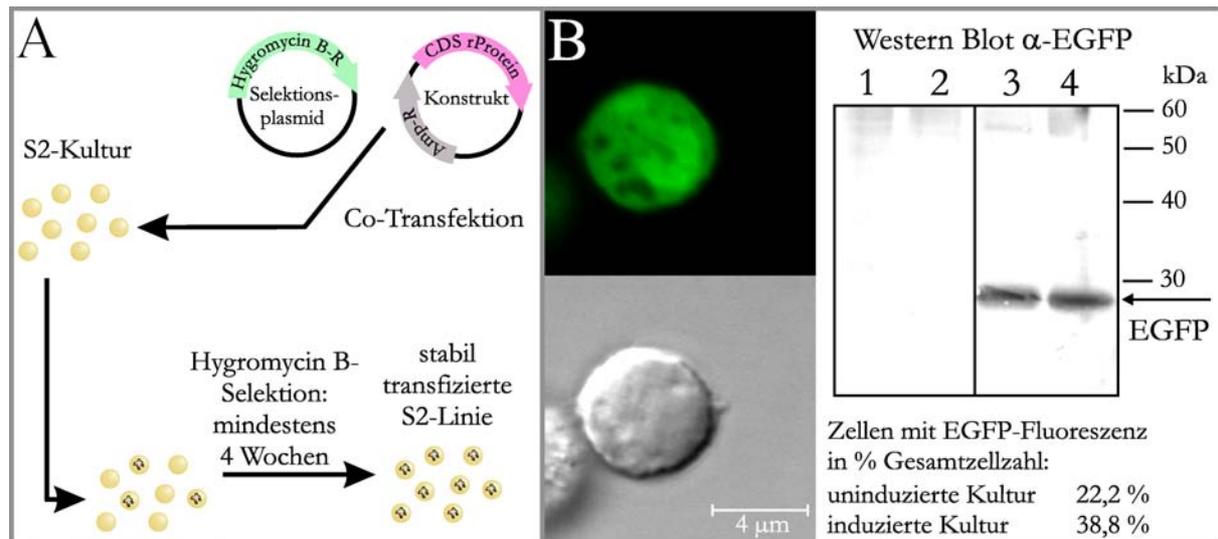


Abbildung 4.7: Stabil transfizierte Linien: Schematischer Versuchsablauf und Charakterisierung der Expression in der stabilen Linie S2-EGFP

A: Schematische Darstellung der Strategie zur Selektion stabil transfizierter Linien mit idealisiertem Verlauf. Im realen Experiment erfolgt ebenso die Transfektion einiger Zellen mit entweder Selektionsplasmid oder Expressionskonstrukt. Die etablierte Kultur enthält nach Abschluß der Selektion immer einen Anteil an Zellen, die Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum besitzen ohne Expression des Co-Transfektionskonstruktes zu zeigen. Durch den Anteil dieser Zellen wird die maximale Expressionsrate limitiert. B dokumentiert die Expression von EGFP in einer Linie stabil transfiziert mit dem Plasmid pMT/EGFP. Rekombinant exprimiertes EGFP ist innerhalb der gesamten Zelle (mit Ausnahme des Zellkerns) lokalisiert. Western Blot Analysen erfolgten unter Verwendung von Zellen mit und ohne Induktion der rekombinanten Expression durch CuSO_4 . Die Spuren 1 und 2 wurden mit $10 \mu\text{l}$ Tritonextrakt beladen (1: induziert, 2: uninduziert). Es wird kein EGFP nachgewiesen. Die Spuren 3 (induziert) und 4 (uninduziert, *leakage expression* durch Fluoreszenzmikroskopie verifiziert) zeigen die α -EGFP-Immunpräzipitationen aus den Tritonextrakten.

Anreicherung transfizierter Zellen. Die Herstellung stabiler rekombinanter S2-Linien erfolgte durch Co-Transfektion des Selektionsplasmides pCoHygro (3.1.3.1), das Resistenz gegenüber Hygromycin B (ein aminoglykosidisches Antibiotikum produziert von *Streptomyces hygroscopicus*, Inhibition der Proteinsynthese) vermittelt. PCoHygro kodiert Hygromycin B Phosphotransferase, ein Enzym, das Hygromycin B durch Phosphorylierung inaktiviert. Nach Abschluß der Selektion ist der Anteil an rekombinant exprimierenden Zellen in einer Kultur im Vergleich zu transienter Transfektion deutlich gestiegen. Im Vergleich zur Rate bei transienter CaPO_4 -vermittelter Transfektion von EGFP (5–10%) wird nach der Selektion in Abhängigkeit von den Induktionsbedingungen eine EGFP-Expression von 25–82% erzielt. Die singuläre Transfektion einiger Zellen mit dem Selektionsplasmid mit der folgenden Co-Anreicherung dieser Zellen in der selektierten Kultur limitiert die maximal erreichbare Expressionsrate. Die Etablierung stabil transfizierter Linien ist in Abbildung 4.7 A schematisch dargestellt, Abbildungsteil B zeigt die stabile Expression von EGFP.

4.4.2 Etablierung der Expression von INAD-Signalkomplexkomponenten: Charakterisierung polyklonaler S2-Transfektionskulturen

Die Konstrukte pMT/DmTRP, pMT/DmePKC, pMT/DmINAD-EGFP und pMT/Dm-norpA-V5-His (Referenz: Kapitel 4.3.3) wurden zur Erzeugung von S2-Linien stabil so transfiziert, dass jeweils eine der INAD-Komplexkomponenten exprimiert wird. In den durch Hygromycin B-Zusatz selektierten stabilen polyklonalen Linien S2-DmTRP, S2-DmePKC, S2-DmINAD-EGFP und S2-DmPLC-V5-His konnten die rekombinanten Expressionsprodukte (rDmTRP, rDmePKC, rDmINAD-EGFP und rDmPLC β -V5-His) sowohl immunocytochemisch als auch biochemisch durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden (4.8–4.11). Diese Analysen zeigten die Möglichkeit der Expression aller vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes im gewählten rekombinanten System und charakterisieren das singuläre Verteilungsmuster jeder Komponente in S2-Zellen.

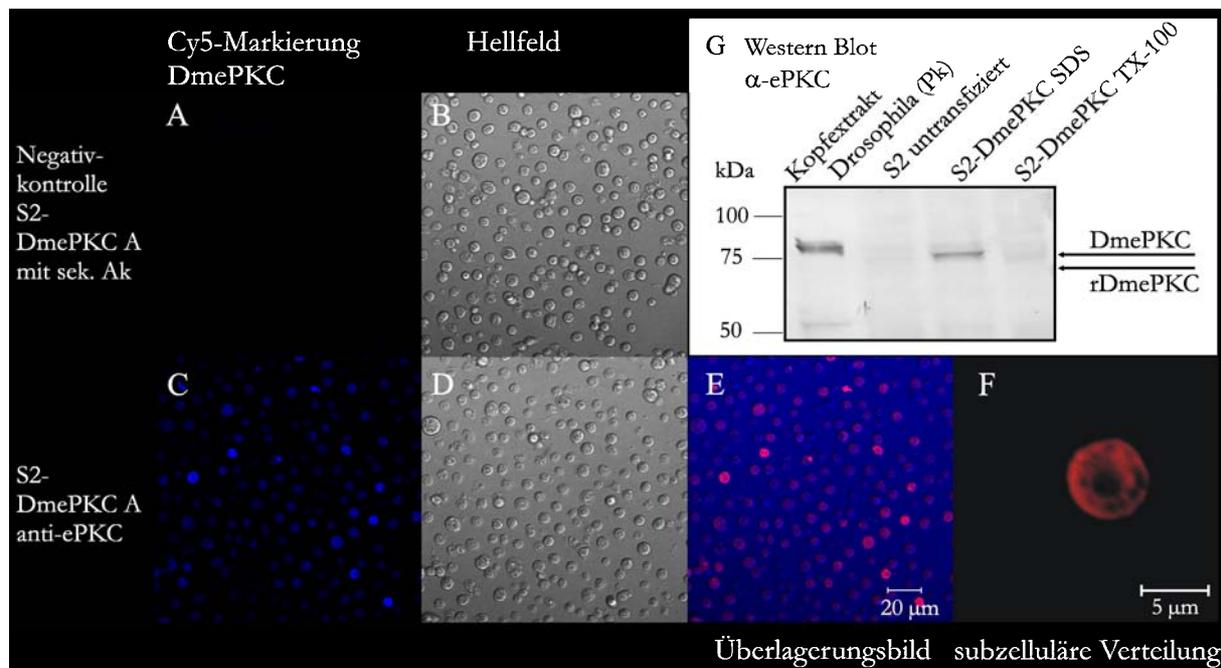


Abbildung 4.8: Rekombinant exprimierte DmePKC in einer stabilen Linie S2-DmePKC. Die Immunocytochemie zum Nachweis der rekombinanten Expression von DmePKC belegt bei Inkubation der DmePKC-Zellen mit α -ePKC-Serum (C und F, D: Hellfeld DIC, E: Fusionsbild aus ePKC-Signal und Hellfeld) im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne ePKC-spezifisches Antiserum (A, B) das Vorhandensein von rDmePKC. Der Abbildung F kann die subzelluläre Verteilung von rDmePKC entnommen werden. G dokumentiert den biochemischen Nachweis von rDmePKC in Western Blot Analysen im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Negativkontrolle) und zu DmePKC isoliert aus Fliegenköpfen (Pk: Positivkontrolle). Das Fehlen löslicher rDmePKC in Triton X-100-Extrakten beruht vermutlich auf der Instabilität von ePKC bei Extraktion unter unvollständig denaturierenden Bedingungen.

Die biochemischen Detektionen der rekombinant exprimierten Proteine durch Western Blot Analysen zeigen für einige Expressionsprodukte ein von den Berechnungen und von

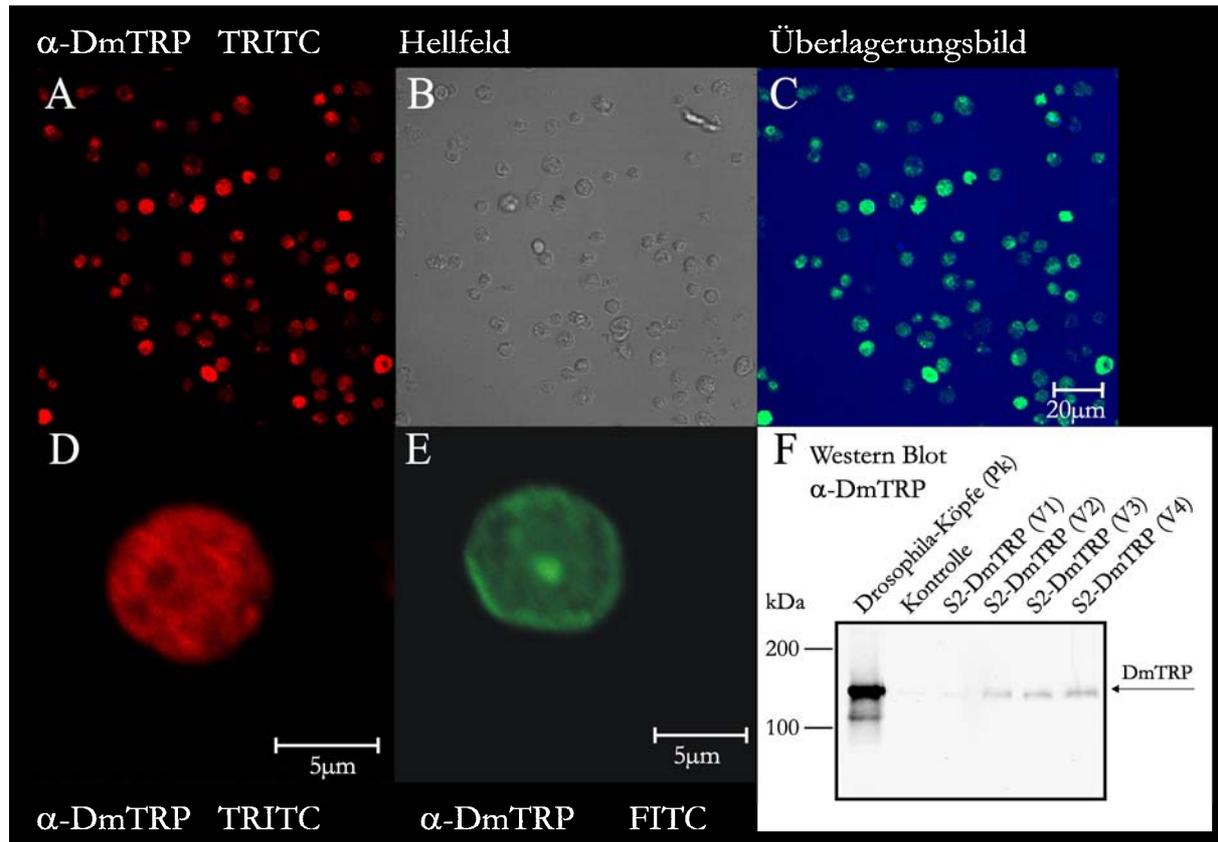


Abbildung 4.9: Expression von rekombantem Drosophila-TRP in S2-Zellen

Abbildung A zeigt den immuncytochemischen Nachweis von rDmTRP in S2-DmTRP in Referenz zur lichtmikroskopischen Aufnahme (B, Differentieller Interferenzkontrast [DIC]). Die Überlagerung des Fluoreszenz- und des Hellfeldkanals (C) erlauben keine Rückschlüsse auf die mögliche Anreicherung von rDmTRP in der Plasmamembran. Die Abbildungsteile D und E zeigen das subzelluläre Verteilungsmuster des rekombinanten Proteins. In F ist der biochemische Nachweis von rDmTRP in SDS-Extrakten der Zellen durch Western Blot Analyse abgebildet (Pk: Positivkontrolle, V1-V4: 1-4 μ l Extrakt).

der Fliegenkontrolle abweichendes apparentes Molekulargewicht in der gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe rDmEPC und rDmINAD-EGFP, Abbildungen 4.8 und 4.11). Die Abweichung kann nicht vollständig auf die hohe geladene Proteinmenge zurückgeführt werden, wie der Nachweis von rDmPLC β -V5 in Abbildung 4.10 belegt: die Beladung der Gelspur mit einer hohen Gesamtproteinmenge beim Nachweis von rDmPLC β -V5 (von Fliegenkontrolle abweichendes Molekulargewicht durch Kopplung von *tags*) resultiert hier in keiner Veränderung der elektrophoretischen Mobilität. Darüber hinaus ändert sich das scheinbare Molekulargewicht der rekombinanten Proteine in Abhängigkeit vom Extraktionspuffer, wie besonders deutlich rDmINAD-EGFP bei SDS- und Tritonextraktion zeigt. Dieses Verhalten ist jedoch nicht spezifisch für die rekombinanten Expressionsprodukte der S2-Zellexpression, sondern vielmehr ein weiter verbreitetes Phänomen, wie die Untersuchungen von Signalkomplexproteinen von *Drosophila* exemplarisch für DmEPC belegen (Abbildung 4.11 H). Die Ursachen wurden nicht weiter im Detail analysiert. Die Nachweise des rekombinanten Expressionsproduktes in Extrakten von Linien transfiziert mit

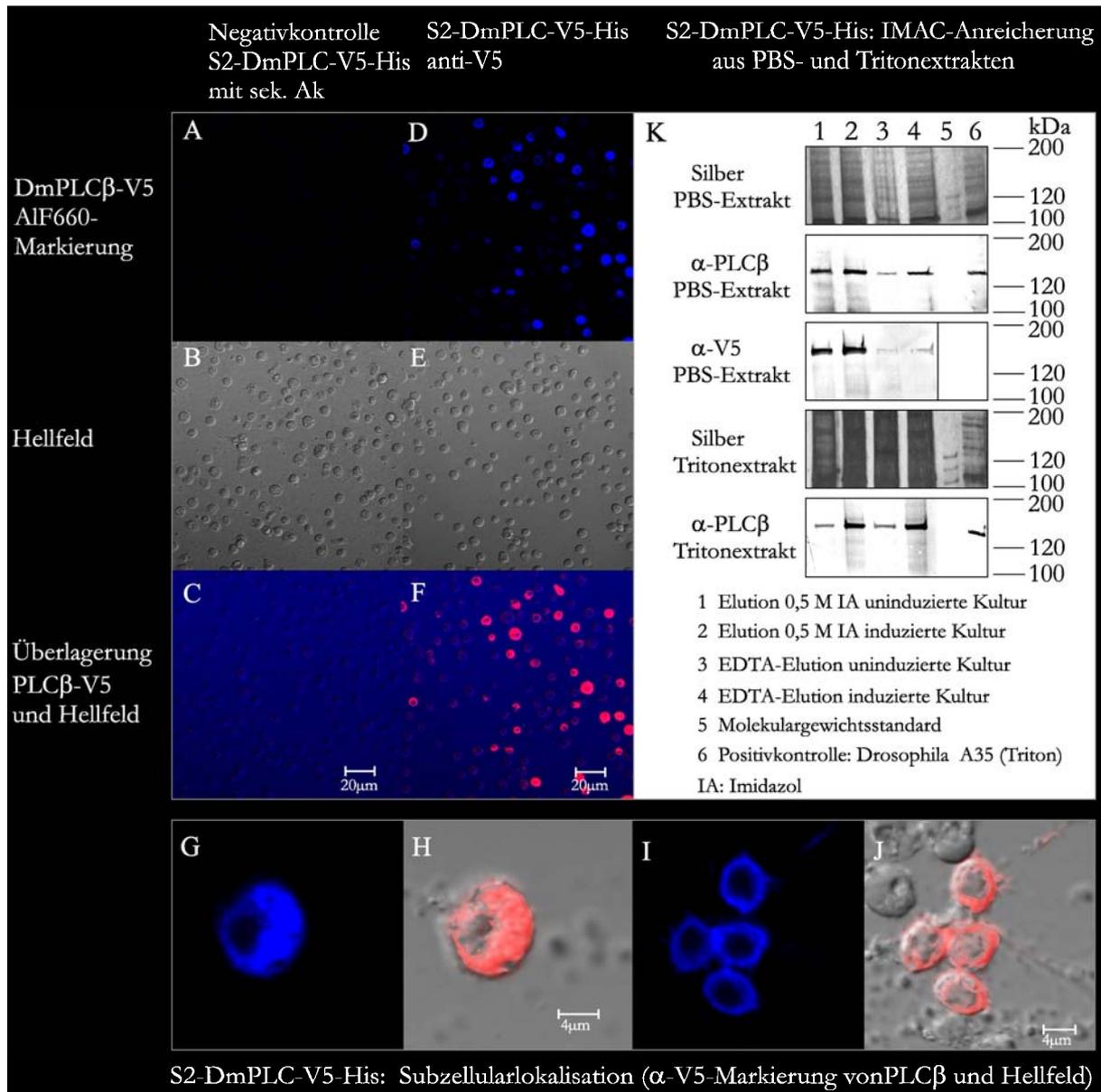


Abbildung 4.10: Expression von Drosophila-PLCβ in S2-DmPLC-V5-His

Die immunocytochemische Detektion von rDmPLCβ-V5-His via V5-tag und die Verteilung des Expressionsproduktes innerhalb der S2-Zellen sind in A–J dargestellt (LSM-Aufnahmen, Hellfeld: Differenzieller Interferenzkontrast, sek. Ak: sekundärer Antikörper). Mittels IMAC (Protokoll siehe 3.6.6) kann das rekombinante Expressionsprodukt angereichert werden. Die verschiedenen Elutionen der IMAC-Reinigung sowohl aus Triton- als auch aus PBS-Extrakten sind im Abbildungsteil K zusammengefasst. Die Western Blot Analyse der Aufreinigung aus expressionsinduzierten und uninduzierten Zellen belegt biochemisch das Vorhandensein von rDmPLCβ-V5-His, zeigt darüber hinaus aber auch die *leakage expression* der Metallothioninpromotor-gesteuerten rekombinanten Expression.

pMT/DmINAD-EGFP weisen eine weitere Eigenart auf: unabhängig vom verwendeten Extraktionspuffer wird immer mehr als ein Expressionsprodukt immunologisch markiert, ein Phänomen, dass ebenso für rDmTRPL-EGFP beobachtet wird (Referenz z.B. Abbildung 4.6) und offensichtlich für die fusionierte EGFP-Expression charakteristisch ist.

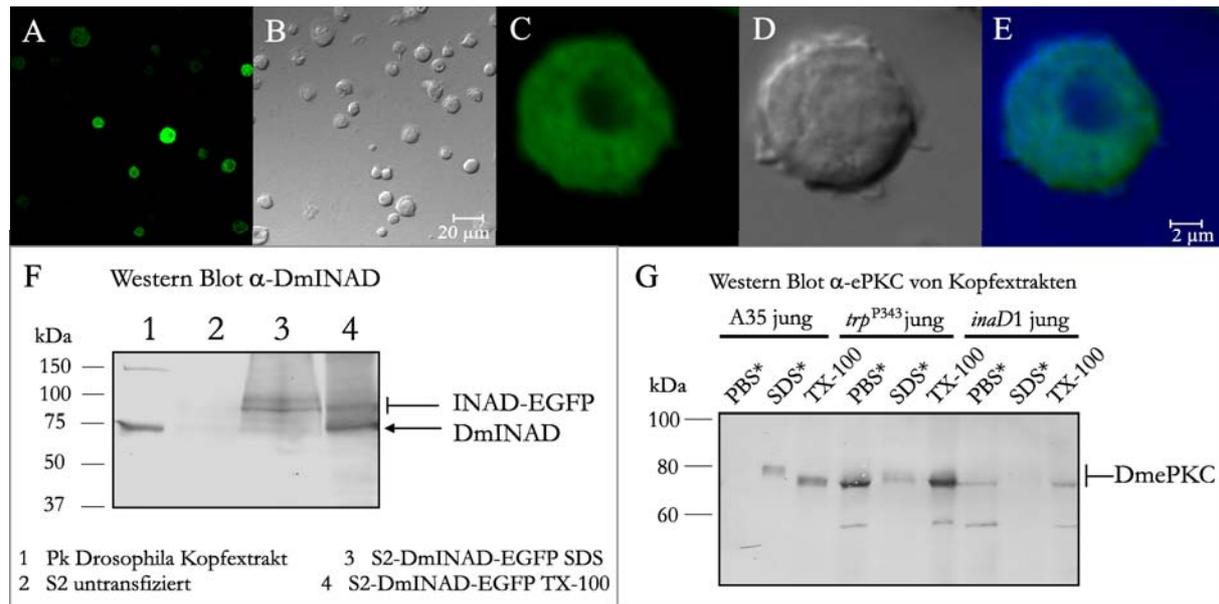


Abbildung 4.11: Singuläre rekombinante Expression von Signalkomplexkomponenten: Detektion von rDmINAD-EGFP in S2-DmINAD-EGFP

Die fluoreszenzmikroskopische Detektion von rDmINAD-EGFP sowie die Subzellulärlokalisierung im gesamten Cytoplasmaabereich sind unter A–E (A, C: EGFP-Fluoreszenz; B, C: DIC; E: Überlagerungsbild) dargestellt. Der biochemische Nachweis von rDmINAD-EGFP in Zellextrakten durch Western Blot Analysen (F) zeigt mehrere Expressionsprodukte (rDmINAD-EGFP sowie stabilere Translationszwischenstufen oder Abbauprodukte), deren jeweiliges apparentes Molekulargewicht in Abhängigkeit vom Extraktionsdetergenz differiert (Pk: Positivkontrolle, TX-100: Triton X-100). Extraktionsanalysen von DmePKC, isoliert aus Köpfen von *D. melanogaster*, belegen eine allgemeinere Gültigkeit des Phänomens differierender apparter Molekulargewichte in Abhängigkeit vom Extraktionspuffer (G, *: SDS-Solubilisierung von Membranen pelletiert nach der PBS-Extraktion).

Die Extraktion aus S2-Zellen erfolgt aus Zellen mit kontinuierlich induzierter Expression. Somit werden neben vollständig translatierten rekombinanten Proteinen ebenso alle Zwischenstufen extrahiert. Eine mögliche Erklärung der verschiedenen Expressionsprodukte ist die Anreicherung distinkter Zwischenprodukte der Translation EGFP-fusionierter Sequenzen in S2-Zellen, eventuell in Abhängigkeit der veränderten *codon-usage* von EGFP. Andererseits sind ebenfalls diskrete Abbauprodukte vorstellbar.

Für rDmINAD-EGFP belegt die detektierte EGFP-Fluoreszenz die vollständige INAD-Expression aufgrund der C-terminalen Fusion von EGFP. Für rDmePKC dagegen kann die vollständige Expression des ePKC-Konstruktes weder durch Immunoblot noch durch Immuncytochemie bestätigt werden. Das Molekulargewicht des detektierten rekombinanten Proteins in S2-Zellen erinnert an das abweichende Molekulargewicht bei *in vitro*-Translation des vollständigen cDNA-Klons (siehe Abbildung 4.2). Ob das differierende Molekulargewicht von rDmePKC auf fehlenden posttranslationalen Modifikationen oder einem raschen Abbau beruht, konnte nicht identifiziert werden.

Rekombinant exprimiertes DmTRP ist bei Tritonextraktion nicht nachweisbar, obwohl SDS-Extraktion der gleichen Zelllinie die heterologe TRP-Expression anzeigt. Ein analoges

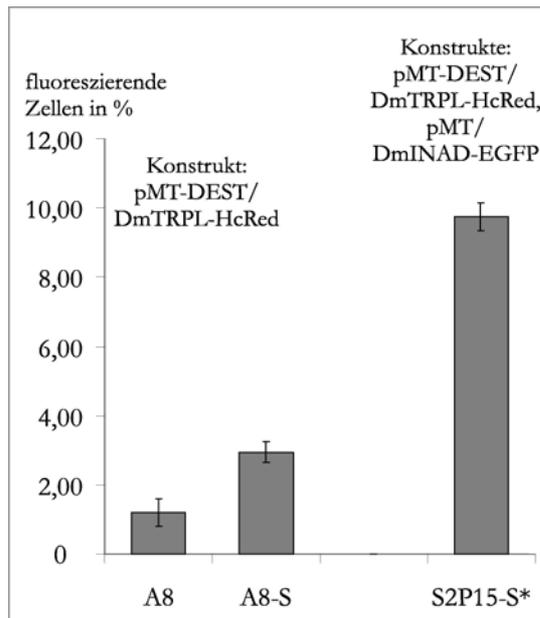
Verhalten zeigt das Membranprotein rDmTRPL-EGFP (siehe Abbildung 4.36). Die lösliche rDmePKC ist ebenfalls nur schwer in TX-100-Extrakten nachweisbar, was im Falle von ePKC jedoch auf die höhere Instabilität des Enzyms unter unvollständig-denaturierenden Extraktionsbedingungen zurückzuführen ist.

Analysen der subzellulären Verteilung der rekombinanten Expressionsprodukte zeigen in immunocytochemischen Dokumentationen für alle vier exprimierten Komponenten ein ähnliches Muster: die rekombinanten Signalkomplexproteine weisen eine gleichmäßige Verteilung innerhalb des Cytoplasmas auf. Die Muster erlauben keine Korrelation lokaler Anreicherungen mit Subzellularstrukturen und damit keine Aussage beispielsweise über Anreicherung von TRP in der Plasmamembran. Versuche zur Detektion von rDmTRP in der S2-Plasmamembran durch Antikörper, die an extrazelluläre Schleifen binden, scheiterten an der niedrigen Antigenizität der in Anlehnung an JUNGNICHEL *et al.*, 2001 ausgewählten Extrazellulärbereiche von DmTRP und DmTRPL (Daten nicht gezeigt). Keines der analysierten rekombinanten Proteine weist eine Kernlokalisation auf.

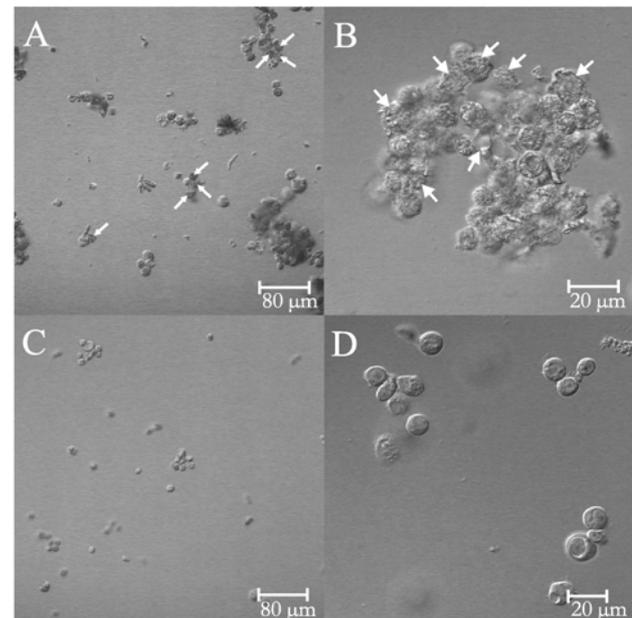
4.4.3 Optimierung von Transfektion und Expressionsraten

Voraussetzung für die rekombinante Co-Expression der vier INAD-Kernkomplexkomponenten ist die effiziente Etablierung rekombinant exprimierender S2-Linien sowie die Reproduzierbarkeit der rekombinanten Expression für Charakterisierungen. Als beeinflussende Parameter der induzierbaren rekombinanten Expression wurden die Kultivierungsbedingungen vor und während der Expressionsinduktion (Abbildung A.16) sowie die Stärke der Expressionsinduktion bestimmt (Abbildung A.15). Optimal ist die Induktion einer Kultur, die ca. 10–14 Tage im logarithmischen Wachstum gehalten wurde, mit $750 \mu\text{M}$ CuSO_4 für zwei Tage. Es gelang nicht, die Effizienz CaPO_4 -vermittelter Transfektion durch Variation verschiedener Transfektionsparameter (Zellzahl, Oberflächenverhältnis, DNA-Menge und -Reinheit) reproduzierbar über 10 % zu erhöhen.

Das aus hoher Letalität von S2-Zellen während und kurz nach CaPO_4 -Transfektionen resultierende starke Absinken der Zelldichte sowie die Veränderungen der Medienzusammensetzung (starke Kristallpräzipitation auch nach Entfernung von CaPO_4 -haltigem Medium) führen oft zum Absterben des gesamten Transfektionsansatzes. Sowohl Lipofektion als auch der Einsatz kationischer Polymere zur Vermittlung von nicht-viraler DNA-Einbringung in Zellen ist für S2-Kulturen kaum charakterisiert beziehungsweise als ineffizienter im Vergleich zur CaPO_4 -vermittelten Transfektion beschrieben. Lipofektionsversuche (Lipofectin: Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe; Insectogen und Metafectene: Fa. Biontix Laboratories, München) von S2- und S2P15-Zellen, optimiert nach den Angaben des Herstellers der jeweiligen Reagenz, bestätigen mit Transfektionsraten unter 1 % die allgemeine Ineffizienz der S2-Zelltransfektion mittels kationischer Reagentien nach üblichen Transfektionsprotokollen (Daten nicht gezeigt). Gleiches gilt für die Analyse der S2-Transfektionspotenz des polykationischen Polymers jetPEI (Fa. Polyplus transfection SAS BP, Illkirch, Frankreich). Durch Generierung von Linien S2-S kann-



(a) Wirkung serumfreier Kultivierung auf die Lipofektionseffizienz von Lipofectin
 Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Zählungen pro Transfektionsansatz (* EGFP-Fluoreszenz, für A8 und A8-S HcRed-Fluoreszenz). -S kennzeichnet die Kultivierung von Zellen unter serumfreien Bedingungen.



(b) Lichtmikroskopische Dokumentation der Letalität von Posttransfektionskulturen
 Einen Tag nach der Transfektionsprozedur wurden Zellen einer CaPO_4 :DNA-Präzipitation (A, B) und einer Lipofektionsreaktion (C, D) lichtmikroskopisch im differentiellen Interferenzkontrast dokumentiert. Die Pfeile markieren sterbende und tote Zellen.

Abbildung 4.12: Dokumentation ausgewählter Parameter mit Einfluss auf die Etablierung stabil transfizierter S2-Linien

te die Lipofektionseffizienz deutlich erhöht werden. Dazu werden S2-Zellen über einige Passagen hinweg unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Nach mehreren Passagen in Medium ohne FCS-Zusatz können die Zellen der Linie S2-S für Lipofektionen verwendet werden. Am Beispiel der erneuten Transfektion der bereits stabil transfizierten Linie A8 belegt die Abbildung 4.4.3 (links) die positive Wirkung serumfreier Kultivierung zur Erhöhung der Transfektionseffizienz. Lipofektionsinhibierende Serumbestandteile werden effizienter entfernt als bei allgemein üblichem Waschen der Zellen in serumfreiem Medium vor der Lipofektion. Serumfrei kultivierte S2-Zellen ermöglichen eine Lipofektionseffizienz mit Lipofectin (Fa. Invitrogen life technologies, Karlsruhe) von ca. 10 %, wie eine Kontrolltransfektion mit S2P15-S-Zellen zum Lipofektionsexperiment der Linie A8 zeigt. Im Kontrast zur hohen Letalität CaPO_4 -basierter Transfektionen ermöglicht die sehr schonende Lipofektion (vergleichende lichtmikroskopische Analysen in Abbildung 4.4.3 rechts) von S2-Zellen eine zuverlässige und effiziente Etablierung stabil transfizierter Linien. Die zweifach unabhängige Generierung von Linien INAD-Komplex durch Lipofektion in Kapitel 4.5.1 belegt dies exemplarisch.

4.4.4 Duale Co-Expression von Komplexkomponenten

Ziel dieser Arbeit ist die Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob die gemeinsame Expression von zwei INAD-Komplexkomponenten möglich ist. Ausgewählt wurden DmePKC und DmPLC β . Die CDS von PLC β ist in Fusion mit einem tag aus dem V5-Epitop und Hexahistidin kloniert, was die Nachweis- und Differenzierungsmöglichkeiten (vor allem immunocytochemisch) begünstigt. Die Abbildung 4.13 gibt eine Zusammenfassung der biochemischen und immunocytoologischen Analysen der Linie S2-DmePKC/DmPLC β . Die gemeinsame Expression beider Komponenten in S2-Zellen ist nachweisbar (Western Blot: A, B, Immunocytochemie: C). Die in S2-Zellen exprimierte rDmePKC liegt in einer Form vor, die ein vom Fliegenwildtyp abweichendes Laufverhalten in SDS-PAGEs aufweist: rDmePKC ist um wenige Dalton kleiner (4.13 A). Diese Form entspricht einer von zwei detektier-

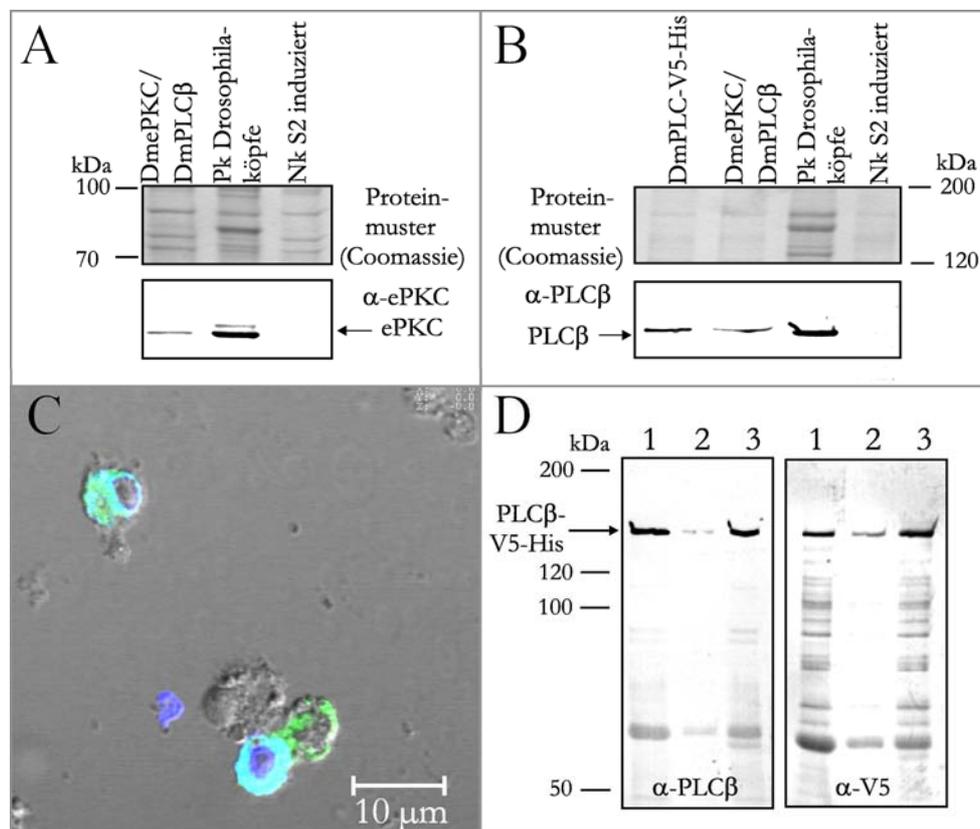


Abbildung 4.13: Duale Co-Expression von rDmePKC und rDmPLC β -V5-His

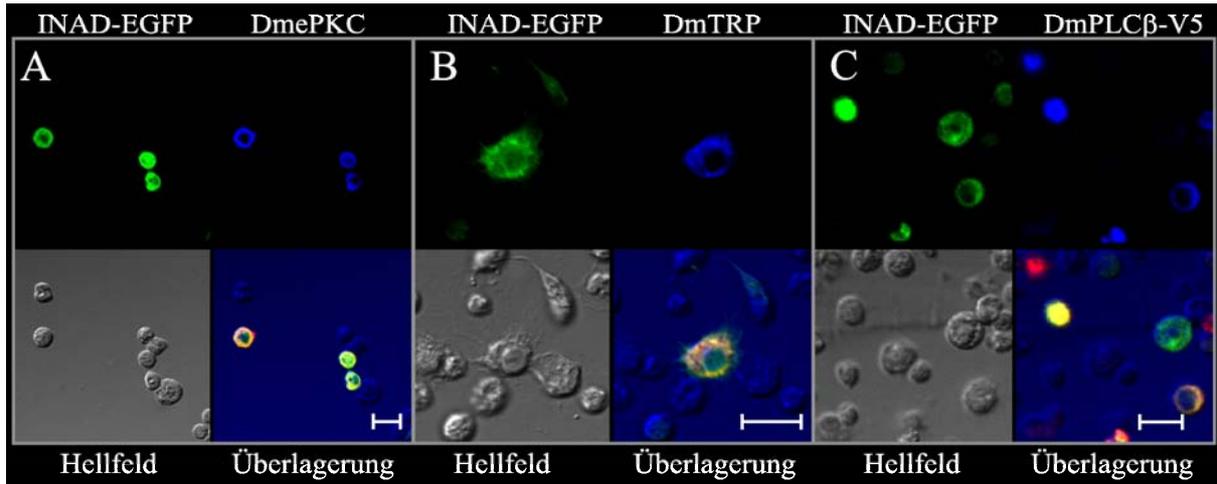
A und B zeigen die Immunodetektion von rDmPLC β und rDmePKC in Tritonextrakten aus S2-DmePKC/DmPLC β -Zellen. C enthält die immunocytochemisch nachgewiesene Lokalisation von rDmPLC β -V5 (α -V5, α -mouse-A1F488: grün) und rDmePKC (α -ePKC, α -rabbit-TRITC: blau, Co-Lokalisation: türkis). In D sind Immunpräzipitationsexperimente (IP) aus S2-DmePKC/DmPLC β mit anti-V5 zusammengestellt. Die Spuren sind wie folgt beladen: 1) IP 200 μ g Gesamtprotein / 2 μ g anti-V5, 2) IP 50 μ g Gesamtprotein / 0,5 μ g anti-V5 und 3) IP (LV) 250 μ g Gesamtprotein / 1 μ g anti-V5 (LV: Lysatvorreinigung (Senkung unspezifischer Bindung) durch IP mit α -clathrin (monoklonal Maus)). Durch α -V5 und α -DmPLC β kann rDmPLC β -V5-His angereichert im Immunpräzipitat detektiert werden. Pk, Nk: Positiv-, Negativkontrolle

baren Formen in Köpfen/Augen von *D. melanogaster*. Die Immunocytochemie zeigt, dass die beiden Konstrukte pMT/DmePKC und pMT/DmnrpA-V5-His in einer Zelle mit überlappendem Verteilungsmuster co-exprimiert werden. Eine Interaktion der Proteine kann jedoch nicht abgeleitet werden. Die immunocytochemischen Daten deuten darüber hinaus auch die singuläre Expression einer Komponente in verschiedenen Zellen der polyklonalen Linie an. Die rekombinante PLC β lässt sich mittels V5-Antikörper immunpräzipitieren, wie der Western Blot Nachweis sowohl mit α -V5 als auch α -DmPLC β zeigt (Abbildung 4.13 D). Die biochemisch und immunocytochemisch verifizierte Co-Expression von rDmePKC und rDmPLC β -V5-His zeigt, dass mehrere Konstrukte gleichzeitig in denselben S2-Zellen exprimiert werden können.

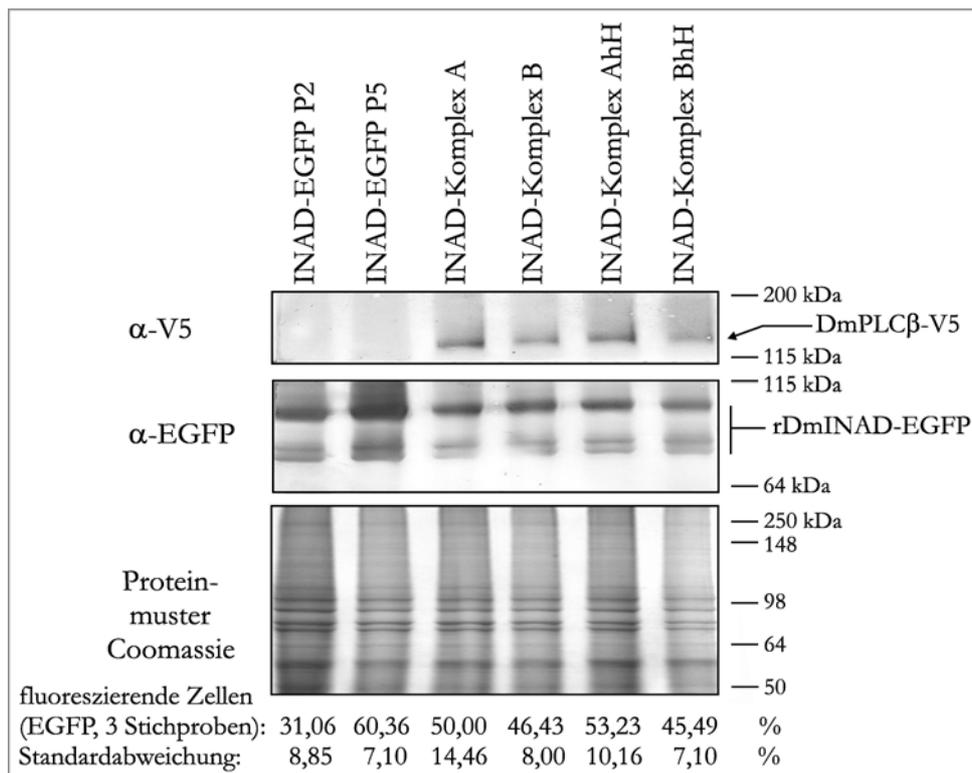
4.5 Rekombinante Expression des INAD-Signalkomplexes in S2-Zellen

4.5.1 Generierung und Charakterisierung polyklonaler INAD-Komplex-Linien

Die Verifizierung der rekombinanten Co-Expression von DmePKC und DmPLC β resultierte in der Co-Transfektion aller vier Hauptkomponenten des INAD-Komplexes von *D. melanogaster* in S2-Zellen. Die Konstrukte wurden im gleichen molaren Verhältnis zueinander mittels Lipofektion in eine der im Rahmen dieser Arbeit generierten Linien S2-S eingebracht. Das Verhältnis Expressionskonstrukte zu Selektionsplasmid pCoHygro betrug 1:10. Pro Ansatz (A, B) wurden je 8×10^6 Zellen mit $8 \mu\text{g}$ DNA-Konstruktmischung transfiziert. Die Expressionsinduktion mit $750 \mu\text{M}$ CuSO $_4$ am Folgetag der Transfektion ergab nach zweitägiger Induktion eine INAD-EGFP-Expressionsrate und damit Transfektionseffizienz von $12,43 \% \pm 3,66 \%$ für den Ansatz A sowie $12,79 \% \pm 2,11 \%$ für die Lipofektion B. Die Mittelwerte ergeben sich aus der Auszählung von drei zufällig ausgewählten Bereichen der Proben (rDmINAD-EGFP-exprimierende Zellen bezogen auf Gesamtzellzahl). Durch parallele Transfektion entstanden zwei unabhängige polyklonale stabil transfizierte Linien: INAD-Komplex A und INAD-Komplex B (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]). Nach zweiwöchiger Selektion wurden beide Kulturen geteilt und die entstandenen vier Subkulturen differierenden Selektionsbedingungen unterzogen. Die Selektion der Kulturen A und B erfolgte weiterhin nach dem Standardprotokoll. Durch Selektion der verbliebenen beiden Subkulturen mit der zweifachen Hygromycin B-Konzentration wurden die Linien INAD-Komplex AhH und BhH generiert. Die Analyse der Expressionsrate der Kulturen, gemessen als Anteil INAD-EGFP-exprimierende Zellen pro Gesamtzellzahl, zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen selektierten Kulturen (Tabelle 4.2). Die immunocytochemischen Analysen zum Nachweis der rekombinanten Expressionsprodukte DmTRP, DmePKC und DmPLC β -V5 sowie die Fluoreszenz von rDmINAD-EGFP zeigen die Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes im Cy-



(a) Immunocytochemische Detektion der rekombinant exprimierten INAD-Komplexkomponenten. Die Expressionsprodukte rDmePKC, rDmTRP, rDmPLC β -V5 wurden nach Erkennung durch α -Cv-ePKC, α -DmTRP und α -V5 mit Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpern markiert (blau, in der Überlagerung rot). Rekombinant exprimiertes DmINAD-EGFP fluoresziert grün. Maßstab: 10 μ m



(b) Rekombinante Hauptkomponenten des INAD-Komplexes: Immunoblot-Detektion. Durch Western Blot Analysen wird in Tritonextrakten (4 μ l je Spur) verschiedener polyklonaler Linien INAD-Komplex (A, AhH, B, BhH) die rekombinante Expression von rDmINAD-EGFP und rDmPLC β -V5 dokumentiert. Die Linien INAD-EGFP P2 und P5 dienen als Positivkontrolle für rDmINAD-EGFP-Expression und als Negativkontrolle für die Expression von rDmPLC β -V5.

Abbildung 4.14: Nachweis rekombinanter Co-Expression der Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes in stabilen polyklonalen Linien INAD-Komplex

toplasma der S2-Zellen (Abbildung 4.14 a). Sie deuten auf eine Co-Lokalisation der rekombinanten Proteine hin. Unklar bleibt, ob die Plasmamembran in die Lokalisation involviert ist. Veränderungen des subzellulären Verteilungsmusters einzelner Komponenten im Vergleich zur singulären Expression in Abhängigkeit von co-exprimierten Proteinen können nicht nachgewiesen werden (Referenzen: Abbildungen 4.8–4.11). Die Auswertung immuncytochemischer Daten der Linien INAD-Komplex A, B, AhH und BhH wird durch die Polyklonalität der Linien erheblich behindert. Neben der beobachteten Zellzyklus-abhängigen Schwankung der Expressivität läßt sich ebenso die Penetranz der rekombinanten Co-Expression aller Komponenten innerhalb der Kulturen nicht bestimmen. Damit ist die Ableitung genereller Aussagen nur in begrenztem Umfang möglich.

Tabelle 4.2: Expressionsraten nach differenzierter Hygromycin B Selektion von stabil transfizierten S2-Linien INAD-Komplex

Linie INAD-Komplex	EGFP-fluoreszierende Zellen (Mittelwert n=3)	Standardabweichung
A	50,00 %	14,46 %
B	46,43 %	8,00 %
AhH	53,23 %	10,16 %
BhH	45,49 %	16,59 %

In Extrakten aus Zellen der polyklonalen Linien INAD-Komplex wird durch Western Blot die Expression von rDmPLC β -V5-His und rDmINAD-EGFP verifiziert (Bild 4.14 b). Die spezifische Erkennung von rDmPLC β -V5-His via α -V5 ist durch Vergleich mit reinen INAD-EGFP-Linien gegeben. Die Detektion, besonders der Expressionsprodukte rDm-TRP sowie rDmPKC, erwies sich jedoch als schwer reproduzierbar, ein eindeutiger Nachweis ist nicht möglich. Die Eignung von S2-Zellen zur Co-Expression der vier Kernkomponenten des *D. melanogaster*-INAD-Komplexes belegen vor allem die immuncytochemischen Daten. Diese deuten jedoch an, dass nicht alle Zellen vier Konstrukte co-exprimieren.

4.5.2 Selektion monoklonaler Linien

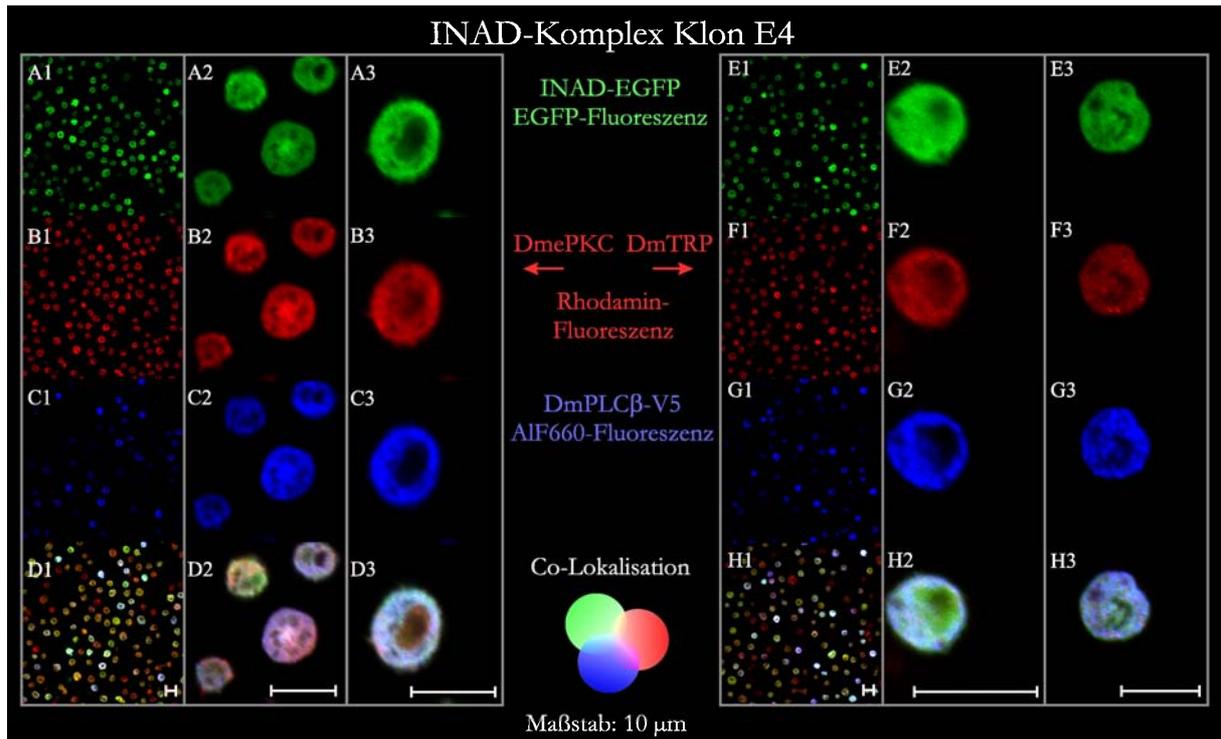
Die schwere Reproduzierbarkeit von Ergebnissen polyklonaler Linien INAD-Komplex einerseits sowie die fehlende Homogenität der stabil selektierten Kultur zum anderen verhindern die Analyse der Kulturen mittels Verfahren, die individuelle S2-Zellen ansprechen. Dazu zählen vor allem immuncytochemische Lokalisationen und elektrophysiologische Ableitungen. Durch die Vereinzelung von Zellen einer Linie und separate Kultivierung dieser Zellklone ist die Generierung klonaler Zelllinien möglich (klonale Selektion). S2-Zellen, deren minimale Kulturdichte $0,5 \times 10^6$ beträgt, benötigen während der klonalen Selektion die Supplementierung mit weiteren S2-Zellen als *feeder layer*. Diese werden im Laufe der

Expansion des Ausgangszellklons durch Hygromycin B-Selektion sukzessiv aus der entstehenden klonbasierten Kultur entfernt. Kritischer Punkt der klonalen Selektion ist die initiale Verdünnung der zu selektierenden Kultur, um eine Vereinzelnung von Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit sicherzustellen. In allen dargestellten Selektionen klonaler S2-Linien erfolgte die Verdünnung der Kultur auf 100 Zellen / ml. Jeweils 10 μ l der verdünnten Kultur wurden pro Selektionsansatz einer Linie als Ausgangsmaterial zur Expansion von Zellklonen verwendet. Die Etablierungszeit klonaler Linien umfasst die vierwöchige Hygromycin B-Selektion zur sukzessiven Entfernung der S2-*feeder*-Zellen sowie die Expansion der 200 μ l-Selektionsansätze zu etablierten Linien im Verlauf weiterer vier Wochen. Anhang A.3 gibt einen Überblick aller erstellten klonalen Selektionen und dokumentiert den Verlauf der Vereinzelnungsprozesse. Am Ende des Selektionsprozesses und der Etablierung vorausgewählter Linien (Kriterium: EGFP-Fluoreszenzrate) erfolgte die Auswahl potentieller Linien für weiterführende Analysen durch biochemische Nachweisbarkeit der Expressionsprodukte aller transfizierten Konstrukte. Dieser Nachweis setzt ein Mindestniveau an Penetranz und Expressivität eines Konstruktes voraus und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit der Auswahl von Linien, die wie angestrebt einer stabil alle transfizierten Konstrukte exprimierenden Zelle entstammen (Monoklonalität).

4.5.3 Charakterisierung der monoklonalen S2-Linien INAD-Komplex

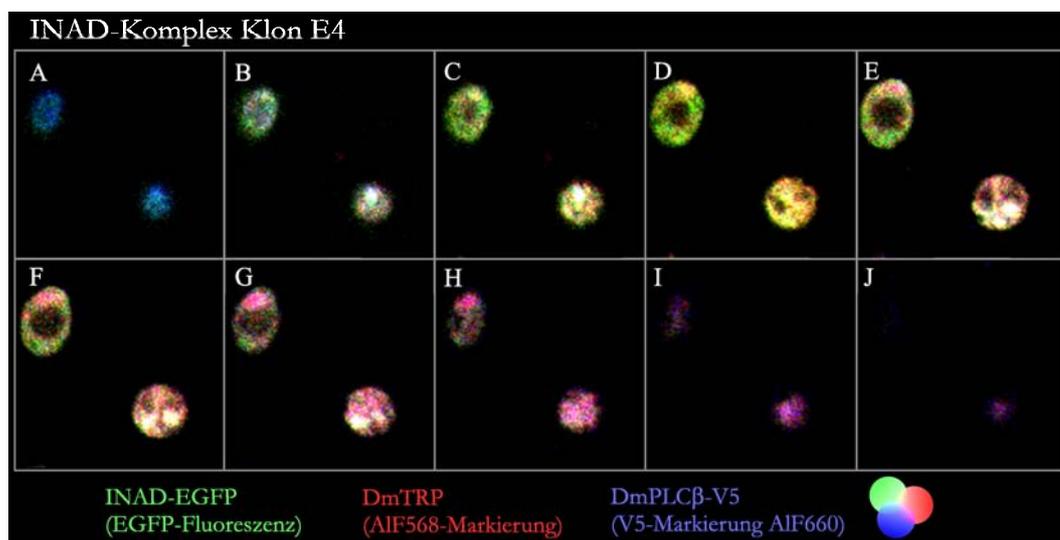
Die Generierung einer genetisch einheitlichen Zelllinie INAD-Komplex (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]) erfolgte aus der polyklonalen Linie INAD-Komplex B durch klonale Selektion (Selektionsprozess siehe auch 4.5.2). Primär wurden geeignete zellklonbasierte Linien nach homogener INAD-EGFP-Expression in allen lebenden Zellen ausgewählt. Die anschließende Analyse dieser Linien auf Expression aller vier Komplexkomponenten erfolgte sowohl immunocytochemisch als auch biochemisch durch Western Blot Analysen. Aufgrund der Kopplung der biochemischen Nachweisbarkeit rekombinanter Expressionsprodukte an Schwellenniveaus der Expression ermöglichten die biochemischen Untersuchungen darüber hinaus die Auswahl von Zellklonen mit einem Mindestexpressionsniveau aller vier INAD-Komplexkomponenten. Im Hinblick auf beabsichtigte Analysen einer Bildung rekombinanter INAD-Signalkomplexe ist die Auswahl von Linien, in denen keine extreme Unterrepräsentation einer Komponente die Komplexbildung limitiert, wünschenswert.

Die Linien INAD-Komplex E4 und A8, resultierend aus dem Selektionsprozess von zellklonbasierten Linien (siehe auch Anhang A.3), erfüllen alle erforderlichen Kriterien. Es werden alle Komplexkomponenten exprimiert und die EGFP-Signalrate beträgt 100 % der lebenden Zellen, wie wiederholte Bestimmungen verifizierten. Die Abbildungen 4.15 und A.7 charakterisieren die rekombinante Expression der Kultur E4 immunocytochemisch, die immunocytochemische Detektion und Lokalisation der rekombinant exprimierten Proteine in der Linie A8 dokumentiert die Abbildung 4.16. Diese Dokumentationen weisen für beide Linien die rekombinante Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkom-



(a) Immunocytochemischer Nachweis und subzelluläre Verteilung

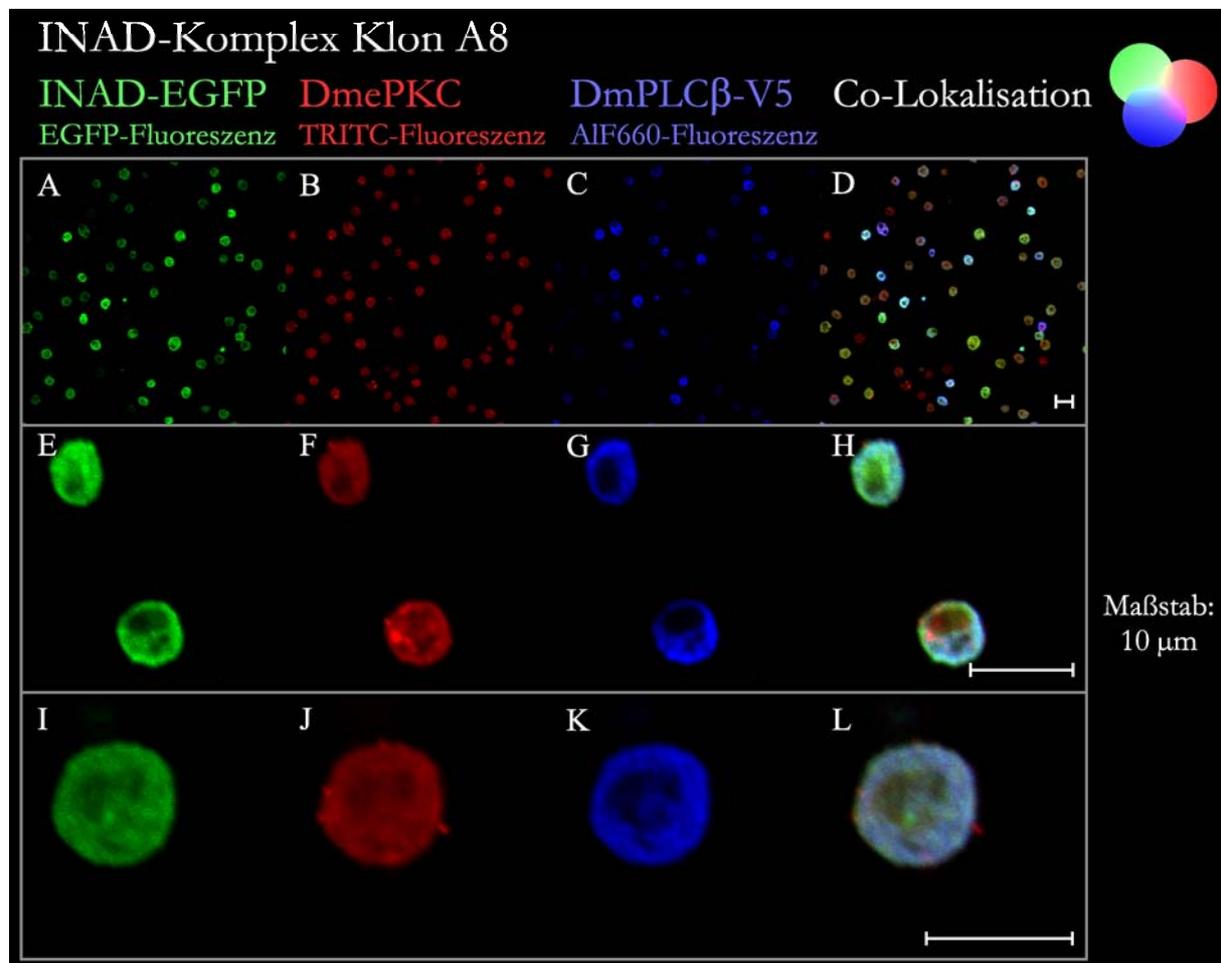
A1–A3 sowie E1–E3 dokumentieren rDmINAD-EGFP-Fluoreszenz. B1–B3 zeigen die Lokalisation von rDmPKC. Die immunocytochemische Markierung von rDmTRP zeigen die Abbildungsteile F1–F3. C1–C3 und G1–G3 weisen rDmPLCβ-V5 (Markierung durch α-V5) nach. D1–D3 belegen die Co-Lokalisation von rDmINAD-EGFP, rDmPKC und rDmPLCβ-V5-His und H1–H3 weisen Co-Lokalisation auch für INAD, TRP und PLCβ-V5-His nach.



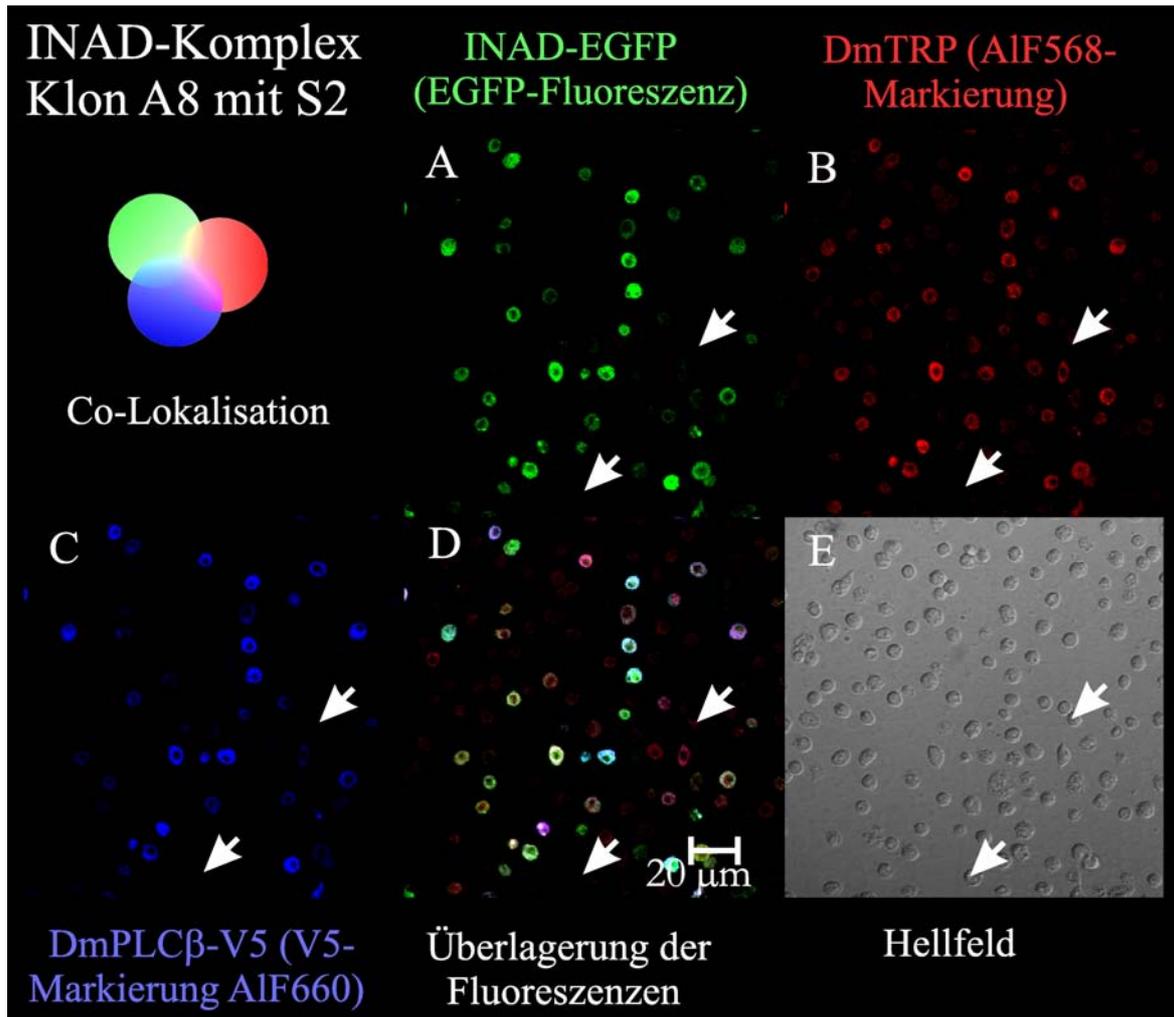
(b) Optische Querschnitte der Kultur INAD-Komplex Klon E4: die Co-Lokalisation zeigt in unterschiedlichen optischen Ebenen differierende Quantitäten der rekombinanten Expressionsprodukte.

Abbildung 4.15: Rekombinant exprimierte INAD-Signalkomplexkomponenten in INAD-Komplex Klon E4 (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC])

plexes nach. Problematisch für die Dokumentation immunocytochemischer Ergebnisse sind die zellzyklusabhängig deutlich variierende Expressivität sowie die geringe Größe der S2-Zellen. Insbesondere das Transmembranprotein DmTRP ist nur mit geringer Signalstärke markierbar. Geringe methodische Variationen zwischen einzelnen Proben resultieren bei Detektionen nahe am Hintergrundsignal in scheinbaren Unterschieden zwischen den Proben. Der Zusatz untransfizierter S2-Zellen als interne Negativkontrolle ermöglicht eine Feineinstellung der Negativschwellenwerte jeder einzelnen Probe und somit eine verstärkte Signaldokumentation (Abbildung A.7). Damit ist es möglich, Zellen mit geringer Expressivität von untransfizierten, nichtexprimierenden Zellen zu unterscheiden. In Übereinstimmung mit den Daten der polyklonalen Kultur sind rDmePKC, rDmPLC β -V5-His, rDmINAD-EGFP und rDmTRP im gesamten Cytoplasmabereich verteilt, wobei rDmTRP aufgrund seines Transmembrancharakters mutmaßlich gebunden an cytoplasmatische Membranen vorliegt. Die rekombinanten Expressionsprodukte co-lokalisieren, aller-



(a) Nachweis und Co-Lokalisation von rDmePKC, rDmINAD-EGFP sowie rDmPLC β -V5
A, E, I zeigen die Fluoreszenz von rDmINAD-EGFP. C, G, K weisen durch α -V5-Markierung rDmPLC β -V5 nach und B, F, J dokumentieren rDmePKC. D, H, L belegen die Co-Lokalisation von INAD, ePKC und PLC β -V5 in A8.



(b) Detektion und Co-Lokalisation von rDmTRP, rDmPLC β -V5 und rINAD-EGFP
 Konfokalmikroskopische Aufnahmen dokumentieren den immunocytochemischen Nachweis der rekombinanten Co-Expression von rDmINAD-EGFP (A), rDmTRP (B) und rDmPLC β -V5-His (C). Als interne Negativkontrolle erfolgte der Zusatz von S2-Zellen zu A8 zur Verifizierung schwach exprimierender Zellen. In A8 co-lokalisieren auch rDmTRP, rDmINAD-EGFP und rDmPLC β bei Co-Expression, wie die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (D) zeigt. E enthält die lichtmikroskopische Darstellung der Zellen (DIC). Die Pfeile markieren ausgewählte probeninterne Negativkontrollen.

Abbildung 4.16: Immunocytochemische Charakterisierung der rekombinanten Expressionsprodukte in INAD-Komplex Klon A8 (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC])

dings nicht ubiquitär in homogenen Quantitäten. Daraus resultiert ein inhomogenes Co-Lokalisationsmuster sowohl zwischen verschiedenen Zellen als auch innerhalb einer Zelle, wie optische Querschnitte durch die Kulturen S2-DmINAD-Komplex zeigen (Abbildung 4.15 b). Inwieweit die Plasmamembran in die Lokalisation der rekombinant exprimierten Proteine involviert ist, läßt sich aus den gewonnenen immunocytochemischen Daten nicht ableiten. Immunocytochemisch können keine von den singulären Expressionen der Komponenten abweichenden Lokalisationsmuster bedingt durch Protein-Protein-Assoziationen festgestellt werden.

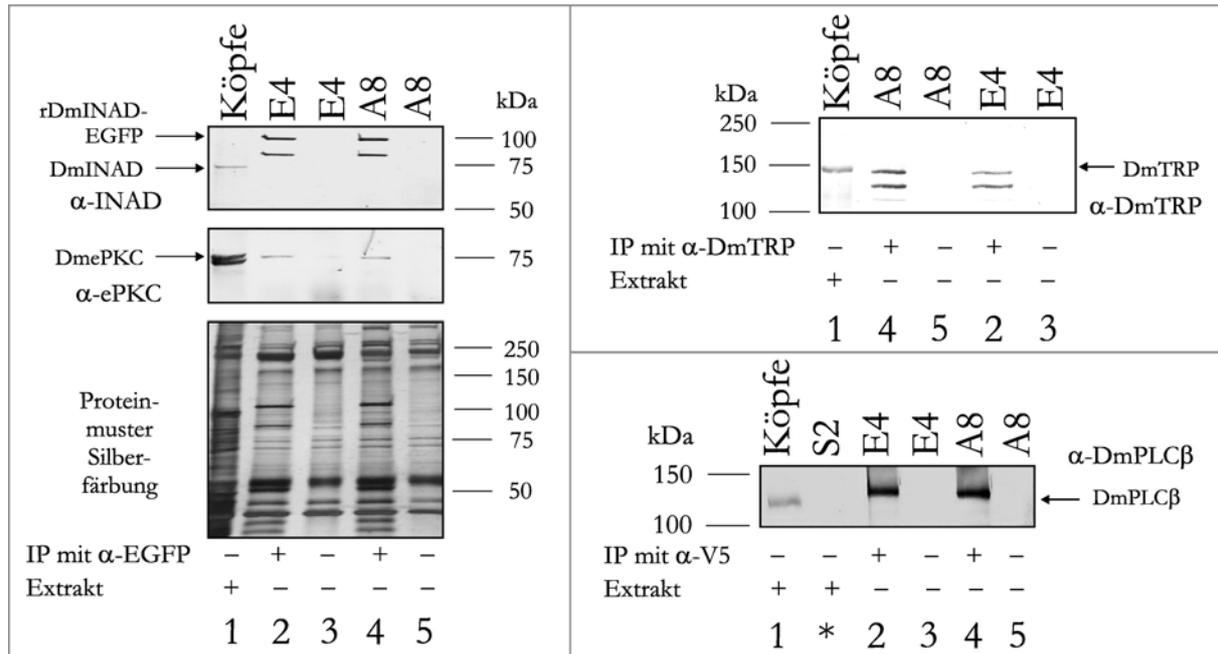


Abbildung 4.17: Biochemischer Nachweis der Co-Expression von rDmTRP, rDmINAD-EGFP, rDmePKC und rDmPLC β in den klonalen Linien INAD-Komplex E4 und A8. Die Western Blot Analysen zeigen als positive Kontrolle SDS-Extrakte aus Fliegenköpfen (Spur 1). Der Nachweis der rekombinanten Expressionsprodukte erfolgte durch Immunpräzipitationen (IP) mit den angegebenen Antikörpern. Als Präzipitationskontrollen für Spezifität erfolgte die Inkubation von Extraktaliquots mit der Präzipitationsmatrix ohne Antikörper (Spuren 3 und 5). Die Präzipitationen erfolgten aus Extrakten der Linie Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC] Klon E4 (Spuren 2 und 3) sowie Klon A8 (Spuren 4 und 5). Die Spur * enthält als Negativkontrolle Extrakt aus untransfizierten S2-Zellen.

Die rekombinante Co-Expression der Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes in den ausgewählten klonal selektierten Linien E4 und A8 wird verifiziert durch biochemische Experimente. Ausgewählte Beispiele sind in Abbildung 4.17 zusammengestellt. Die Experimente zur biochemischen Verifizierung der Co-Expression von rDmINAD-EGFP, rDmPLC β -V5-His, rDmePKC und rDmTRP zeigen die Grenzen des S2-Expressionssystems unter dem Metallothioninpromotor für die biochemische Nachweisbarkeit rekombinanter Co-Expressionsprodukte. Trotz der Generierung klonaler Linien war es im Gegensatz zu Linien mit singulärer oder dualer Expression von INAD-Komplexkomponenten nicht möglich, die rekombinante Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes in Western Blot Analysen von Extrakten deutlich und zweifelsfrei zu dokumentieren. Erst nach Anreicherung der Expressionsprodukte durch Immunpräzipitation ist die zweifelsfreie biochemische Dokumentation möglich.

Der Effekt sinkender Expressionsniveaus der einzelnen rekombinanten Produkte bei Co-Expression mehrerer Proteine unter dem gleichen Promotor ist in Abbildung 4.18 am Beispiel von rDmINAD-EGFP visualisiert. Diese Abbildung dokumentiert den Nachweis der EGFP-Fluoreszenz von rDmINAD-EGFP in E4 und A8 im Vergleich zu Klon a-H7 mit rekombinanter Co-Expression von drei Proteinen (Referenzen für a-H7 in Abschnitt 4.5.4).

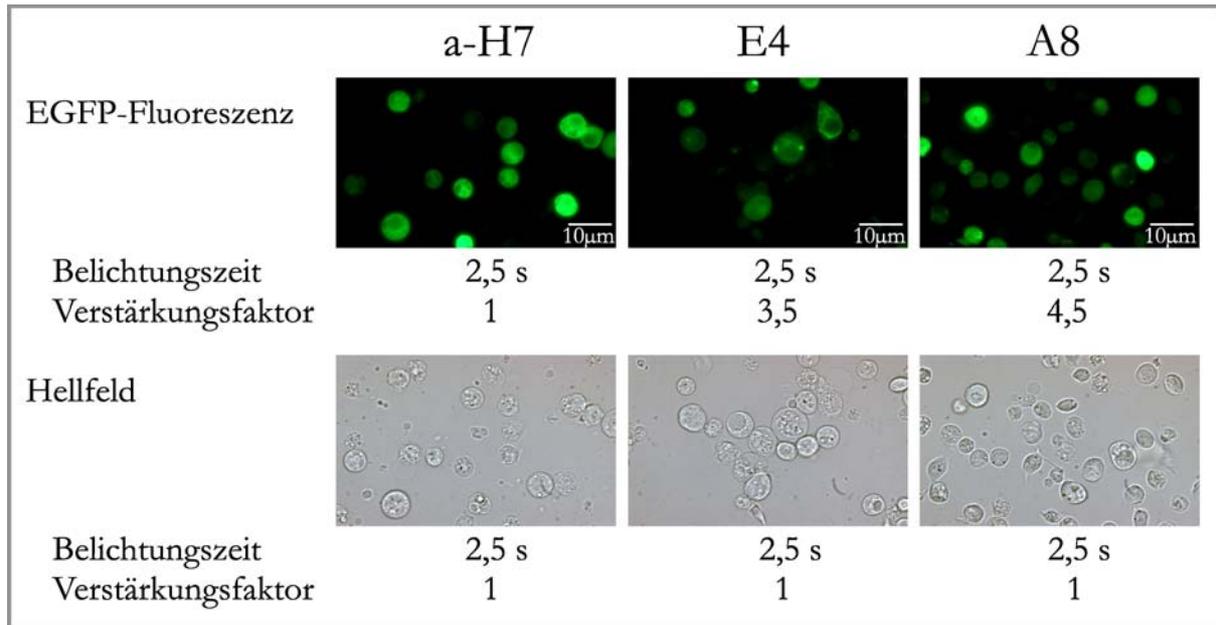


Abbildung 4.18: Absinken des Expressionsniveaus von rDmINAD-EGFP mit steigender Zahl an Co-Expressionsprodukten

Die klonal selektierten Linien E4 und A8 co-exprimieren die vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes, rDmINAD-EGFP, rDmTRP, rDmePKC und rDmPLC β -V5-His, rekombinant. Klon a-H7 der klonalen Selektion Komp[INAD;TRP;ePKC] co-exprimiert drei Proteine rekombinant: rDmINAD-EGFP, rDmTRP und rDmePKC (Referenzen in Abschnitt 4.5.4). Für eine adäquate Dokumentation der rDmINAD-EGFP-Fluoreszenz der dargestellten Linien ist eine Anpassung der Belichtungszeit und des Verstärkungsfaktors in Abhängigkeit der verwendeten Linie erforderlich.

Um ähnliche beziehungsweise identische Signalintensitäten dokumentieren zu können, ist im Vergleich zu a-H7 bei E4 und A8 bei gleichbleibender Belichtungszeit eine Verstärkung um den Faktor 3,5 bis 4,5 notwendig. Ein weiteres fluoreszenzmikroskopisches Beispiel dieses limitierenden Effekts ist im Zusammenhang mit der rekombinanten Co-Expression von DmTRPL im Rahmen dieser Arbeit dargestellt (siehe in Abschnitt 4.7.3, Abbildung 4.41). Die Auswirkungen auf biochemische Versuche zeigt die vergleichende Präzipitationsanalyse zweier S2-Linien mit Co-Expression von je drei Konstrukten im Vergleich zu A8 und E4 unter identischen Präzipitations- und Nachweisbedingungen in Abbildung 4.27. Im Gegensatz zu den Linien mit Co-Expression von drei Konstrukten ist bei α -DmTRP-Immunpräzipitation aus der gleichen Extraktmenge A8 und E4 rDmTRP im Präzipitat nicht detektierbar. Die erfolgreiche rekombinante Expression in den Linie A8 und E4 war zuvor anhand der rDmINAD-EGFP-Fluoreszenz überprüft worden.

Die Kenntnis des rekombinanten genetischen Hintergrundes jeder individuellen Zelle der monoklonalen Kulturen sowie die maximale Penetranz der rekombinanten Co-Expression qualifizieren die Kulturen A8 und E4 für die Gewinnung von Einblicken in die Signalkomplexbildung und in Funktionen des INAD-Signalkomplexes.

4.5.4 Klonal selektierte Linien mit Co-Expression mehrerer Komplexkomponenten: Basis der Etablierung von Teilkomplexen

Die Untersuchungen funktioneller Aspekte des INAD-Signalkomplexes erfordern, ebenso wie Analysen der Assemblierungsmechanismen, den Vergleich der Komplexsituation (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]) zu Referenzsituationen, in denen einzelne Komplexkomponenten fehlen. Die polyklonalen Linien INAD-Komplex-ePKC (synonym: Komp[INAD;TRP;PLC]), INAD-Komplex-TRP (Komp[INAD;ePKC;PLC]), INAD-Komplex-PLC β (Komp[INAD;TRP;ePKC]) sowie INAD-Komplex-INAD (Komp[ePKC;TRP;PLC]) entstanden durch Lipofektion von S2-S-Kulturen mit äquimolaren Mengen der Konstrukte kodierend für die entsprechenden Komplexkomponenten (nachzuschlagen unter 4.3.3). Die Co-Transfektion von pCoHygro im Verhältnis 1:10 ermöglichte die anschließende Selektion stabiler Linien mit Hygromycin B. Im besonderen für Experimente mit Einzelzellanalysen wurden die generierten Referenzlinien mit Co-Expression von je drei der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes klonal selektiert (Übersicht in Anhang A.3). Der primäre *Screen* erfolgte, wie für INAD-Komplex beschrieben, über rDmINAD-EGFP-Expression und den Anteil an EGFP-fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Eine Ausnahme hiervon stellt die Durchmusterung der Selektionen INAD-Komplex-INAD (Komp[ePKC;TRP;PLC]) dar. Aufgrund des Fehlens eines gekoppelt exprimierten Fluoreszenzmarkers war die biochemische Bewertung der Selektionslinien vorgesehen. Die erste Auswahl geeigneter Klone erfolgte durch Western Blot Analysen von SDS-Zellextrakten auf zweifach beladenen Gelen hinsichtlich der ePKC-Expression. Die rekombinante ePKC-Expression positiv getesteter oder fraglicher Linien wurde mit weiteren Western Blot Analysen überprüft.

In INAD-EGFP-monoklonalen beziehungsweise den ePKC-positiv getesteten Linien folgte dem primären *Screen* die Verifizierung der Co-Expression weiterer Komponenten durch Immunoblot und Immuncytochemie. Die Abbildungen 4.19–4.22 dokumentieren die Verifizierung der Expressionsprodukte co-transfizierter Konstrukte in den ausgewählten Klonen aller teilkomplexexprimierenden Linien. Bei der Bewertung der Penetranz der Expressionsprodukte innerhalb der dargestellten klonalen Linien sind die limitierenden Einflüsse der Immuncytochemie zu berücksichtigen: i) rDmTRP ist (besonders bei Co-Expression mehrerer rekombinanter Proteine) in immuncytochemischen Analysen mit α -DmTRP unabhängig vom sekundären Antikörper nur mit Signalstärken markierbar, die vielfach den Schwellenwert der Negativkontrolle nur minimal überschreiten und in der Dokumentation verloren gehen; ii) das Ausmaß der unspezifischen Bindungen des anti-ePKC-Serums reduziert die detektierbare Signalstärke erheblich.

Die subzellulären Lokalisationen der rekombinanten Expressionsprodukte in den ausgewählten klonalen Linien weisen weder zwischen den Linien mit Co-Expression mehrerer Komplexkomponenten noch im Vergleich zu Linien INAD-Komplex einen Unterschied auf. Es können keine spezifischen Muster identifiziert werden, die auf wechselseitig bedingte

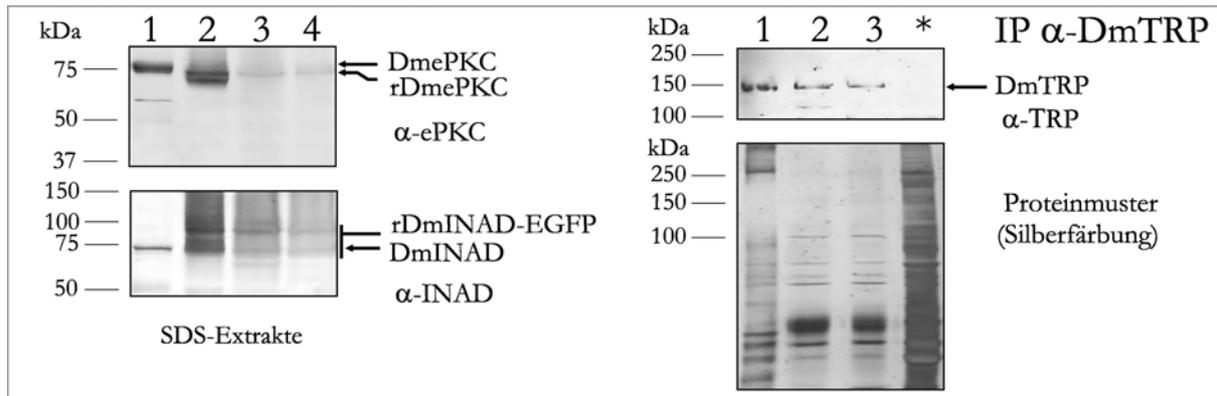
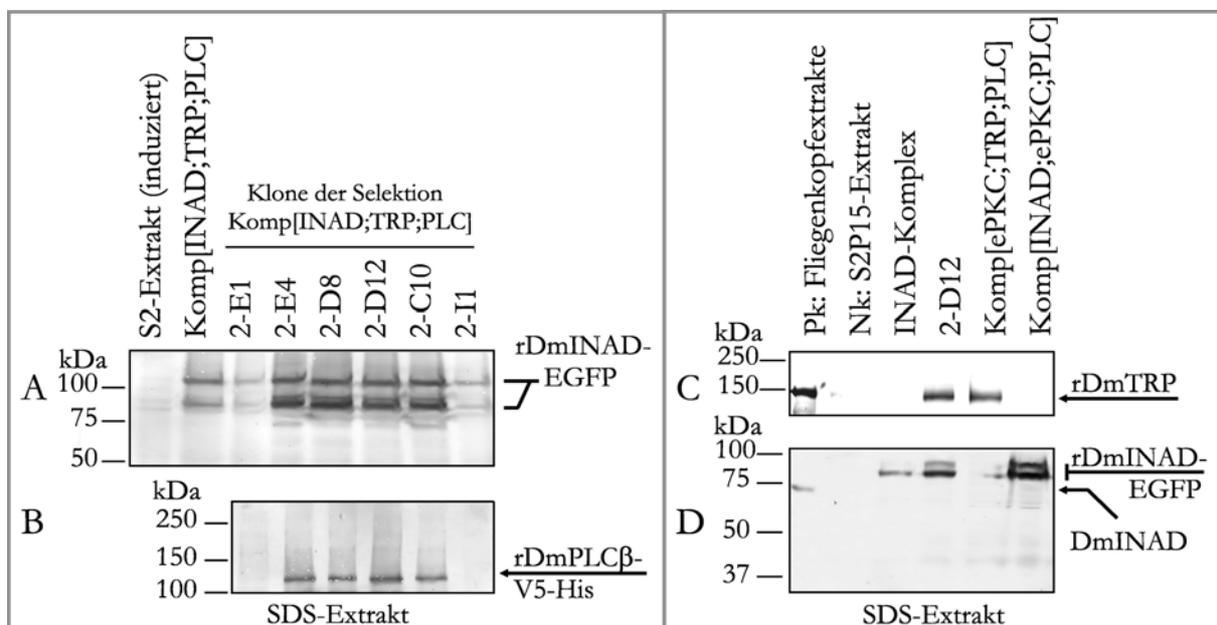


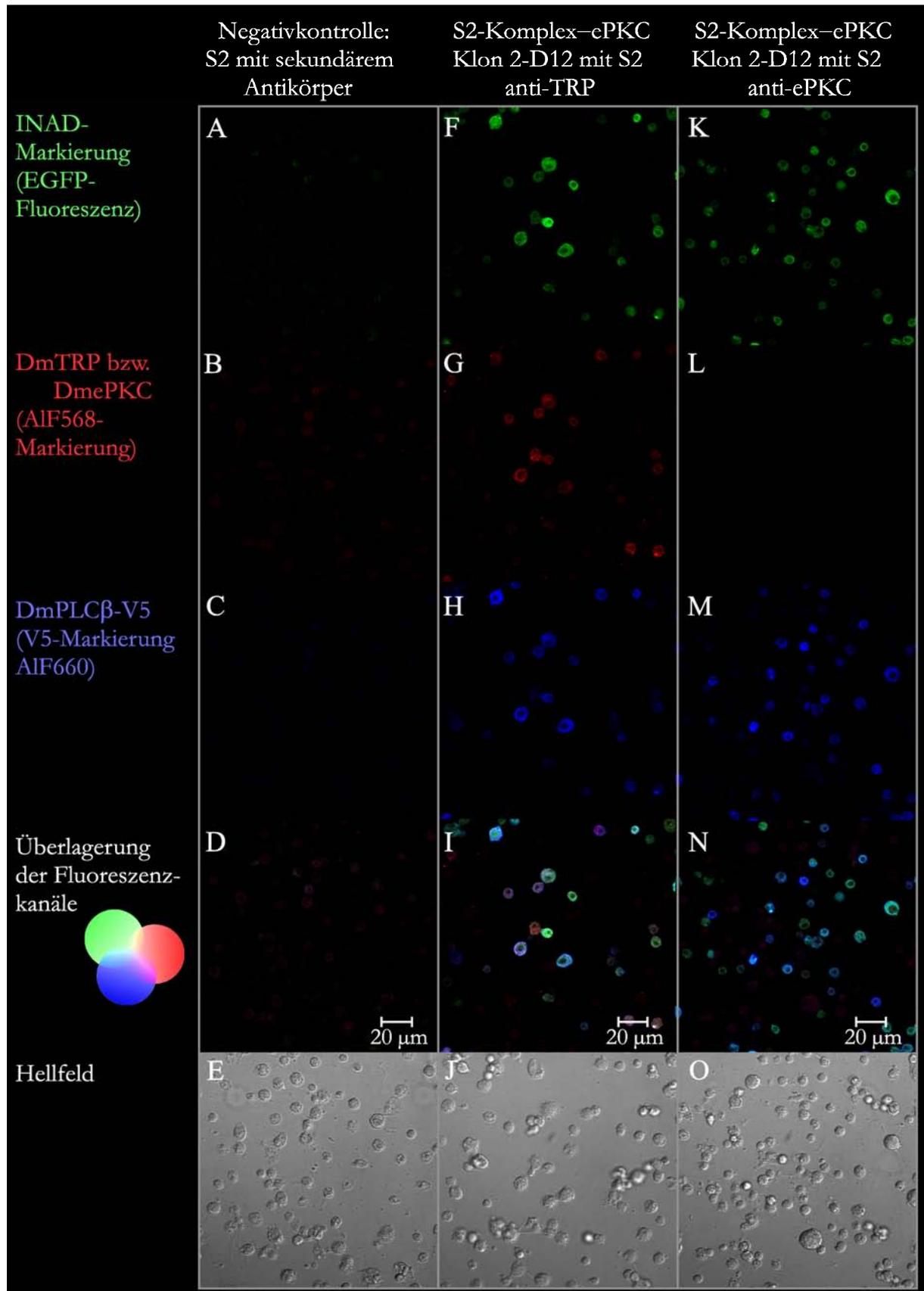
Abbildung 4.19: Nachweis der rekombinanten Expression der Komplexkomponenten rDmePKC, rDmTRP und rDmINAD-EGFP in selektierten Klonen Komp[INAD;TRP;ePKC]: Klon a-H5 (Spur 2) ist positiv für die Co-Expression der drei INAD-Signalkomplexkomponenten

Die Spuren der Western Blot Analysen von SDS-Extrakten und der α -DmTRP-Immunpräzipitaton sind beladen mit: 1) Positivkontrolle: Extrakt aus Drosophila-Köpfen, 2) S2-a Klon a-H5, 3) S2-a Klon a-H7 und 4) Positivkontrolle: Extrakt aus S2-Zellen mit stabiler Co-Expression mehrerer INAD-Komplexkomponenten. Klon a-H5 zeigt ein sehr hohes Niveau an rDmePKC-Expression verglichen mit der verwendeten Positivkontrolle und im Vergleich zu weiteren Linien. Die Spur * belegt die Spezifität der Immunpräzipitation für rDmTRP. Diese Negativkontrolle ist mit der α -DmTRP-IP aus S2-INAD-EGFP Klon A1 beladen (in Abwesenheit spezifisch erkannter und präzipitierter Proteine zeigt sich ein hohes Niveau an unspezifischer Adsorption des Zellextraktes).



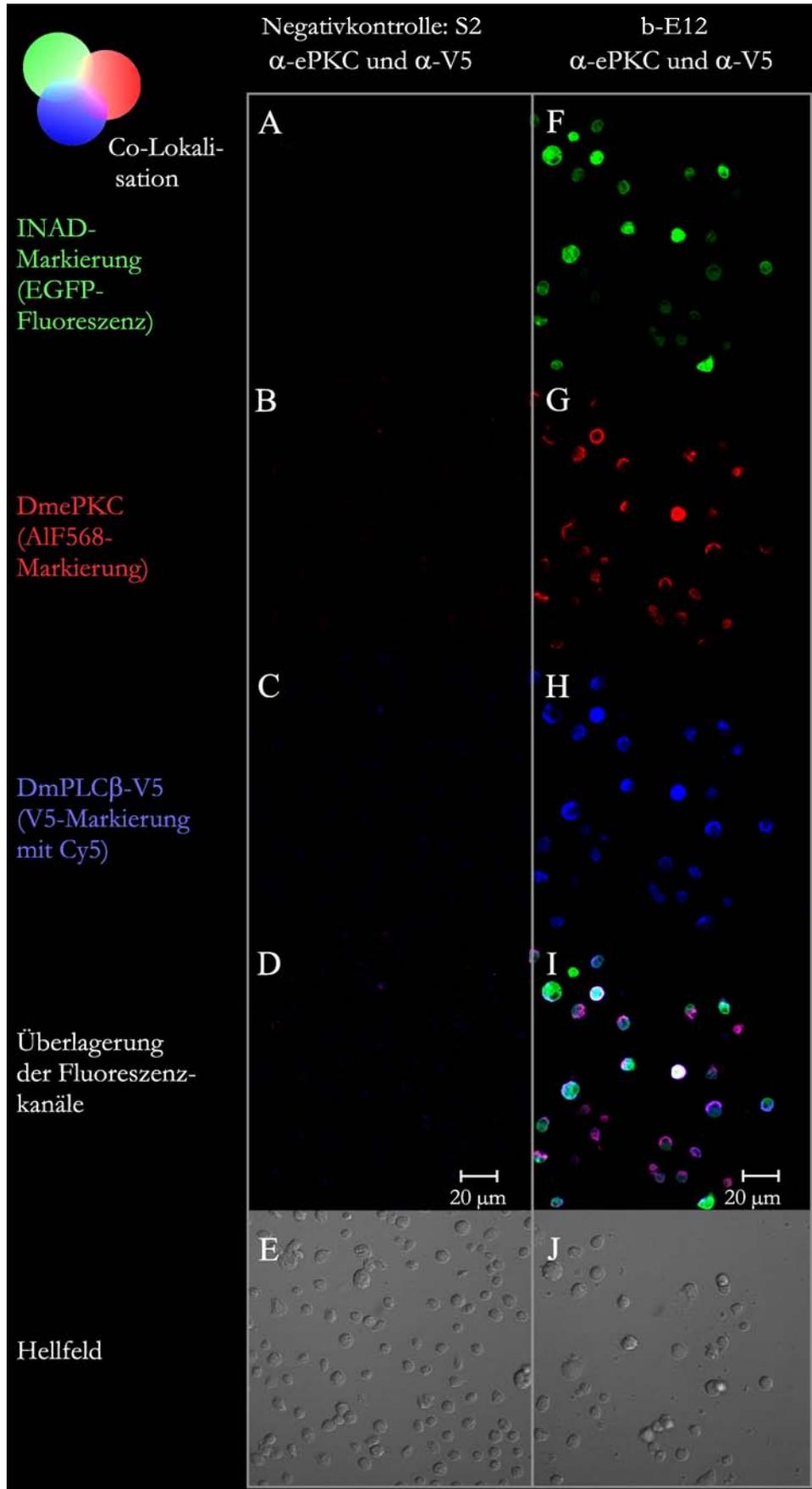
(a) Biochemische Analyse von Linien der klonalen Selektion INAD-Komplex–DmePKC

Die dargestellten Western Blots wurden mit folgenden Nachweisantikörpern inkubiert: A) α -EGFP, B) α -V5, C) α -DmTRP, und D) α -DmINAD. Klon 2-D12 co-exprimiert rDmINAD-EGFP, rDmTRP und rDmPLC β -V5-His. Bei Verwendung gleicher Extraktmengen (2 μ l) wird in der Kontrolllinie INAD-Komplex kein rDmTRP detektiert. Pk: Positivkontrolle, Nk: Negativkontrolle

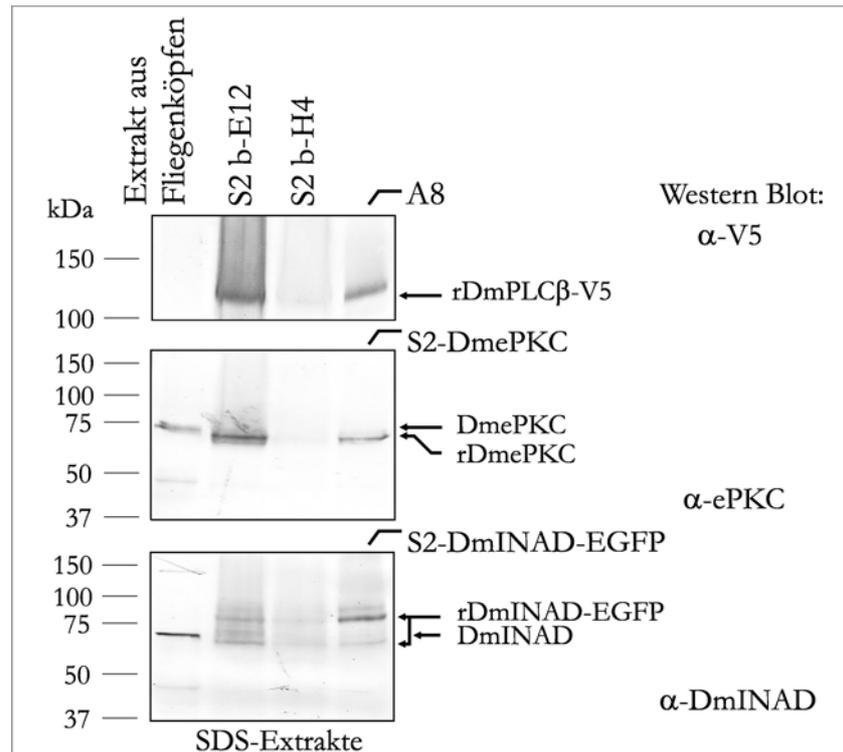


(b) Immunocytochemische Lokalisation der Expression von rDmPLC β -V5, rDmTRP sowie rDmINAD-EGFP im Klon 2-D12

Abbildung 4.20: S2-Komp[INAD;TRP;PLC]: Dokumentation des Zellklons 2-D12

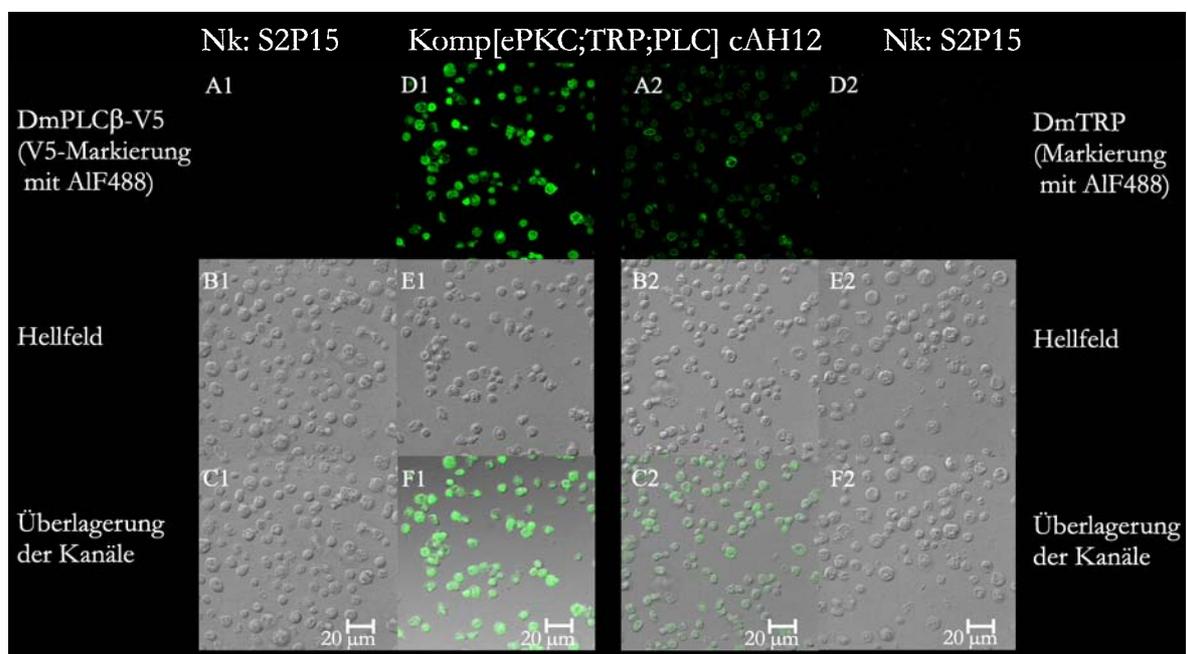


(a) Immunocytochemischer Expressionsnachweis in Komp[INAD;ePKC;PLC] Klon b-E12



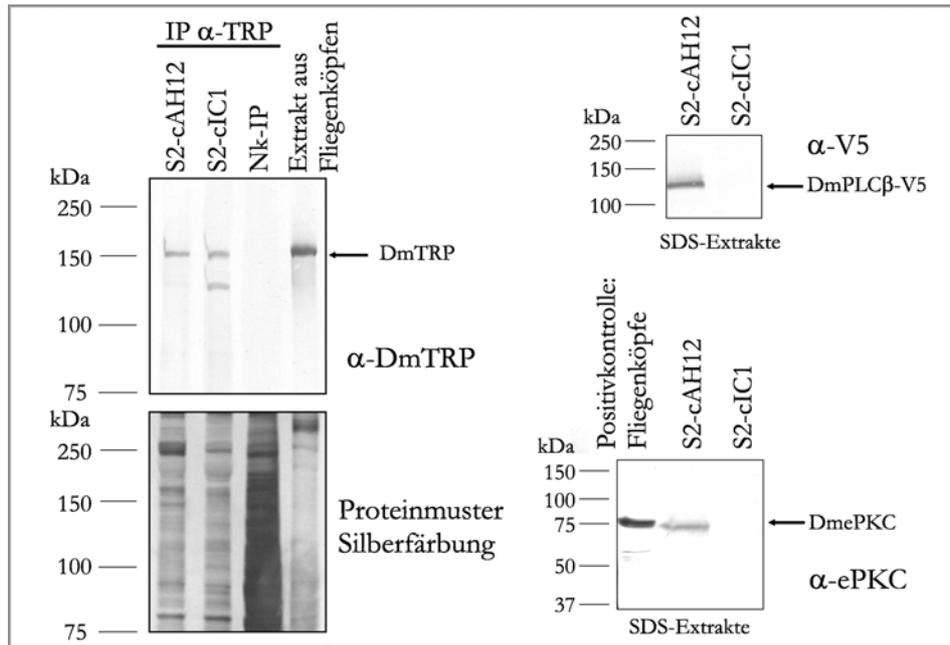
(b) Biochemische Analyse: rekombinante Expression in Komp[INAD;ePKC;PLC] b-E12

Abbildung 4.21: Charakterisierung von Klonlinien der Selektion INAD-Komplex-TRP

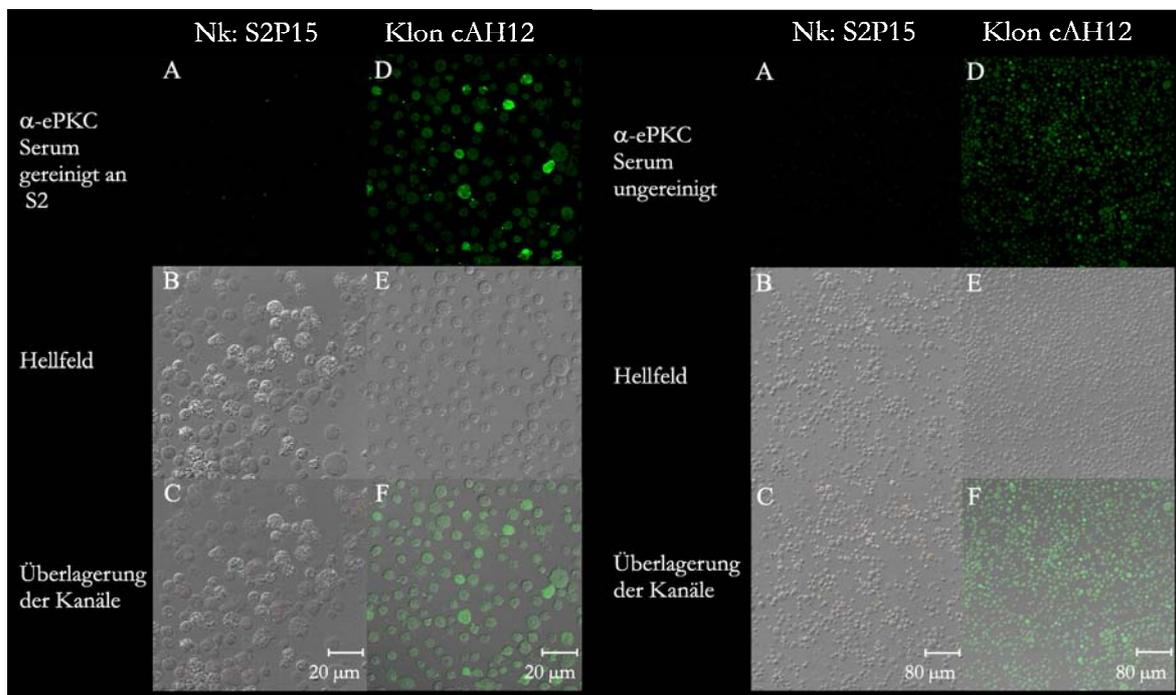


(a) Immunocytochemie: Monoklonalität für rDmTRP sowie für rDmPLCβ-V5 und subzelluläre Lokalisation beider rekombinanter Proteine in Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12

Nk beschreibt die Verwendung von untransfizierten Zellen S2P15 als Negativkontrolle für die unspezifische Hintergrundreaktion der verwendeten primären Antikörper α-V5 und α-DmTRP.



(b) Biochemische Dokumentation rekombinanter Expressionsprodukte in Klon cAH12
 Der Immunpräzipitationsansatz aus S2-DmINAD-EGFP Klon A1 (Nk-IP) zeigt, dass TRP-Protein spezifisch nur aus Linien co-transfiziert mit pMT/DmTRP präzipitiert wird.



(c) Immunocytochemische Überprüfung der rDmePKC-Expression in Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12 mit α -ePKC-Serum präadsorbiert an S2-Extrakten und ungereinigt. Als sekundärer Antikörper wurde α -Maus-A1F488 verwendet. Die untransfizierte Linie S2P15 dient als Negativkontrolle (Nk).

Abbildung 4.22: Dokumentation der Linie Komp[ePKC;TRP;PLC] Klon cAH12

Co-Lokalisation einzelner Komponenten hindeuten.

Der Klonalitätsstatus mehrfach rDmPKC-positiv getesteter Linien der Selektion INAD-Komplex-INAD mit Co-Expression von rDmPKC, rDmTRP und rDmPLC β -V5-His wurde durch Immuncytochemie für mehrere Expressionsprodukte bestimmt. Die Abbildungen 4.22 a sowie c zeigen diese Analysen für den selektierten Klon cAH12. Die Dokumentation belegt für diesen Klon eine Penetranz von 100 % sowohl für rDmPLC β -V5-His als auch rDmTRP. Diese Daten im Vergleich zu Analysen der Linie cIC1 mit 100 % Penetranz für rDmTRP aber vereinzelt Signalen für rDmPLC β -V5-His und rDmPKC (Daten nicht dargestellt) argumentieren stark für die Monoklonalität von cAH12. Unterstützt werden sie von der rDmPKC-IC-Analyse für cAH12 (Abbildung 4.22 c), die Monoklonalität auch für rDmPKC in cAH12 nahelegt. Die Auswirkungen geringer Penetranz auf die biochemische Nachweisbarkeit der Expressionsprodukte ist für die immuncytochemisch charakterisierte Linie cIC1 in Abbildung 4.22 b wiedergegeben. Obwohl in immuncytochemischen Experimenten die Expression von rDmPKC und rDmPLC β -V5-His in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden konnte, erscheint die Linie cIC1 in Western Blot Analysen für beide rekombinanten Proteine negativ.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass mit den klonal selektierten Linien a-H5 (Komp[INAD;TRP;ePKC]), b-E12 (Komp[INAD;ePKC;PLC]), 2-D12 (Komp[INAD;TRP;PLC]) und cAH12 (Komp[ePKC;TRP;PLC]) geeignete Referenzlinien zu den Klonen A8 und E4 (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]) für eine Vielzahl von Untersuchungen generiert wurden. Die immuncytochemischen Dokumentationen der subzellulären Lokalisation rekombinanter Proteine in co-exprimierenden S2-Linien erlauben jedoch keine Aussagen über die Assemblierung von Teilen eines rekombinanten INAD-Signalkomplexes.

4.5.5 Charakterisierung klonal selektierter Referenzlinien mit singulärer Komponentenexpression

Die Herstellung monoklonaler Linien mit singulärer Expression von Komplexkomponenten ermöglicht die Erhebung von Referenzdaten der einzelnen Komponenten zu Analysen der INAD-Komplex- beziehungsweise Teilkomplexexpression. Die Selektion monoklonaler Referenzlinien erfolgte wie unter 4.5.2 beschrieben für die stabil transfizierten polyklonalen Linien S2-DmPLC-V5-His, S2-DmPKC, S2-DmINAD-EGFP sowie S2-DmTRP.

Die Identifikation einer monoklonalen INAD-EGFP-Linie erfolgte via fluoreszenzmikroskopischer Durchmusterung klonal selektierter Linien auf eine EGFP-Fluoreszenzrate von 100 % aller lebenden Zellen. Die Linien S2-INAD-EGFP A1 und B1 erfüllen dieses Kriterium unter optimalen Wachstumsbedingungen. Die Expressionsraten für DmINAD-EGFP wurden mehrfach zur Verifizierung der Monoklonalität der Linien bestimmt. Die EGFP-Fluoreszenz der monoklonalen Linie INAD-EGFP A1 ist exemplarisch im Anhang in Bild A.8 dokumentiert. Die Daten zeigen eine unterschiedliche rDmINAD-EGFP-Expressivität einzelner Zellen (schwache Expression markiert durch einen Pfeil). Fehlende Fluoreszenz einzelner Zellen in der Abbildung (Markierung: Pfeilspitze) kann verschiedene

Ursachen haben. Die Viabilität der Kulturen erreicht nie 100 %. Zudem wird die Fluoreszenz von Zellen mit niedriger Expressivität, die ausserhalb der Fokusebene liegen, bei der konfokalmikroskopischen Dokumentation nicht erfasst.

Die Durchmusterung klonal selektierter Linien auf Expression von rDmPLC β -V5 erfolgte biochemisch in Western Blot Analysen. Mehrfach positiv getestete Linien der Selektion wurden folgend immuncytochemisch in Hinblick auf die Penetranz der rDmPLC β -V5-Expression analysiert. Der Klon BA3 zeigt bei unterschiedlicher Expressivität eine Penetranz für rDmPLC β -V5 von fast 100 % (Darstellung A.9). Die immuncytochemischen Markierungen wurden durch Mischung der Linie BA3 mit S2P15 als interne Negativkontrolle verifiziert (Daten nicht gezeigt). Ursachen fehlender Markierung einzelner Zellen in der Dokumentation sind bereits für rDmINAD-EGFP erläutert.

Der klonale Selektionsansatz S2-DmePKC wurde ebenfalls biochemisch durchmustert. In Western Blot Analysen erfolgte die Identifizierung von DmePKC-exprimierenden Linien mit α -CvePKC-Antikörpern. Die Analyse des Klonalitätsstatus der ausgewählten Kandidatenlinien ePKC AA3 und ePKC AC12, mit biochemischem Nachweis von rDmePKC in verschiedener Stärke (Anhang, Bild A.10), erfolgte durch immuncytochemische Markierung. Die Charakterisierung der klonalen Linie AA3 mit α -CvePKC ergab Monoklonalität (Daten nicht gezeigt), jedoch ging diese Linie während dauerhafter Kultivierung verloren. Die Linie AC12 exprimiert rDmePKC auf einem niedrigeren Niveau, wodurch bei dem gegebenen Niveau der Antikörper-Hintergrundreaktion von α -CvePKC eine zweifelsfreie Identifizierung dieser Linie als monoklonal nicht möglich war (Hintergrundreaktion von α -CvePKC dokumentiert am Beispiel von cAH12 in Abbildung 4.22 c).

Zur Generierung einer monoklonalen Linie S2-DmTRP wurde der klonale Selektionsprozess mehrfach unter Verwendung einer DmTRP-positiv getesteten polyklonalen S2-Linie angewendet (Referenz: Kapitel 4.5.2). Die Überprüfung der resultierenden Linien auf Expression von rDmTRP erfolgte mit Western Blot Analysen. Aus zwei Selektionsansätzen gingen mehrere in ersten Analysen positiv getestete Klone hervor. In beiden Selektionen starb ein Teil der erstmals TRP-positiv getesteten Linien während der Expansion in eine stabile Kultur ab. Die verbliebenen Linien zeigten in Folgeanalysen zur Verifizierung der rDmTRP-Expression und Bestimmung des Klonalitätsstatus keine TRP-Signale mehr. Wiederholte Anzuchten der Kulturen zur Erzielung eines optimalen Expressionszustandes resultierten jeweils im gleichen negativen Ergebnis. Die Versuche der Etablierung einer monoklonalen Kultur S2-DmTRP endeten immer mit dem Verlust der TRP-Expression.

4.6 Funktionelle Analysen an S2-Linien mit rekombinanter Expression von INAD-Signalkomplexkomponenten

4.6.1 MALDI-TOFF-Analyse: Rekombinante Expression des vollständigen DmTRP-Proteins

Für Analysen zur INAD-Signalkomplexassemblierung bei rekombinanter Expression der beteiligten Komponenten in S2-Zellen ist die vollständige und funktionelle Expression der einzelnen Komponenten von Bedeutung. In die Assemblierung des Signalkomplexes ist der C-Terminus von TRP involviert, der über ein PDZ-Domänen-Interaktionsmotiv mit INAD verbunden ist. Insbesondere das Vorhandensein des PDZ-Domänen-Interaktionsmotivs von TRP ist somit von Interesse, da INAD-ungebundenes DmTRP fehllokalisiert ist und in einer drastischen Veränderung des elektrophysiologischen Phänotyps (ERG-Messungen) bei mutanten Fliegen resultiert. Die Expression des vollständigen TRP-Proteins kann durch Western Blot Analysen mit α -DmTRP_{#088} nicht überprüft werden.

Massenspektrometrische Analysen sind ein effizienter Weg zur Charakterisierung von Proteinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung des rekombinant in S2-Zellen exprimierten TRP-Proteins von *Drosophila melanogaster* in Zusammenarbeit mit Frau Kristina Hartmann MALDI-TOFF-Spektren (*matrix-assisted laser desorption ionisation, time-of-flight*-Analyse) erstellt. Die Isolierung von rDmTRP-Protein erfolgte durch Immunpräzipitation (IP) mit α -DmTRP #088 aus Tritonextrakten im besonderen von Zellen der Linien S2-DmTRP, INAD-Komplex Klon E4 und A8. Durch SDS-PAGE separierte TRP-Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse mit Trypsin definiert fragmentiert. Die Analyse der Peptidgemische erfolgte unter Verwendung der Matrix α -cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure. Als Referenz wurde DmTRP, gewonnen durch α -TRP-IP aus Köpfen von A35-Fliegen (Wildtyp), eingesetzt (Abbildung 4.23). Die Abbildung 4.24 zeigt zwei exemplarische Spektren erhalten von Wildtypfliegen-TRP und rekombinant exprimiertem rDmTRP. Die detektierten Fragmentmuster (Zusammenstellung 4.25) werden in der MASCOT-Datenbanksuche eindeutig als DmTRP identifiziert. Die Spektren der detektierten Peptide beider Proben unterscheiden sich geringfügig. Die detektierbaren Fragmente stammen jedoch übereinstimmend fast ausschließlich aus cytoplasmatisch beziehungsweise extrazellulär lokalisierten Regionen. Eine Ausnahme bildet die putative Transmembranregion 1, die sowohl bei Präzipitation von TRP aus Fliegen als auch aus rekombinanten Zellen detektiert wird (DmTRP-Aminosäuresequenz 334–355). Die Detektion des N- und des C-Terminus im Spektrum von rDmTRP belegt die rekombinante Expression des vollständigen TRP-Proteins von *D. melanogaster* in S2-Zellen. Die Funktionalität des rDmTRP-Proteins, besonders hinsichtlich der Interaktionsfähigkeit mit INAD, scheint somit gesichert.

Vor dem Hintergrund ausgeprägter Primärstrukturvariationen des TRP-Proteins von *D.*

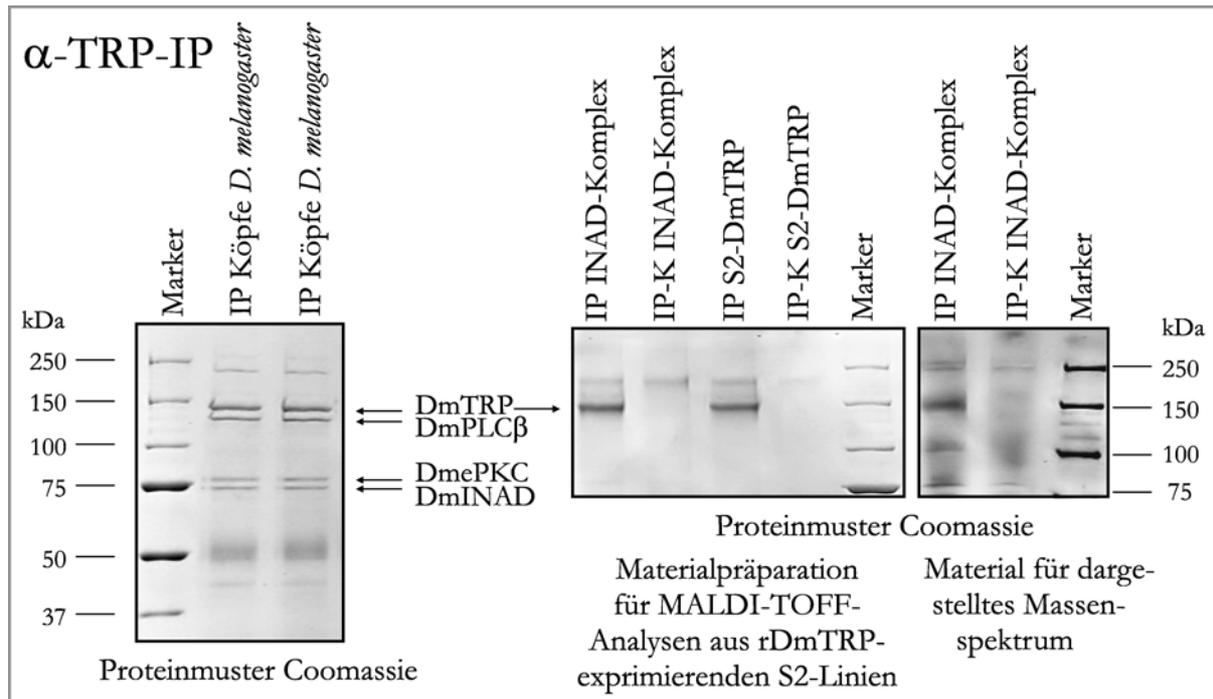


Abbildung 4.23: Anti-TRP-Immunpräzipitationen zur Gewinnung von DmTRP und rDmTRP für Massenspektrometrie

Die Abbildung zeigt Immunpräzipitationen (IP) nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Proteinmusters. Die erhaltenen TRP-Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die Präzipitation der Referenzproben erfolgte aus Tritonextrakten von jeweils 700 *D. melanogaster*-Köpfen. Die Gewinnung von rDmTRP erfolgte aus Tritonextrakten verschiedener Linien mit (Co-)Expression des Proteins. Im Proteinmuster der Präzipitation aus Zellen der Linien INAD-Komplex ist kein Co-Präzipitationsprodukt erkennbar. Zum einen lösen extrem stringente Waschbedingungen zur Gewinnung von möglichst reinem Material für die Massenspektrometrie (IP aus S2 zeigt einen sehr hohen unspezifischen Hintergrund im Vergleich zur Präzipitation aus Fliegenköpfen) einen Teil der Proteininteraktionen. Ausserdem liegt in co-exprimierenden Zellen immer ein Teil der rekombinanten Proteine ungebunden vor. IP-K bezeichnet Kontrollansätze, bei denen es sich um IP-Ansätze ohne Präzipitationsantikörper handelt. Diese sind zur eindeutigen Identifizierung von rDmTRP-Proteinbanden im hohen Präzipitationshintergrund erforderlich.

melanogaster (unter 4.2.2) erfolgte über den computerunterstützten MASCOT-SEARCH hinaus eine eingehende Analyse der massenspektrometrischen Daten sowie der Suchergebnisse mehrerer unabhängiger Messungen. Eines der Hauptkriterien stellte dabei die Suche nach den möglichen polymorphen Fragmenten dar sowie die Gewichtung der MASCOT-Ergebnisse in Abhängigkeit von der gewählten Fehlertoleranz. Demnach entspricht die untersuchte TRP-Aminosäuresequenz von A35-Fliegen mit hoher Wahrscheinlichkeit der Sequenzreferenz AAA28976. Für die rekombinant in S2-Zellen exprimierte cDNA-Sequenz von *D. melanogaster*-TRP kann bereits aufgrund der N-terminalen Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit die Referenz JU0092 ausgeschlossen werden. Die Auswertung der MALDI-TOFF-Daten spricht auch bei rDmTRP für die Sequenz AAA28976.

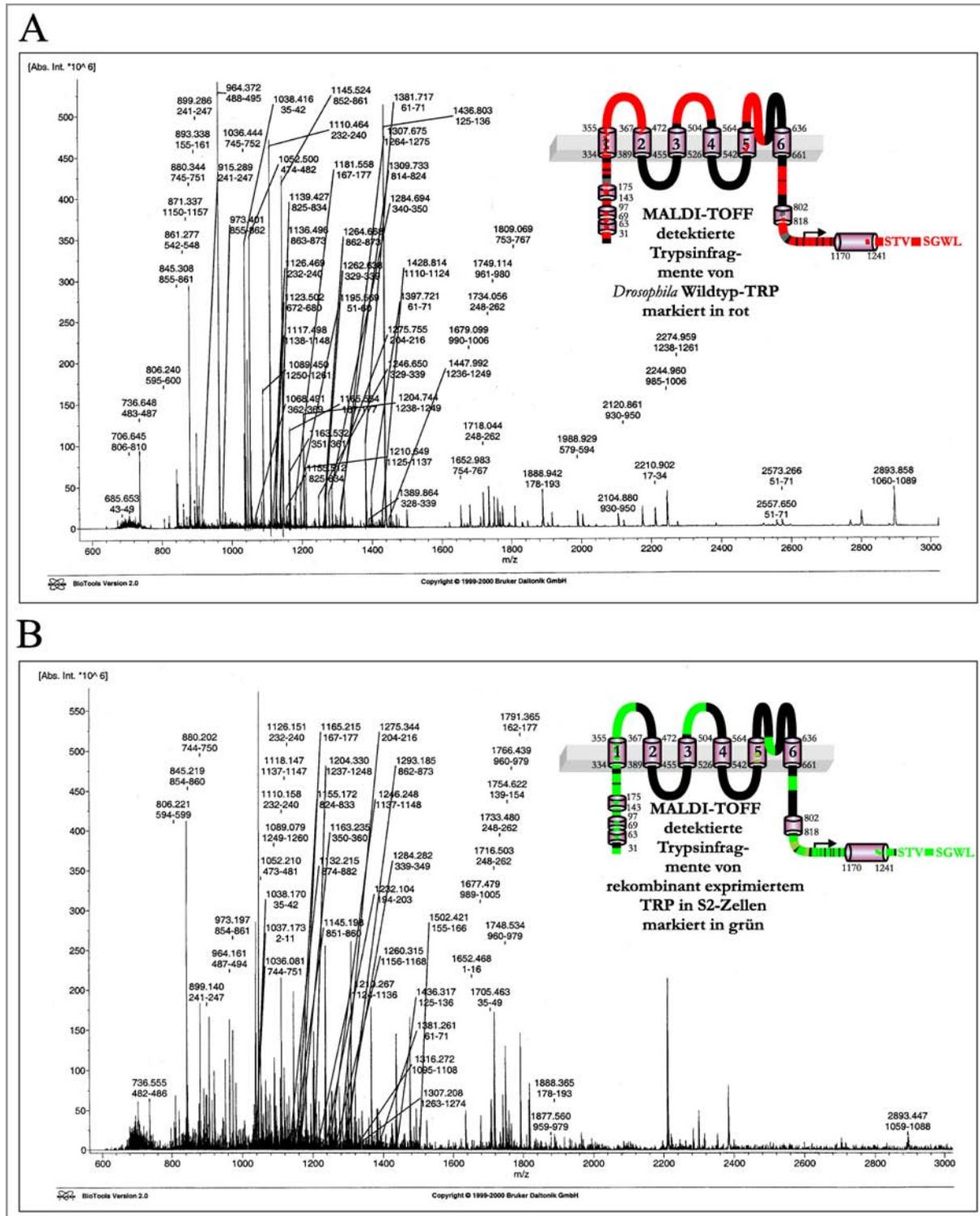


Abbildung 4.24: MALDI-TOFF-Analyse: Vergleich der Massenspektren von immunpräzipitiertem TRP aus Wildtyp-Fliegen (*D. melanogaster*) und S2-Zellen mit rekombinanter DmTRP-Expression nach Trypsinfragmentierung

In den dargestellten Spektren sind alle Fragmente mit Molekulargewicht und Aminosäureposition gekennzeichnet, die bei computergestütztem Datenbankvergleich (MASCOT-Search) als TRP identifiziert wurden. Die Toleranzgrenze der dargestellten Analysen für Molekulargewichtsabweichungen betrug dabei für die Fliegenprobe 0.10 % und für rDmTRP 0.05 %. Die jeweils identifizierten TRP-Fragmente sind in den schematischen Darstellungen von TRP gekennzeichnet: Fliege – rot, rekombinante S2-Zellen – grün, nicht zweifelsfrei zugeordnete Fragmente (siehe Abbildung 4.25) – grau beziehungsweise heller grün. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Frau Kristina Hartmann.

Beobachtete Masse Fliegen / Zellen	Theoretische Masse monoisotopisch +	Ionenyp	identifizierte Sequenz	Spaltung		Beobachtete Masse Fliegen / Zellen	Theoretische Masse monoisotopisch +	Ionenyp	identifizierte Sequenz	Spaltung	
				vollständig	unvollständig					vollständig	unvollständig
685.653	685.3879	MH ⁺	43-49	+	+	1264.668	1263.65 *	MH ⁺	862-873	+	+
706.645	705.35 *	MH ⁺	806-810 + MSO	+	+	1275.755/1275.344	1275.7267	MH ⁺	204-216	+	+
	706.3592	MH ⁺	1269-1274 *	+	+	1284.694/1284.282	1285.6496	MH ⁺	340-350 Cys-CAM	+	+
736.648/736.555	736.3777	MH ⁺	483-487	+	+	1293.185	1291.05 *	MH ⁺	862-873	+	+
806.240/806.221	807.3818	MH ⁺	595-600 Cys-CAM	+	+	1307.675/1307.208	1306.67 *	MH ⁺	1264-1275	+	+
845.308/845.219	845.4264	MH ⁺	855-861	+	+	1309.733	1309.6786	MH ⁺	814-824	+	+
	845.5165	MH ⁺	542-548	+	+	1316.272	1316.6804	MH ⁺	1096-1109	+	+
861.277	861.5114	MH ⁺	542-548 + MSO	+	+	1381.717/1381.261	1382.5827	MH ⁺	61-71 Cys-CAM	+	+
871.337	870.44 *	MH ⁺	1150-1157	+	+	1389.864	1389.73 *	MH ⁺	328-339	+	+
880.344/880.202	880.4523	MH ⁺	745-751	+	+	1397.721	1395.0144	MH ⁺	61-71 + MSO	+	+
	880.4774	MH ⁺	835-842	+	+	1428.814	1428.6965	MH ⁺	1110-1124	+	+
893.338	893.4727	MH ⁺	155-161	+	+	1436.803/1436.317	1436.6440	MH ⁺	125-136	+	+
899.286/899.140	899.3927	MH ⁺	241-247	+	+	1455.88	1455.88	MH ⁺		+	+
964.372/964.161	964.4887	MH ⁺	488-495	+	+	1447.992	1446.89 *	MH ⁺	1236-1249	+	+
965.37	965.37	MH ⁺		+	+	1502.421	1502.85 *	MH ⁺	155-166	+	+
915.289	915.3876	MH ⁺	241-247 + MSO	+	+	1652.983/	1652.983/	MH ⁺	754-767	+	+
973.401/973.197	972.51 *	MH ⁺	855-862	+	+	1679.099/1677.479	1677.7748	MH ⁺	1-16	+	+
1036.444/1036.081	1035.55 *	MH ⁺	745-752	+	+	1705.463	1651.75 *	MH ⁺	990-1006 + MSO	+	+
1037.173	1036.43 *	MH ⁺	2-11	-	-	/1652-468	1703.87 *	MH ⁺	35-49	+	+
1038.416/1038.170	1039.4877	MH ⁺	35-42 + Cys-CAM	+	+	1718.044/1716.503	1717.8326	MH ⁺	248-262	+	+
1052.500/1052.210	1052.5999	MH ⁺	474-482	+	+	1734.056/1733.480	1733.8275	MH ⁺	178-193	+	+
1068.491	1067.59 *	MH ⁺	362-369 + MSO	+	+	1749.114/1748.534	1748.8959	MH ⁺	248-262 + MSO	+	+
1089.450/1089.079	1089.5283	MH ⁺	1250-1261	+	+	1754.622	1754.9799	MH ⁺	961-980	+	+
1110.464/1110.158	1110.5248	MH ⁺	232-240	+	+	1766.439	1764.8908	MH ⁺	139-154	+	+
1117.498/1118.147	1117.5484	MH ⁺	1138-1148	+	+	1791.365	1790.97 *	MH ⁺	162-177 + MSO	+	+
1123.502	1122.55 *	MH ⁺	672-680	+	+	1809.069	1807.86 *	MH ⁺	753-767	+	+
1126.469/1126.151	1126.5197	MH ⁺	232-240 + MSO	+	+	1877.560	1875.98 *	MH ⁺	959-979	+	+
	1132.215	MH ⁺	874-882 + MSO	+	+	1888.942/1888.365	1891.6990	MH ⁺	178-193 + Cys-CAM	+	+
	1131.52 *	MH ⁺	1158-1169	+	+	1988.929	1989.8283	MH ⁺	579-594 Cys-CAM	+	+
1136.496	1136.5582	MH ⁺	863-873	+	+	2104.880	2104.8975	MH ⁺	930-950	+	+
1139.427	1139.4633	MH ⁺	825-834	+	+	2120.861	2120.8924	MH ⁺	930-950 + MSO	+	+
1145.524/1145.198	1144.56 *	MH ⁺	852-861	+	+	2210.902	2208.9926	MH ⁺	17-34 + 2x MSO	+	+
1155.512/1155.172	1155.4582	MH ⁺	825-834 + MSO	+	+	2244.960	2246.05 *	MH ⁺	985-1006 + MSO	+	+
1163.532/1163.235	1163.5942	MH ⁺	351-361	+	+	2274.959	2274.28 *	MH ⁺	1238-1261	+	+
1165.554/1165.215	1165.6034	MH ⁺	167-177	+	+	2557.650	2557.16 *	MH ⁺	51-71	+	+
1195.569	1195.5841	MH ⁺	51-60	+	+	2573.266	2573.15 *	MH ⁺	51-71 + MSO	+	+
1204.744/1204.330	1204.7775	MH ⁺	1238-1249	+	+	2893.858/2893.447	2895.5210	MH ⁺	1060-1089	+	+
1210.649/1210.267	1210.6790	MH ⁺	1125-1137	+	+						
1232.104	1232.62 *	MH ⁺	194-203	+	+						
1246.650/1246.248	1246.6460	MH ⁺	329-339	+	+						
1260.315	1258.62 *	MH ⁺	1156-1168	+	+						
1262.638	1262.6409	MH ⁺	329-339 + MSO	+	+						

⁺: Peptid-Mass-Berechnung für monoisotopische Peaks
^{*}: Mascot-Referenzwert, Referenzwert des Mascot-Programms abweichend (keine monoisotopischen Peaks)

Abbildung 4.25: MALDI-TOFF-Analyse: Identifizierte TRP-Fragmente der Fliegen-Probe und von rekombinantem rDmTRP aus S2-Zellen

Die identifizierten Sequenzen sind farbkodiert: schwarz/grau: es werden identische/abweichende Sequenzen identifiziert zwischen Fliegen und Zellen, rot/grün: nur in Fliegen/Zellen identifizierte Sequenzen, orange/olivegrün: ungesicherte Zuordnung von nur in Fliegen/Zellen gefundenen Fragmenten. Peptidmodifikationen sind angegeben als: MSO-Methioninsulfoxid, CAM-Carbamidomethylgruppe. MH⁺ bezeichnet die einfache Protonierung der Fragmente.

4.6.2 Co-Immunpräzitationsstudien

Die immunocytochemischen Lokalisationen rekombinanter Proteine in S2-Linien mit Expression mehrerer INAD-Komplexkomponenten dokumentieren die Co-Lokalisation der Expressionsprodukte (Kapitel 4.5.1, 4.5.3 und 4.5.4). Die Frage einer Interaktion der rekombinanten Proteine bleibt jedoch bestehen. Interaktionen zwischen den rekombinanten Proteinen lassen sich durch Co-Immunpräzitationen nachweisen. Die Untersuchung von Interaktionsmustern kann Hinweise auf die Bildung des Signalkomplexes und möglicherweise über zugrundeliegende Mechanismen geben.

Die Abbildung 4.26 A und B zeigt Immunpräzitationsstudien von polyklonalen Linien, die die vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes exprimieren. Teil der Untersuchungen sind ebenfalls Ansätze zur Identifizierung unspezifischer Signale. Sie umfassen einerseits die Immunpräzitation (IP) aus einer S2-Linie mit singulärer Expression einer INAD-Komplexkomponente (rDmINAD-EGFP) als auch die Inkubation von Zellextrakten in IP-Ansätzen ohne Einsatz von Antikörpern. Die Immunpräzitation von rDmTRP (4.26 B) zeigt die Co-Präzitation von rDmPLC β -V5 und rDmePKC. Das Gerüstprotein INAD, über den die beiden co-präzitierten Proteine mutmaßlich an TRP gekoppelt sind, kann im Präzipitat nicht nachgewiesen werden. Die Präzitation von rDmPLC β -V5 über das C-terminal fusionierte V5-Epitop (4.26 A) resultiert in der detektierbaren Co-Präzitation von rDmePKC und rDmINAD-EGFP. In diesem Co-Immunpräzitationsansatz kann kein rDmTRP dokumentiert werden. Die Interaktion von rDmINAD-EGFP mit rDmPLC β -V5 wurde durch α -EGFP- und α -DmINAD-Co-Immunpräzitation bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von PLC β -V5 an INAD ist insofern bedeutsam, als das PDZ-Interaktionsmotiv von PLC β durch C-terminale Fusion von weiteren Aminosäuren (Kodierung V5- und Hexahistidin-*tag*) nun distal vom C-Terminus des Proteins lokalisiert ist und damit im Gegensatz zur postulierten endterminalen Lokalisation aller PDZ-Interaktionsmotive steht (SONGYANG *et al.*, 1997).

Aus den polyklonalen Linien INAD-Komplex war der Nachweis einer gemeinsamen Co-Präzitation der vier Hauptkomponenten des rINAD-Komplexes nicht möglich. Die dargestellten Immunpräzitationen aus verschiedenen Linien mit Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes im Vergleich zu Kontrollen belegen jedoch mehrfach überlappend Interaktionen zwischen diesen Komponenten und somit indirekt die Bildung eines rINAD-Komplexes bestehend aus diesen vier rekombinanten Proteinen.

Die Bildung eines INAD-Signalkomplexes nach rekombinanter Expression der vier Hauptkomponenten wurde auch in den klonal selektierten Linien INAD-Komplex Klon E4 und Klon A8 mittels Immunpräzitation untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4.26 C zusammengefasst. Die Abbildung gibt wieder, dass bei α -EGFP-Präzitation mit rDmINAD-EGFP die Proteine rDmPLC β -V5-His und rDmePKC im Immunpräzipitat nachgewiesen werden können. Eine Interaktion zwischen rDmTRP und rDmINAD-EGFP belegt die Präzitation mit α -DmTRP. Die Co-Immunpräzitation von rDmePKC mit rDmINAD-EGFP wurde in mehreren Experimenten überprüft und für beide Klone bestätigt. Eine exemplarische Verifizierung der Co-Präzitation von

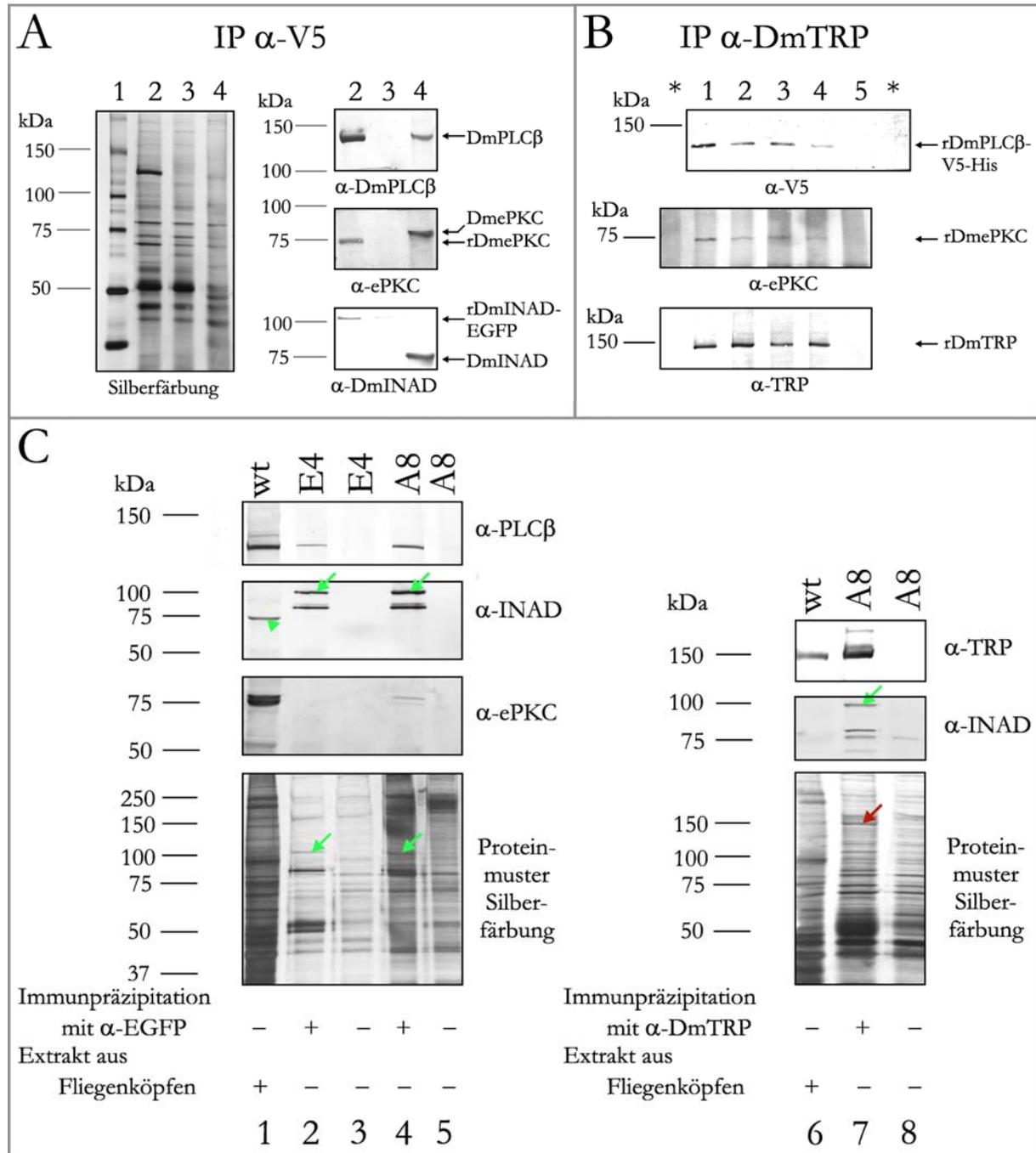


Abbildung 4.26: Co-Immunpräzipitationen aus Linien Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]

A: Die Co-Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit α -V5 über rDmPLC β -V5-His. Dokumentiert sind folgende Proben separiert durch SDS-PAGE 1: Molekulargewichtsstandard, 2: IP aus INAD-Komplex (polyklonal), 3: IP aus S2-INAD-EGFP und 4: Kopfextrakt aus *D. melanogaster* als positive Kontrolle.

B: Co-Immunpräzipitiert wurde mit α -DmTRP. Die Spuren der SDS-PAGE-Gele sind beladen mit Präzipitaten der Linien: 1) INAD-Komplex A, 2) INAD-Komplex B, 3) INAD-Komplex AhH, 4) INAD-Komplex BhH und 5) INAD-EGFP -S5. In Spur * wurde Extrakt aus polyklonalen Linien INAD-Komplex ohne Präzipitationsantikörper auf der Protein A-Matrix inkubiert.

C: Die Gele wurden mit Proben des Immunpräzipitationsexperiments wie folgt geladen: 1), 6) Positivkontrolle: SDS-Extrakt aus Drosophilaköpfen (in Abhängigkeit vom Antikörper 2–4 Köpfe); 2), 3) INAD-Komplex Klon E4; 4), 5), 7), 8) INAD-Komplex Klon A8. Die grünen Pfeile kennzeichnen rDmINAD-EGFP, DmTRP ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet und DmINAD mit einer grünen Pfeilspitze.

Nachgewiesen wurden (co-)präzipitierte Proteine via Immundetektion mit den angegebenen Antikörpern.

rDmePKC bei rDmINAD-EGFP-Präzipitation ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Hintergrund der gesonderten Überprüfung ist zum einen eine Instabilität dieser Interaktion bei Präzipitationen mit α -DmINAD (BÄHNER, 2001, Seite 59), deren Ursache nicht eindeutig geklärt ist. Von Bedeutung ist die Dokumentation der ePKC-INAD-Interaktion, neben der Co-Immunpräzipitation von rDmePKC mit anderen Komponenten des rINAD-Signalkomplexes, aber vor allem für den Beleg der vollständigen Expression des Konstruktes pMT/DmePKC in S2-Zellen, da das PDZ-Domäneninteraktionsmotiv von rDmePKC final C-terminal lokalisiert ist. Offensichtlich unterscheiden sich rDmePKC aus S2-Zellen und die native DmePKC trotz differierender apparenter Molekulargewichte (Referenzkapitel 4.4.2) nicht hinsichtlich der Länge ihrer Primärstruktur.

Die IP-Analysen sowohl der polyklonalen Linien INAD-Komplex als auch der Klone E4 und A8 belegen redundant die Interaktionen zwischen den vier rekombinant exprimierten Komplexproteinen unabhängig von fusionierten Sequenzen und damit indirekt die Bildung eines rINAD-Signalkomplexes in S2-Zellen. Ein direkter Nachweis der Interaktion aller vier Komponenten miteinander in einem IP-Ansatz, wie das für die Immunpräzipitation des INAD-Signalkomplexes aus Wildtyp-Fliegen möglich ist (Beispiel: Abbildung 4.23), war jedoch mit keinem der Co-Immunpräzipitationsansätze erfolgreich. Insbesondere der direkte Nachweis der Interaktion von rDmTRP und rDmINAD-EGFP erwies sich auch in klonal selektierten Linien als schwierig.

Der Nachweis der Assemblierung eines rekombinanten INAD-Signalkomplexes bei rekombinanter Co-Expression der Hauptkomponenten dieses Komplexes in S2-Zellen veranlasste Analysen einer Teilkomplexbildung. Diese können möglicherweise Hinweise liefern, wie und wo der INAD-Signalkomplex zusammengesetzt wird. Die vergleichende Immunpräzipitation in Abbildung 4.27 aus den stabilen klonalen Linien Komp[INAD;TRP;ePKC] a-H5 und Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12 belegt die Bildung eines rekombinanten INAD-Teilkomplexes bestehend aus rDmTRP, rDmINAD-EGFP sowie rDmePKC in a-H5. Die Notwendigkeit der Co-Expression von rDmINAD-EGFP zur Assoziation eines Teilkomplexes belegt die Probe cAH12: es erfolgt keine Co-Präzipitation rekombinant exprimierter Proteine zusammen mit rDmTRP. CAH12 weist darüber hinaus die Spezifität der Co-Präzipitationen aus a-H5 nach: weder rDmePKC noch rDmPLC β -V5-His binden unspezifisch in nachweisbaren Mengen an die Präzipitationsmatrix. Die dokumentierten Phänotypen von Komp[INAD;TRP;ePKC] a-H5 und Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12 bezüglich des Immunpräzipitationsverhaltens entsprechen der *norpA*- beziehungsweise *inaD*-Nullmutante von *D. melanogaster*. Das Fehlen von Belegen der Komplexbildung in A8 in Abbildung 4.27 ist zurückzuführen auf das sinkende Expressionsniveau der einzelnen Komplexproteine mit steigender Zahl der Co-Expressionsprodukte. Es ist vergleichsweise mehr Material für eine adäquate Co-Präzipitation rekombinanter Komplexkomponenten, wie sie in Abbildung 4.26 C dargestellt ist, erforderlich. Im vorliegenden Versuch unterschreiten die aus A8 präzipitierten Mengen von rDmTRP sowie rDmePKC die Detektionsschwelle. Lediglich rDmINAD-EGFP deutet eine Co-Präzipitation an.

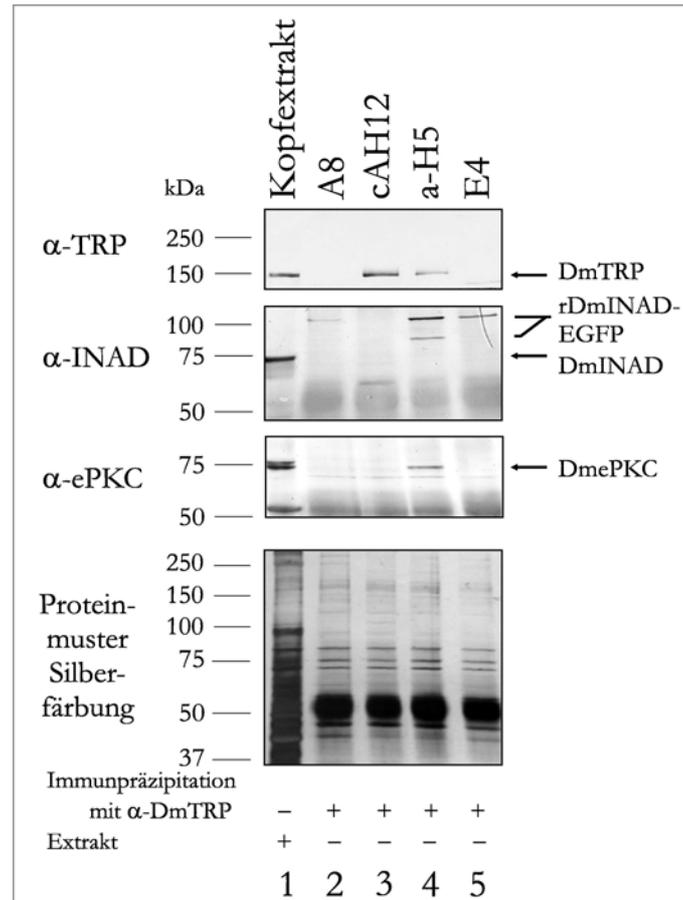


Abbildung 4.27: Co-Immunpräzipitationsanalyse von Komp[INAD;TRP;ePKC] a-H5 im Vergleich zu Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12: Die Assemblierung von Teilkomplexen erfordert die Co-Expression von rDmINAD-EGFP.

Die Immunpräzipitationen erfolgten aus gleichen Extraktmengen (Tritonextrakte, 1400 μ l), um die Vergleichbarkeit von Linien mit differierenden Co-Expressionen zu gewährleisten. Nach Separierung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die (co-)präzipitierten Proteine mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen. Dargestellt sind die Proben: 1) SDS-Extrakt aus Fliegenköpfen (Positivkontrolle), 2) INAD-Komplex Klon A8, 3) Komp[ePKC;TRP;PLC] Klon cAH12 (Negativkontrolle: keine unspezifische Präzipitation co-exprimierter Komponenten), 4) Komp[INAD;TRP;ePKC] Klon a-H5 sowie 5) INAD-Komplex Klon E4. Klon a-H5 zeigt die Assemblierung eines rekombinanten Teilkomplexes bestehend aus rDmTRP, rDmePKC und rDmINAD-EGFP. Die präzipitierten Proteinmengen an rDmTRP und rDmePKC unterschreiten in den Präzipitationsexperimenten der Linien A8 und E4 die Nachweisschwelle aufgrund sinkender Expressionsniveaus bei steigender Konstruktzahl. Der Nachweis von rDmINAD-EGFP weist jedoch auf erfolgreiche Co-Präzipitation hin.

4.6.3 Detergenz-basierte Differenzierung löslicher und membrangebundener Proteine

Das Gerüstprotein INAD umfasst fünf PDZ-Domänen. Für einige PDZ-Domänen-Proteine wurde die Bindung von PIP₂ über die PDZ-Domänen beschrieben (ZIMMERMANN *et al.*, 2002) und damit ihre Assoziation mit Membranen. In cytologischen Analysen mit Detergenzbehandlung unfixierter Zellen wurde deshalb untersucht, ob Hinweise für eine Mem-

branassoziation von INAD gefunden werden. Die Permeabilisierung von Zellen stellt keine vollständige Auflösung der Zellmembranen dar. Eine Vielzahl von Membranassoziationen sowie die Integration von Membranproteinen in Membranen bleiben unbeeinträchtigt. Lediglich lösliche unverankerte Proteine sollten durch die porösen Zellmembranen ausgewaschen werden. Die Digitonin-basierten Untersuchungen von rDmINAD-EGFP in Klon A1 erfolgten wie unter 3.7.2 beschrieben. Als Kontrolle für das Verhalten von Membranproteinen unter den Bedingungen der Digitonin-Permeabilisierung wurde die Linie rDmTRPL-EGFP Klon A3 (Referenzen: Abschnitt 4.7.1) untersucht. Wie rDmINAD-EGFP ist rDmTRPL-EGFP durch Fusion eines Fluorophors gut zugänglich für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Die Analyse von rDmTRPL-EGFP zeigt eine unveränderte Verankerung des rekombinanten Transmembranproteins in Membranen trotz Detergenzbehandlung der Zellen (Abbildung 4.28). Die lichtmikroskopische Analyse belegt, dass die vor der Fixierung permeabilisierten Zellen morphologisch, und damit große Teile der zellulären Membranen, intakt sind. Im Gegensatz dazu wird rekombinantes rDmINAD-EGFP aus morphologisch intakten, Digitonin-permeabilisierten Zellen nahezu vollständig ausgewaschen. Dieses Ergebnis zeigt, dass rDmINAD-EGFP bei rekombinanter Expression in S2-Zellen in löslicher Form vorliegt. Es gibt keine Hinweise auf eine Membranassoziation von rDmINAD-EGFP, beispielsweise über Vermittlung durch PDZ-Domänen.

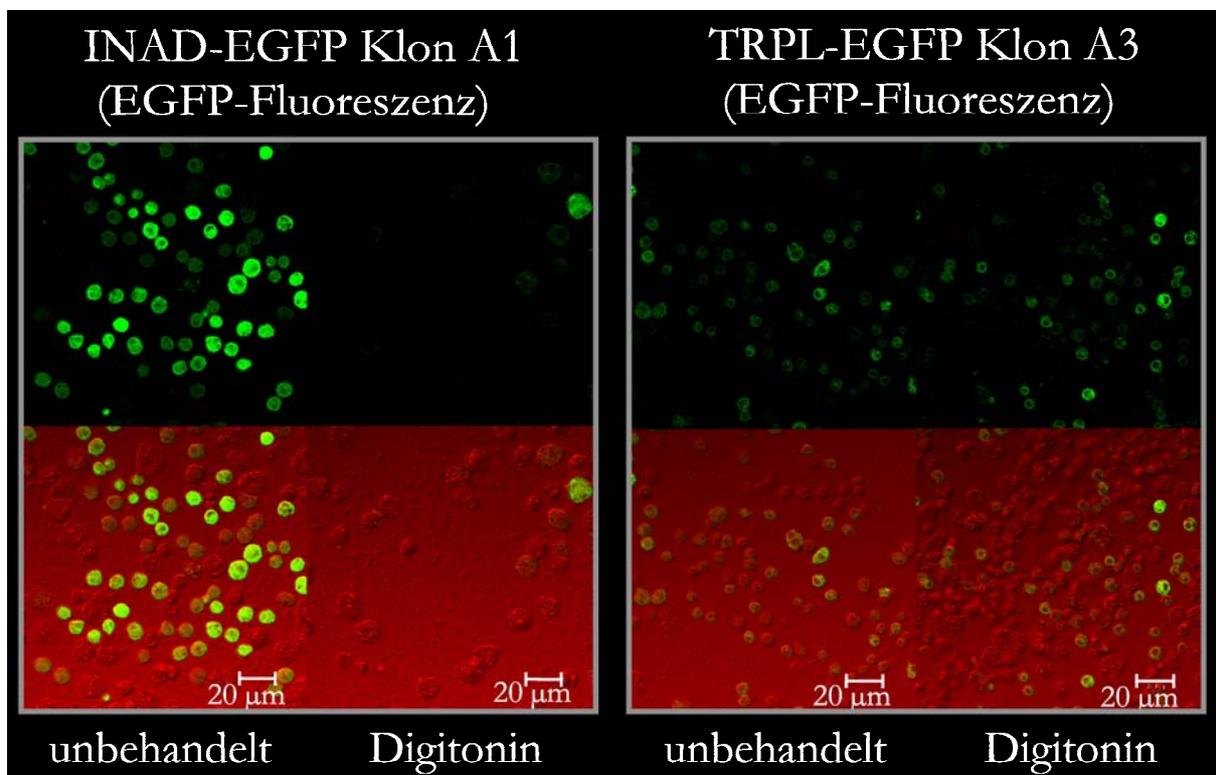
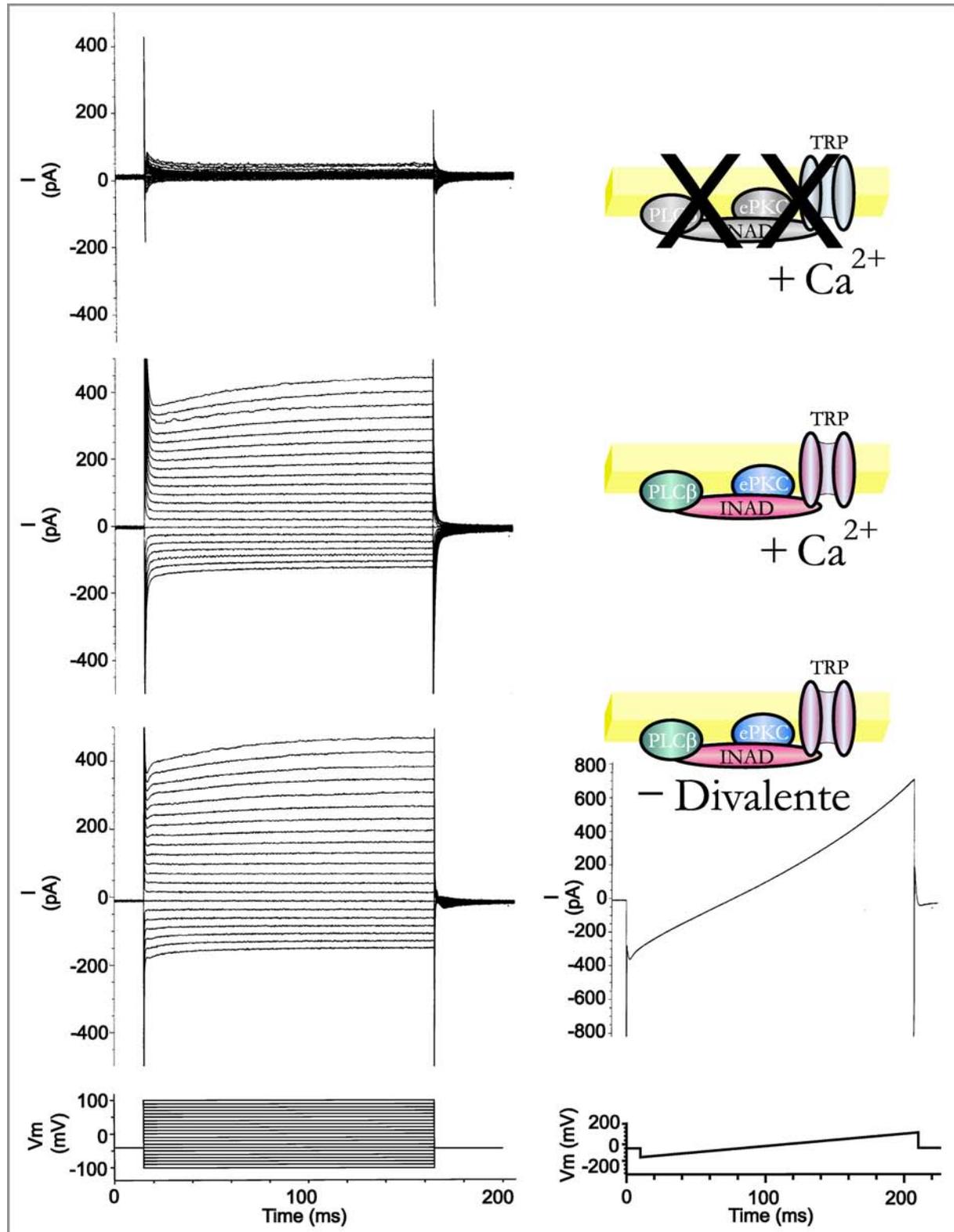


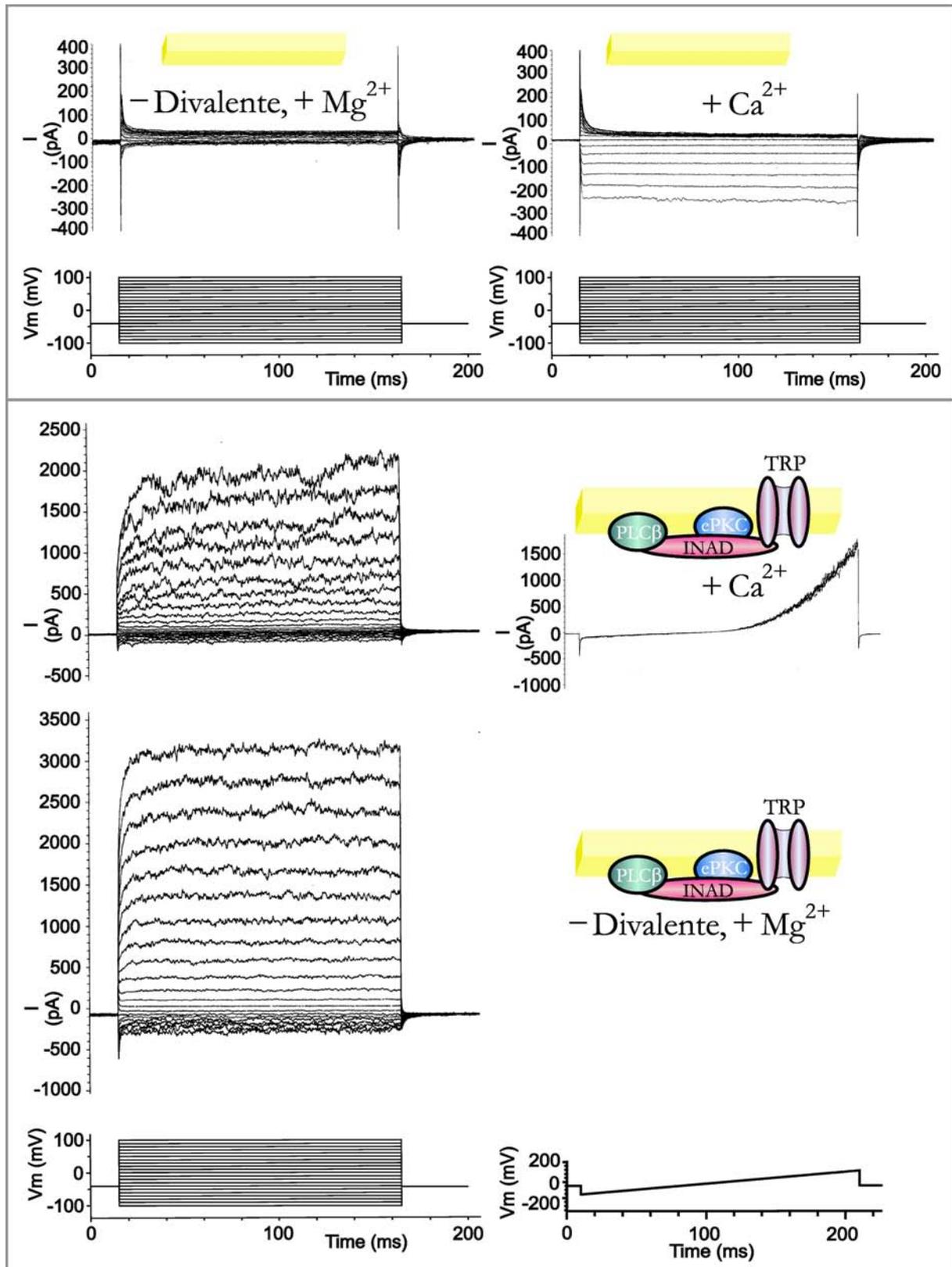
Abbildung 4.28: Löslichkeit von rDmINAD-EGFP im Vergleich zur Membranassoziation von rDmTRPL-EGFP bei rekombinanter Expression in S2-Zellen

4.6.4 Elektrophysiologische Charakterisierung des rekombinanten INAD-Signalkomplexes

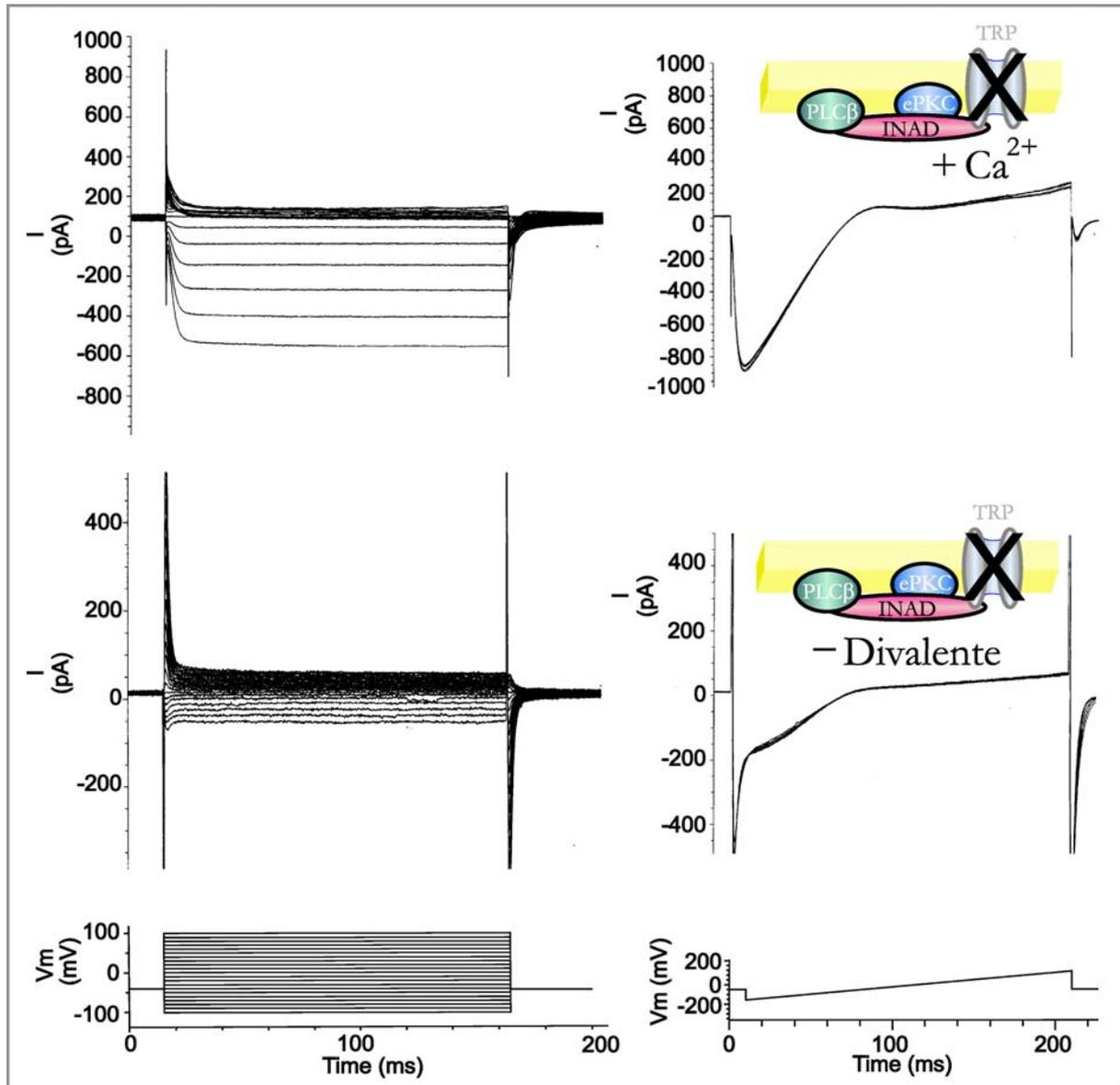
Die physiologischen Auswirkungen der Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes von *D. melanogaster* in S2-Zellen wurden durch elektrophysiologische Messungen untersucht. Die *whole cell recordings* (WCR) der charakterisierten Linien INAD-Komplex Klon A8 und E4 zeigen einen robusten Ionenstrom mit einer großen auswärts und einer kleinen einwärts gerichteten Komponente (Abbildung 4.29 a und b). In Abhängigkeit des verwendeten Zellklons differieren die elektrophysiologischen Daten hinsichtlich der Amplitude und Robustheit der Antwort (A8: deutlich größere Amplitude des Auswärtsstroms), die Gesamtaussage beider elektrophysiologischen Messungen ist dagegen identisch. Im Vergleich zu den Daten der Kontrollen ohne Expressionsinduktion (Beispiel Klon E4 in Abbildung 4.29 a), untransfizierten S2-Zellen (oberes Panel der Abbildung 4.29 b) und im besonderen zu denen der teilkomplexexprimierenden Referenzlinie b-E12 (Komp[INAD;ePKC;PLC]) ohne Co-Expression von rDmTRP (Abbildung 4.29 c) belegen die Ergebnisse von Klon E4 und Klon A8 die TRP-Abhängigkeit des detektierten Ionenstroms. Der in exprimierenden Zellen der Linien E4 und A8 gemessene Ionenstrom wird weder in S2-Zellen noch in uninduzierten Zellen von E4 und A8 oder in exprimierenden Zellen von b-E12 detektiert. Der Datenvergleich von E4, A8 und b-E12 zeigt somit die Funktionalität von rDmTRP bei Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes in S2-Zellen. Im Detail ergibt sich, dass der dargestellte auswärtsgerichtete Ionenstrom spezifisch auf rDmTRP zurückgeführt werden kann. Der einwärtsgerichtete Anteil des Ionenstroms findet sich ebenfalls in mehreren Referenzlinien und ist somit nicht TRP-spezifisch. Er resultiert vielmehr aus S2-endogenen Kanälen und zeigt eine Abhängigkeit von Ca^{2+} (Abbildung 4.29 b, oberes Panel). Die Darstellungen belegen darüber hinaus eine konstitutive Aktivität von rDmTRP bei der Expression eines rINAD-Signalkomplexes in S2-Zellen. Fortführende WCR-Analysen der Linie A8 zeigen eine Inhibition des TRP-abhängigen Ionenstroms nach Zugabe von La^{3+} (Abbildung 4.30). Eine Inhibition durch La^{3+} ist charakteristisch für TRP-Kanäle von *D. melanogaster* und somit ein weiterer Anhaltspunkt für TRP als Basis des auswärtsgerichteten Ionenstroms in den Linien E4 und A8. Sichtbar wird der La^{3+} -Effekt bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Die Amplituden der gemessenen Ionenströme innerhalb einer Zellklonlinie unterscheiden sich reproduzierbar in Relation zur Anwesenheit beziehungsweise zum Fehlen von Ca^{2+} und Mg^{2+} . In Abwesenheit von Ca^{2+} und Anwesenheit von Mg^{2+} ist die Amplitude des auswärtsgerichteten Ionenstroms höher. Zur Enthüllung der Einflüsse einzelner Komplexkomponenten auf den Gesamtionenstrom wurden, neben der Linie Komp[INAD;ePKC;PLC] b-E12, die Linien Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12, Komp[INAD;TRP;ePKC] a-A1 und Komp[INAD;TRP;PLC] 2-D12 im Vergleich zu den Linien INAD-Komplex A8 und E4 (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC]) analysiert. Die Daten der Linie cAH12 (Abbildung 4.31) zeigen keinen Ionenstrom vergleichbar zum TRP-abhängigen Ionenstrom von A8 oder E4, obwohl die Expression des rekombinanten TRP-Proteins sowohl immuncytochemisch als auch biochemisch verifiziert wurde (Abbildung 4.22). Die Bindung an INAD und damit



(a) INAD-Komplex Klon E4: uninduzierte und induzierte rINAD-Komplexexpression im Vergleich. Die dargestellten *whole cell recordings* der Linie E4 erfassen Ionenströme in Abhängigkeit von der angelegten *clamp*-Spannung. Die stufenweise Änderung der an den Zellen angelegten *clamp*-Spannung von -100 mV bis +100 mV (linke Spalte) resultiert bei Expression der vier Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes in einer Erhöhung der Amplitude des Ionenstroms. Der detektierte Ionenstrom umfasst einen größeren auswärtsgerichteten und einen kleineren einwärtsgerichteten Anteil. Die kontinuierliche Erhöhung der angelegten Spannung (rechts unten) resultiert ebenfalls in einem Ionenstrom.



(b) Negativkontrolle S2 ohne rekombinante Expression und INAD-Komplex Klon A8
 WCR-Messungen untransfizierter S2-Zellen (oberes Panel) zeigen einen Ca^{2+} -abhängigen einwärtsgerichteten Ionenstrom durch S2-endogene Ionenkanäle. Die Co-Expression von rDmTRP, rDmPLC β -V5-His rDmePKC und rDmINAD-EGFP in Klon A8 resultiert bei stufenweiser Änderung des an die Zellen angelegten *clamp*-Potentials in einem auswärtsgerichteten Ionenstrom mit hoher Amplitude. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist die Amplitude des Ionenstroms weiter erhöht. Die kontinuierliche Änderung der *clamp*-Spannung zeigt deutlich eine Auswärtsgleichrichtung des detektierten Ionenstroms (unteres Panel, rechts).



(c) Komp[INAD;ePKC;PLC] Klon b-E12: physiologischer Einfluss der rekombinanten Co-Expression von INAD-Signalkomplexkomponenten ohne rDmTRP auf S2-Zellen

In S2-Zellen mit rekombinanter Co-Expression der drei INAD-Kernkomplexproteine rDmPLC β -V5-His, rDmINAD-EGFP und rDmePKC umfasst der in WCR-Messungen detektierte Ionenstrom keine auswärtsgerichtete Komponente mit hoher Amplitude. Sowohl bei stufenweiser Änderung des *clamp*-Potentials als auch bei Spannungsrampen wird lediglich ein einwärtsgerichteter Ionenstrom detektiert. Dieser Ca²⁺-abhängige Ionenstrom steht nicht in Verbindung mit der Expression der drei rekombinanten Proteine sondern wird durch S2-endogene Ionenkanäle verursacht (Vergleich Abbildungsteil (b) oberes Panel).

Abbildung 4.29: Elektrophysiologische Charakterisierung der TRP-Kanäle nach Co-Expression von rDmINAD-EGFP, rDmTRP, rDmePKC und rDmPLC β -V5-His in S2-Zellen: Identifizierung rDmTRP-abhängiger Ionenströme in *whole cell recordings* (WCR) in Referenz zu Kontrolllinien.

Die Messungen der WCR erfolgten bei stufenweiser Änderung des *clamp*-Potentials und bei Spannungsrampen an individuellen Zellen. Die ionischen Bedingungen während der Messungen wurden durch die Badlösung (mM: 130 Na-Gluconat, 10 TES) und die Pipettenlösung (mM: 140 K-Gluconat, 10 TES) eingestellt, wobei +Ca²⁺ 1,5 mM Ca²⁺ und Mg²⁺ 4 mM Mg²⁺ in der Badlösung angeben. Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt.

an den INAD-Signalkomplex stellt offensichtlich eine wichtige Voraussetzung für die Kanalaktivität von rDmTRP im rekombinanten System S2 dar. Ein dem der Linie cAH12 ähnliches elektrophysiologisches Verhalten zeigt die Linie Komp[INAD;TRP;ePKC] a-A1 mit fehlender Expression von rDmPLC β -V5-His. Auch hier kann keine TRP-Kanalaktivität bestimmt werden (Abbildung 4.33). Die Anwesenheit von rDmPLC β -V5-His in Verbindung mit der Kopplung des Enzyms über rDmINAD-EGFP an rDmTRP ist demnach Voraussetzung für die Funktionalität von rDmTRP als Ionenkanal. Die elektrophysiologischen Charakteristika bei Fehlen von rDmePKC im rekombinanten Signalkomplex sind in Abbildung 4.32 wiedergegeben. Abweichend von den elektrophysiologischen Eigenschaften von ePKC-Nullmutanten (beispielsweise *inaC* P²⁰⁹) mit abnormalem aber nachweisbarem Ionenstrom zeigt die Linie 2-D12 keinen TRP-abhängigen Ionenstrom. Die Co-Expression von rDmTRP, rDmINAD-EGFP und rDmPLC β -V5-His für 2-D12 wurde mehrfach geprüft (Beispieldaten in Abbildung 4.20).

Die dargestellten elektrophysiologischen Daten belegen, dass rDmTRP bei Co-Expression mit rDmINAD-EGFP, rDmePKC und rDmPLC β -V5-His in S2-Zellen funktionale Ionenkanäle bildet. Für funktionelle TRP-Kanäle ist die Co-Expression aller Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes notwendig sowie die Assoziation dieser Proteine in einem rekombinanten INAD-Signalkomplex.

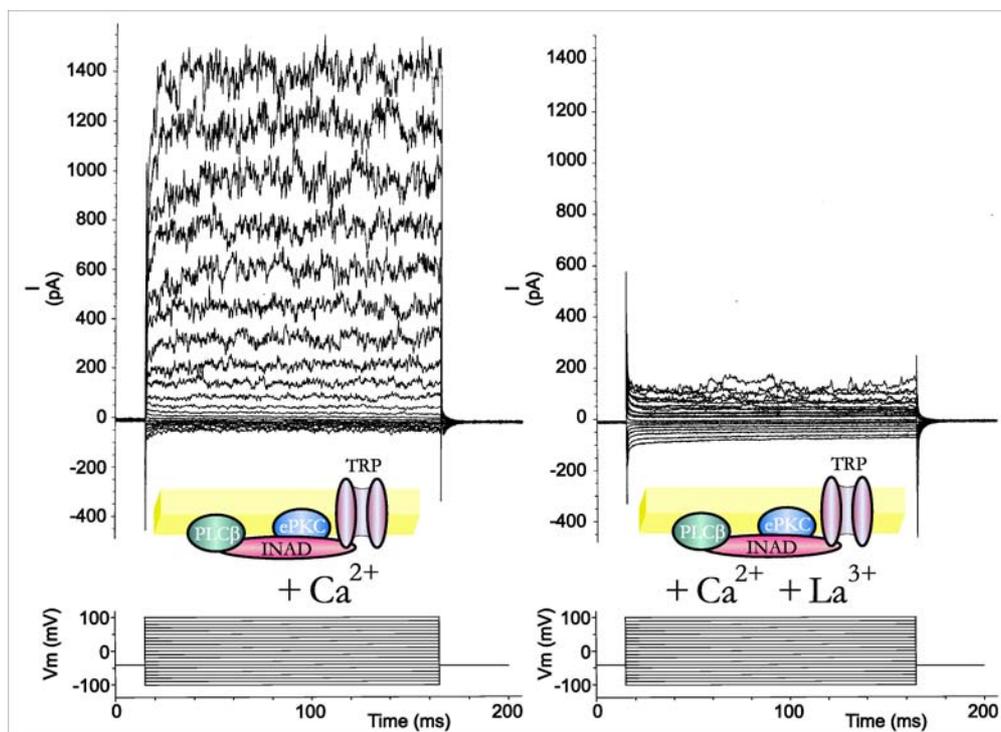


Abbildung 4.30: Inhibierender Einfluss von La^{3+} ($50 \mu\text{M}$) auf den TRP-abhängigen Ionenstrom in INAD-Komplex A8

Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt. Die ionischen Bedingungen während den Messungen entsprachen denen in Abbildung 4.29.

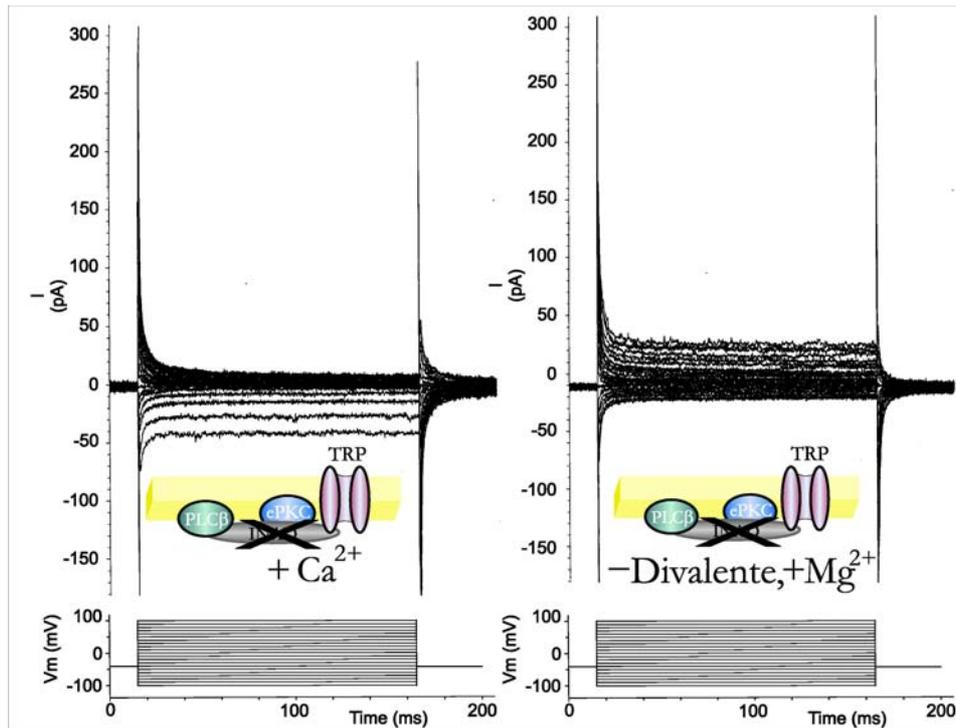


Abbildung 4.31: Funktionen von INAD: Analyse des TRP-abhängigen Ionenstroms in S2-Zellen mit Expression von rINAD-Komplex in Abwesenheit von rDmINAD-EGFP, Klon cAH12

Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt. Die ionischen Bedingungen während den Messungen entsprachen denen in Abbildung 4.29.

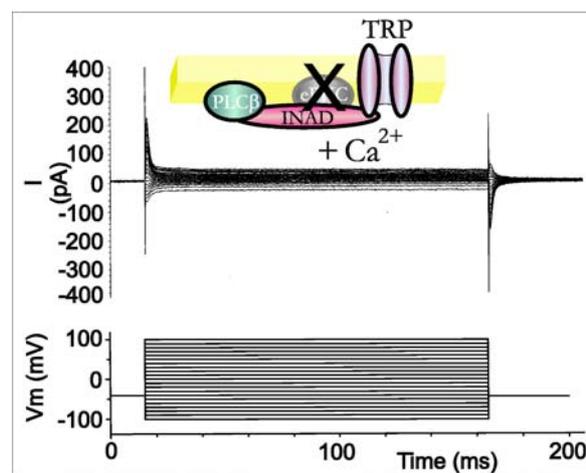


Abbildung 4.32: Elektrophysiologische Untersuchung der ePKC-Funktion im rekombinanten INAD-Signalkomplex, Klon 2-D12 mit fehlender Expression von rDmePKC

Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt. Die ionischen Bedingungen während den Messungen entsprachen denen in Abbildung 4.29.

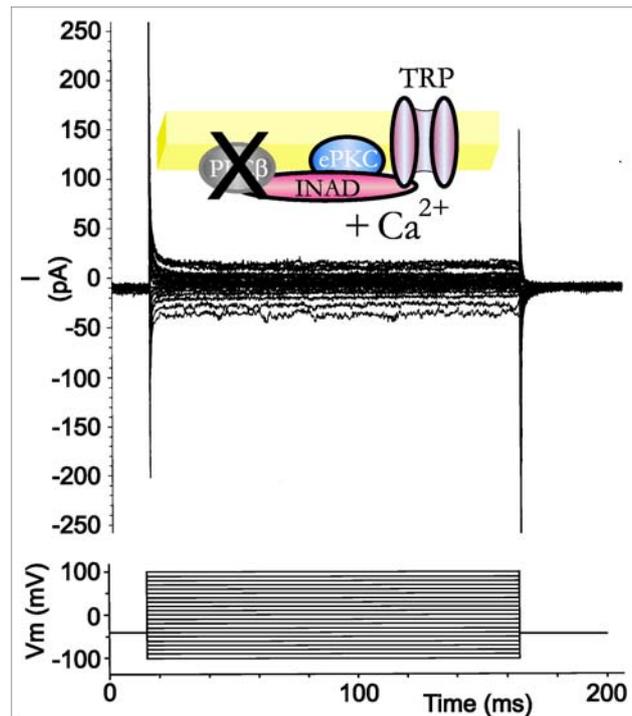


Abbildung 4.33: Rekombinante PLC β (rDmPLC β -V5-His) im rekombinanten INAD-Signalkomplex: Elektrophysiologische Analyse der Funktion durch rINAD-Komplexexpression ohne rDmPLC β -V5-His, Klon a-A1

Der elektrophysiologisch analysierte Klon a-A1 entspricht in seinem Expressionsmuster dem in Abbildung 4.19 dokumentierten Klon a-H5 der klonalen Selektion Komp[INAD;TRP;ePKC]. Im Unterschied zu a-H5 ist das Expressionsniveau von rDmTRP und von rDmePKC niedriger. Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt. Die ionischen Bedingungen während den Messungen entsprachen denen in Abbildung 4.29.

4.7 TRPL - Analyse gebildeter Ionenkanäle durch Expression im rekombinanten System S2

4.7.1 Singuläre heterologe Expression von rDmTRPL-EGFP

Das Konstrukt pMT/DmTRPL-EGFP wurde, in Co-Transfektion mit pCoHygro, via Lipofektion (Insectogen) in S2-Zellen zur rekombinanten Expression in einem photorezeptor-unabhängigen Hintergrund eingebracht. Die fluoreszenzmikroskopische Detektion des C-terminal gelegenen EGFPs zeigt die Expression des vollständigen Fusionskonstruktes und somit des gesamten DmTRPL an. Die Abbildung 4.34 dokumentiert die Fluoreszenzsignale der stabilen polyklonalen Linie S2-DmTRPL-EGFP. Aus den konfokalmikroskopischen Aufnahmen, im besonderen aber aus der Dokumentation mit einer CCD-Kamera geht hervor, dass rDmTRPL-EGFP eine niedrigere EGFP-Fluoreszenzintensität aufweist als singularär exprimiertes EGFP und rDmINAD-EGFP (Referenzen: 4.7 B [EGFP], 4.11 C

[DmINAD-EGFP]). Der konfokalmikroskopischen Dokumentation sind nur die Zellen mit hoher rDmTRPL-EGFP-Expressivität zugänglich. Die Autofluoreszenz von S2-Zellen im gelben Spektralbereich stört den Detektionsprozess. Neben schwächeren rDmTRPL-EGFP-Fluoreszenzsignalen im cytoplasmatischen Bereich ist ein von EGFP und den rekombinant exprimierten Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes abweichendes Verteilungsmuster zu beobachten: rDmTRPL-EGFP grenzt den Kernbereich (DAPI-Färbung der DNA in Abbildung 4.35) der S2-Zellen durch lokale Anhäufung scharf vom Cytoplasma ab.

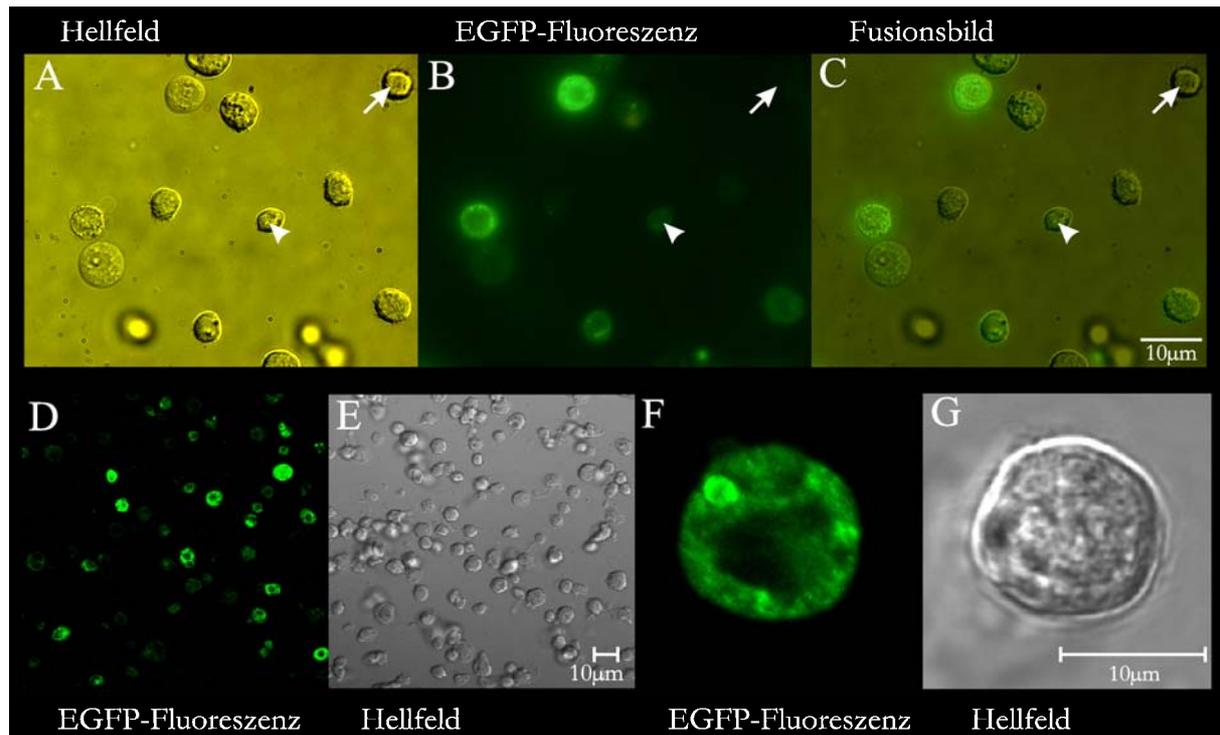


Abbildung 4.34: Differierende Signalstärke und Lokalisation der rDmTRPL-EGFP-Fluoreszenz in S2-DmTRPL-EGFP

Die Kamerabilder (A–C) der Expression von rDmTRPL-EGFP dokumentieren die vorwiegend schwache EGFP-Fluoreszenz des rekombinanten Proteins sowie die charakteristische Verteilung mit lokalen Aggregationen. Der Pfeil markiert eine nicht-exprimierende Zelle, die Pfeilspitze ein typisches schwaches Fluoreszenzsignal. Die Abbildungen D–G charakterisieren die subzelluläre Verteilung von rDmTRPL-EGFP dokumentiert durch konfokale Laserscanningmikroskopie.

Die Membranbindung von rDmTRPL-EGFP zeigen biochemische Analysen der Linie S2-DmTRPL-EGFP in Abbildung 4.36 A. Rekombinat exprimiertes DmTRPL-EGFP kann nur in SDS-Extrakten der gesamten S2-Zellen beziehungsweise in separierten Membranen detektiert werden. Die Western Blot Analysen detektieren zwei diskrete Banden in Extrakten aus S2-DmTRPL-EGFP. Das Auftreten von zwei diskreten Produkten scheint an die EGFP-Fusionsexpression gekoppelt zu sein: Western Blot Analysen von rDmINAD-EGFP zeigen ein adäquates Muster von mindestens zwei Banden (Vergleich beispielsweise Abbildung 4.6). Die apparenten Molekulargewichte der in SDS-Extrakten detektierten rDmTRPL-EGFP-Banden betragen ca. 150 kDa und 145 kDa und weichen damit nur geringfügig vom erwarteten Molekulargewicht von 152,6 kDa ab. Die Immundetektion von

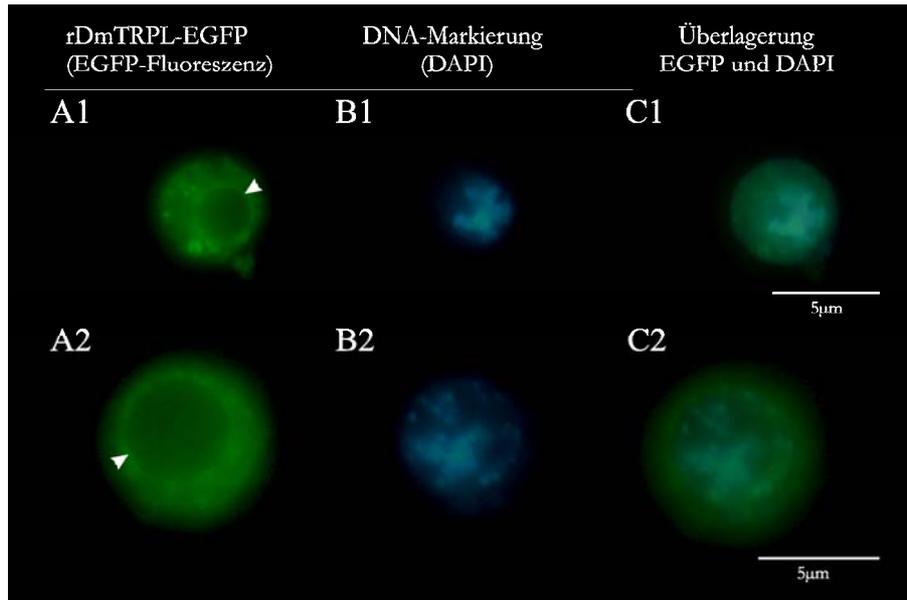


Abbildung 4.35: Abgrenzung der S2-Kernregion durch Anhäufung von rDmTRPL-EGFP mutmaßlich in umgebenden Membransystemen

Die Abbildung zeigt exemplarische Kamerabildreihen rDmTRPL-EGFP-exprimierender Zellen, bei denen der Zellkern durch DAPI-Markierung der DNA visualisiert wurde. Die Pfeilspitze markiert die scharfe Abgrenzung der Kernregion durch rDmTRPL-EGFP-Anreicherung an der Kernhülle.

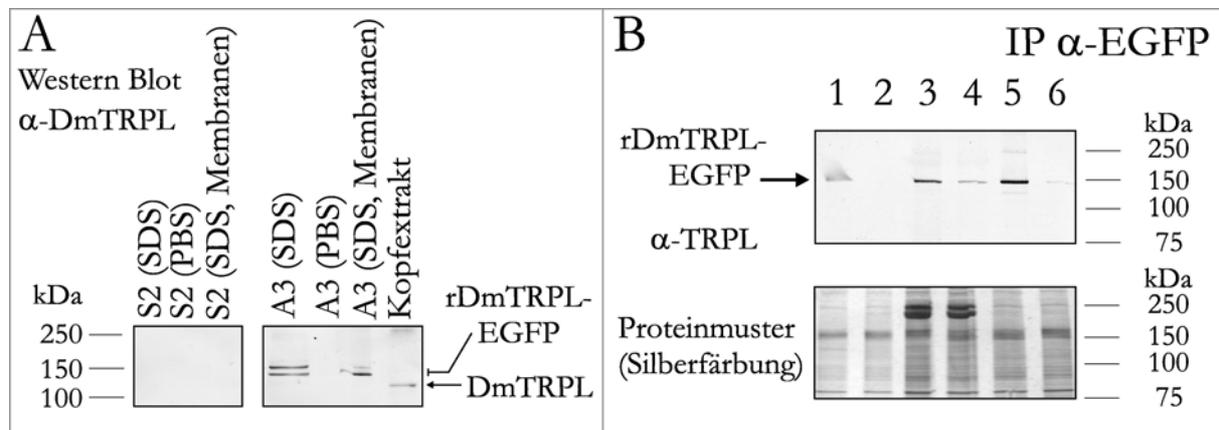


Abbildung 4.36: Nachweis der Expression von rDmTRPL-EGFP in S2-Zellen durch Immunoblot

Abbildung A: Aus Zellen der Linie S2-DmTRPL-EGFP Klon A3 und untransfizierten Zellen erfolgte die Extraktion von Proteinen mit SDS beziehungsweise PBS. Die pelletierten Zellmembranen der PBS-Extraktion wurden ebenfalls mit SDS extrahiert. Die durch SDS-PAGE separierten Proben wurden auf PVDF-Membranen transferiert und rDmTRPL-EGFP mit α -DmTRPL detektiert. Positive Kontrolle ist die DmTRPL-Detektion in SDS-Extrakten aus 5 Köpfen vom Fliegenwildtyp. Abbildung B zeigt eine Vergleichsanalyse zur Extrahierbarkeit von rDmTRPL-EGFP. Aus rDmTRPL-EGFP-exprimierenden Zellen wurde das rekombinante Protein rDmTRPL-EGFP extrahiert und mit α -EGFP immunpräzipitiert (IP). Dargestellt sind folgende Proben (IP-K: Immunpräzipitation ohne Antikörper): Extraktion mit 1% TX-100 (IP (1) und IP-K (2)), Extraktion mit 3% TX-100 (IP (3) und IP-K (4)) und Extraktion mit 1% TX-100 + 0,1% SDS (IP (5) und IP-K (6)).

rDmTRPL-EGFP in Triton X-100-Extrakten scheiterte mehrmals mit α -DmTRPL und α -EGFP (Daten nicht gezeigt). Die schwere Zugänglichkeit für rDmTRPL-EGFP durch Triton X-100-basierte Zellyse mit 1%-Tritonpuffer ist problematisch für Immunpräzipitationsexperimente. Folgeanalysen deckten auf, dass die quantitative TX-100-Extraktion von TRPL durch längere Inkubation der Proben bei mindestens Raumtemperatur möglich ist (Daten nicht gezeigt). Ebenso fördert der Zusatz von SDS in geringer Konzentration die Proteinextraktion in nicht vollständig denaturierendem Rahmen, der Immunpräzipitationen noch ermöglicht (Abbildung 4.36 B).

Einen Hinweis auf die Involvierung der Plasmamembran in die Lokalisation von rDmTRPL-EGFP und damit unabhängigen Transport des Proteins zur Zellmembran gibt die Behandlung der rDmTRPL-EGFP-exprimierenden Zellen mit TRITC-markiertem WGA ohne vorherige Permeabilisierung (Vergleich: Abbildung A.14 im Anhang).

Für ausgewählte Analysen von rekombinant in S2-Zellen exprimiertem DmTRPL-EGFP erfolgte die Selektion klonaler Linien. Den Selektionsverlauf gibt Anhang A.3 wieder. Die beiden Linien TRPL-EGFP A3 sowie TRPL-EGFP B4 zeigen eine optimale Expressionsrate von 100% Fluoreszenzsignal der lebenden Zellen und erfüllen damit das Kriterium der Monoklonalität.

4.7.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von rDmTRPL-EGFP: Bildung funktioneller Ionenkanäle in S2

Die Analyse der Funktionalität von rDmTRPL-EGFP erfolgte elektrophysiologisch mittels *whole cell recordings* (WCR). Die Abbildung 4.37 dokumentiert die Messungen der Linie S2-DmTRPL-EGFP Klon A3 in Anwesenheit von Ca^{2+} und unter Ca^{2+} -freien Bedingungen. Unter beiden Bedingungen werden konstitutive Ionenströme gemessen, deren Amplituden jedoch differieren. Die Art der Abhängigkeit des Stroms von der angelegten Haltespannung zeigt eine strikte Auswärtsgleichrichtung: die Amplituden im positiven Bereich der Strommessungen dominieren die negativen Amplituden. Besonders deutlich wird die Auswärtsgleichrichtung des Gesamtionenstroms unter Ca^{2+} -freien Bedingungen. In Anwesenheit von Ca^{2+} sinkt die Amplitude des auswärtsgerichteten Ionenstroms in den dargestellten Messungen möglicherweise durch Ca^{2+} -bedingte TRPL-Inhibition. Darüber hinaus enthüllen die WCR-Daten mit kontinuierlicher Änderung der Haltespannung einen geringen S2-endogenen Ionenstrom in Abhängigkeit von Ca^{2+} , der die Messungen der TRPL-Kanäle partiell überlagert (Dokumentation eines S2-endogenen Ionenstroms in Abbildung 4.29 b). Ein Einfluss von endogenen Kanälen ist ebenso an den Amplituden bei konstanter *clamp*-Spannung von -100 mV bis +100 mV erkennbar, die einen S2-endogenen Einwärtsionenstrom belegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass rekombinant in S2 exprimiertes DmTRPL-EGFP funktionelle Kanäle bildet. Diese Kanäle sind ebenso wie DmTRPL-basierte konstitutiv aktiv und zeigen strikte Auswärtsgleichrichtung des Ionenstroms.

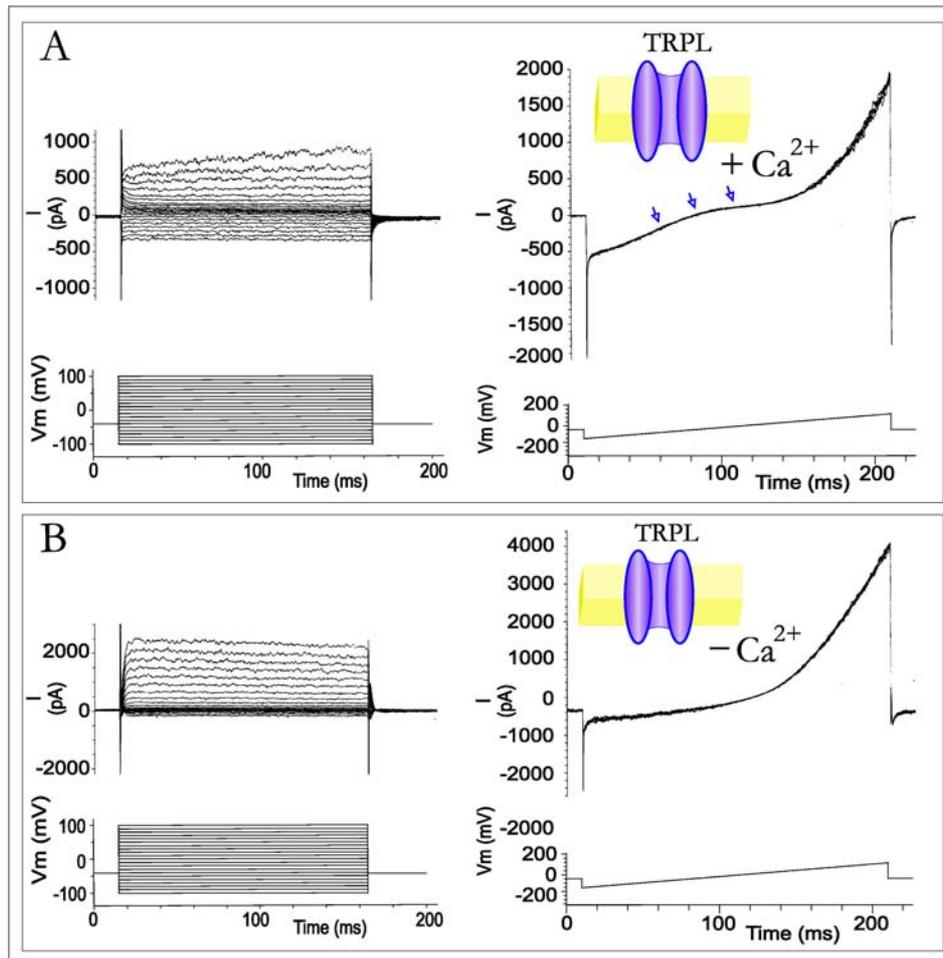


Abbildung 4.37: *Whole cell recordings* der Linie S2-TRPL-EGFP Klon A3

Die blauen Pfeile kennzeichnen einen Ca^{2+} -abhängigen S2-endogenen Ionenstrom. Die rDmTRPL-EGFP-Abhängigkeit des detektierten Ionenstroms wird durch den Vergleich mit der elektrophysiologischen Charakterisierung von S2-Zellen in Abbildung 4.29 b, oberer Teil, deutlich. Jedes Datenset repräsentiert eine individuelle Zelle. Die ionischen Bedingungen während der WCR-Messungen wurden durch die Badlösung (mM: 130 Na-Gluconat, 10 TES) und die Pipettenlösung (mM: 140 K-Gluconat, 10 TES) eingestellt, wobei $+\text{Ca}^{2+}$ 1,5 mM Ca^{2+} in der Badlösung angibt. Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt.

4.7.3 Co-Expression von TRPL mit ausgewählten INAD-Komplexkomponenten

Für die Analyse möglicher Wechselwirkungen von TRPL mit weiteren Komponenten des Signaltransduktionsweges im mikrovillären Photorezeptor von Dipteren erfolgte die Co-Expression von DmTRPL-EGFP mit ausgewählten INAD-Signalkomplexkomponenten in S2-Zellen. Die durch Lipofektion und Hygromycin B-Selektion etablierte stabile polyklonale Linie S2- e_A exprimiert rDmTRPL-EGFP in Kombination mit rDmTRP, wie die immunocytochemische Analyse zeigt (Abbildung 4.38). EGFP-Fluoreszenz markiert dabei rDmTRPL-EGFP und rDmTRP wurde mit anti-DmTRP-Antikörpern detektiert. Beide

rekombinant exprimierten Proteine co-lokalisieren partiell.

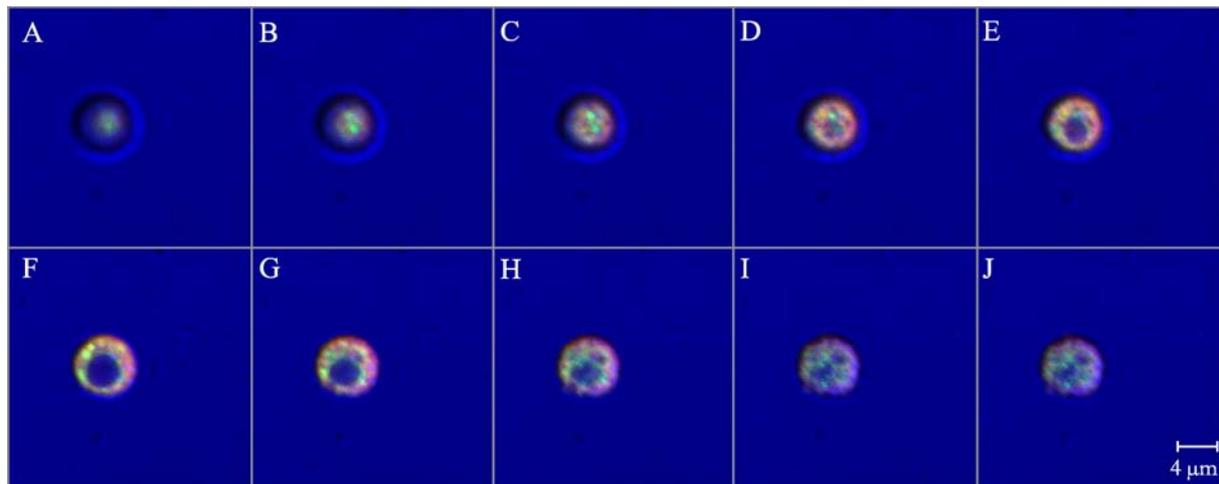


Abbildung 4.38: Co-Expression von rDmTRP (rot) und rDmTRPL-EGFP (grün) in S2: Nachweis und subzelluläre Verteilung der Expressionsprodukte mit Co-Lokalisation (gelb) in optischen Querschnitten einer Zelle

Die Proteine DmTRP und DmTRPL weisen über 40% Aminosäureidentität auf (PHILLIPS *et al.*, 1992), unterscheiden sich jedoch deutlich in der distalen C-terminalen Region hinsichtlich ihrer Primärstruktur. Der Antikörper α -DmTRP_{#088} erkennt das TRP-Protein im C-terminalen Bereich, was eine Kreuzreaktion mit DmTRPL unwahrscheinlich macht. Die exklusive Erkennung von DmTRP durch α -DmTRP_{#088} mit fehlender DmTRPL-Kreuzreaktion wurde aufgrund der Bedeutung für die Analysen DmTRP / DmTRPL-co-exprimierender Linien experimentell verifiziert (Abbildung A.11).

Aus S2-e_A gingen durch klonale Selektion die Linien e-H2 und e-A8 hervor (Selektionsbeschreibung in Kapitel 4.5.2). Beide Linien zeigen unter optimalen Wachstumsbedingungen eine induzierte rDmTRPL-EGFP-Expression von 100% der lebenden Zellen und sind somit monoklonal für rDmTRPL-EGFP. Die immunocytochemische Analyse der Klone e-H2 (Abbildung 4.39) und e-A8 (siehe Anhang A.6) zeigt für beide Linien die Co-Expression und partielle Co-Lokalisation von rDmTRPL-EGFP und rDmTRP. Die Co-Expression von rDmTRP wird biochemisch durch Immunpräzipitation mit folgender α -DmTRP-Immundetektion für die Linien e-H2 und e-A8 verifiziert (Abbildung 4.40).

Die Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit generierten S2-Linien mit rekombinanter Expression von Signalmolekülen der Phototransduktion von *D. melanogaster* legen nahe, die Ionenkanalproteine TRP und TRPL auch gemeinsam rekombinant vor dem Hintergrund des rINAD-Signalkomplexes zu analysieren. Sowohl biochemische als auch elektrophysiologische Untersuchungen der Co-Expression von TRP und TRPL können keine Interaktion beider Proteine nachweisen beziehungsweise keinen Einfluss von TRP auf den TRPL-abhängigen Ionenstrom detektieren (Punkt 4.7.4). Die physiologischen Analysen des rekombinanten INAD-Signalkomplexes in Referenz zu denen der Teilkomplexe

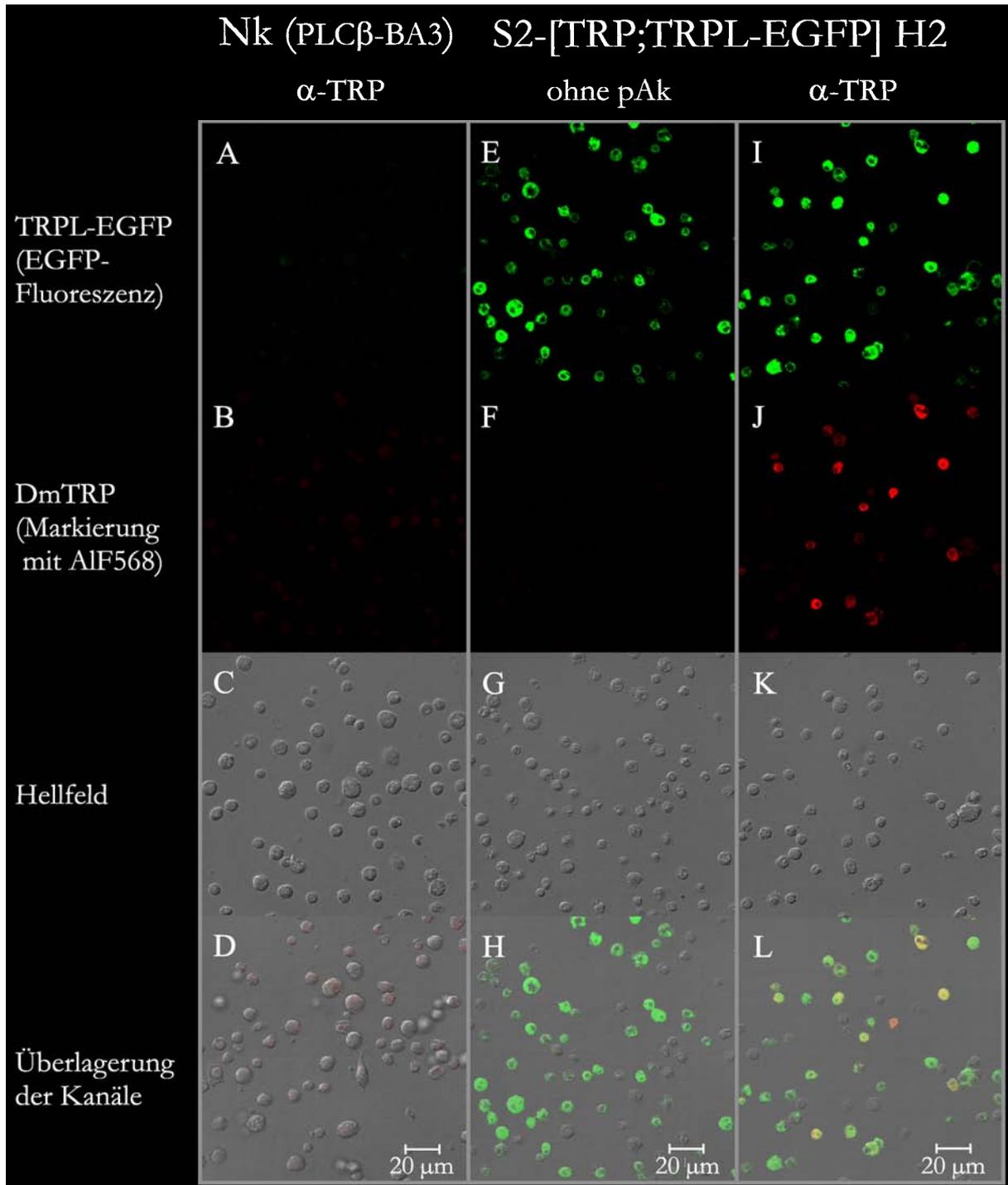


Abbildung 4.39: Dokumentation der rekombinanten Expression und subzelluläre Lokalisation von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP in Klon e-H2 (S2-[TRP;TRPL-EGFP])
Nk: Negativkontrolle, pAk: primärer Antikörper

belegen, dass rDmTRP nur bei Co-Expression der vier Hauptkomponenten des INAD-Komplexes funktional ist (Abschnitt 4.6.4).

Die Beobachtung sinkender Expressionsniveaus bei steigender Zahl an co-transfizierten Expressionskonstrukten deutet an, dass der biochemische Nachweis aller exprimierten

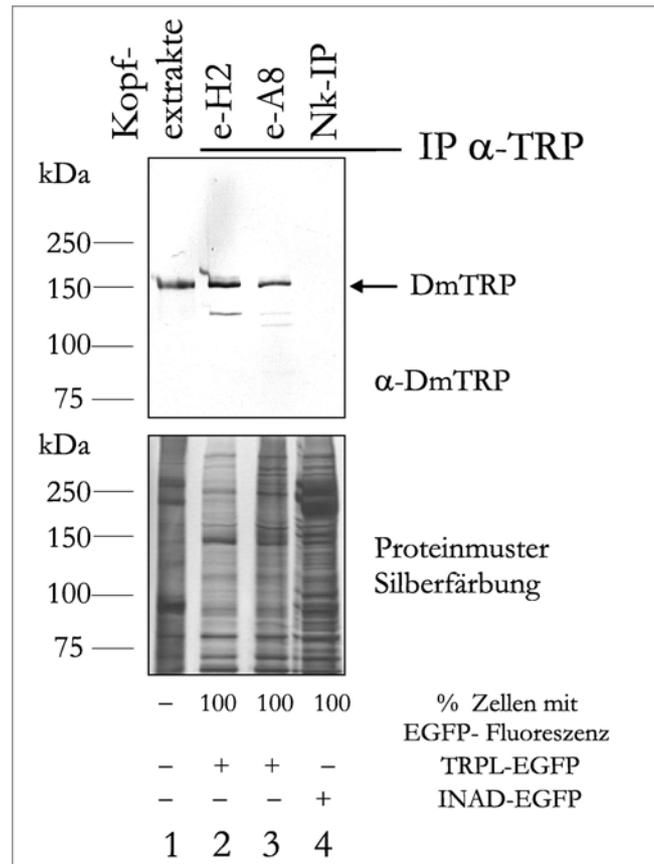


Abbildung 4.40: Biochemische Dokumentation der rekombinanten DmTRP-Expression in den rDmTRPL-EGFP monoklonalen Linien S2-e-H2 und S2-e-A8. Die TX-100-Extrakte der Linien S2-[DmTRP;DmTRPL-EGFP] Klon H2 (Spur 2) und Klon A8 (3) sowie der Negativkontrolle (Nk-IP) S2-DmINAD-EGFP Klon A1 (4) wurden mit α -DmTRP immunpräzipitiert. Als positive Kontrolle für den Immunoblot wurde SDS-Extrakt aus drei Fliegenköpfen verwendet (1).

Proteine in Linien mit Co-Expression von fünf Konstrukten schwierig bis unmöglich ist. Zur Sicherstellung der Co-Expression von rDmINAD-EGFP, rDmPKC, rDmTRP und rDmPLC β -V5-His in den angestrebten Linien Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC;TRPL] erfolgte daher die Verwendung der INAD-Komplex-Klone E4 und A8 als Ausgangslinien der Transfektionsprozedur. Anhand der EGFP-Fluoreszenz des rDmINAD-EGFP-Fusionsproteins kann stellvertretend die Expression des rINAD-Komplexes visualisiert werden. Für den Nachweis der TRPL-Expression in einem rDmINAD-EGFP-Hintergrund erfolgte die Erstellung und Transfektion eines TRPL-Fusionskonstruktes mit C-terminaler Kopplung des rot fluoreszierenden Proteins HcRed (pMT-DEST/DmTRPL-HcRed). Analog zu C-terminalem EGFP weist fusioniertes HcRed die korrekte Expression nach. Die resultierenden Linien A8-rDmTRPL-HcRed und E4-rDmTRPL-HcRed (polyklonal für rDmTRPL-HcRed) zeigen bei fluoreszenzmikroskopischer Analyse die Co-Expression von rDmINAD-EGFP und rDmTRPL-HcRed in ausgewählten Zellen (Dokumentation für A8-rDmTRPL-HcRed in Abbildung 4.41). In diesen Linien wird in einem hohen Anteil der Zellen transfiziert mit rDmTRPL-HcRed durch die Expression des neu transfizier-

ten Konstruktes die Visualisierung von rDmINAD-EGFP via EGFP-Fluoreszenz unterdrückt. Mutmaßlich ist die Expression von rDmTRP, rDmPKC und rDmPLC β -V5-His in diesen Zellen ebenfalls drastisch reduziert. Für Einzelzellanalysen empfiehlt sich die fluoreszenzmikroskopische Verifizierung der detektierbaren Co-Expression von rDmTRPL-HcRed und rDmINAD-EGFP, wobei beide Fluoreszenzen eine stark reduzierte Intensität gegenüber singulärer Expression zeigen (Abbildung 4.41).

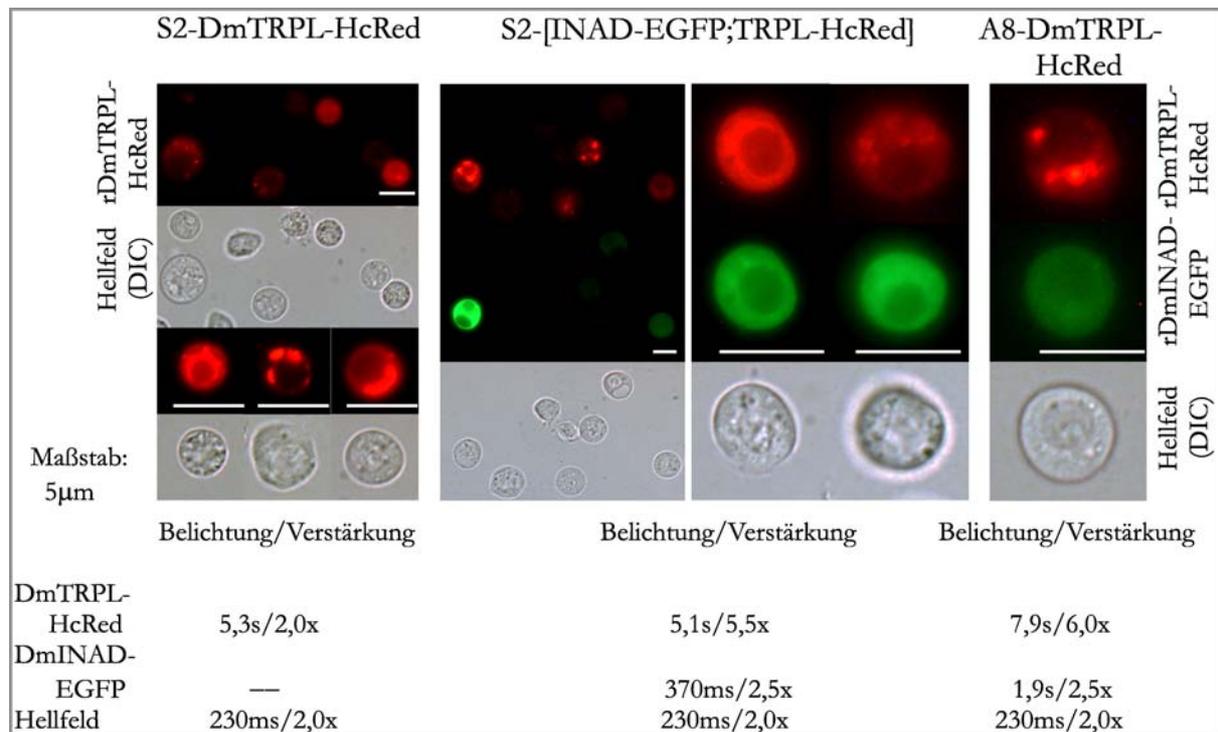


Abbildung 4.41: Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der rDmTRPL-HcRed- und der rDmINAD-EGFP-Expression in Linien polyklonal für rDmTRPL-HcRed: Co-Expressionprodukte senken die Fluoreszenzintensität des jeweils untersuchten Fluorophor-Expressionsproduktes drastisch

Die Bilder wurden aufgenommen mit der CCD-Kamera Leica DC200 am Mikroskop Leica TCS SP (Leica DMIRBE). Angegeben sind die Belichtungszeiten sowie der Verstärkungsfaktor bei gleichbleibender Intensität des Durchlichtes beziehungsweise des Anregungslichtes für die Fluoreszenzen. Die Erhöhung von Belichtungszeit und Verstärkungsfaktor dokumentieren die fallende Fluoreszenzsignalintensität mit steigender Zahl der Co-Expressionsprodukte. Die vergrößerte Darstellung ausgewählter Zellen der erstellten Bilddokumentationen unterstützt die Analyse der subzellulären Verteilungsmuster. Ausgewählt wurden jeweils die Zellen mit den stärksten Fluoreszenzintensitäten.

Die pCoHygro-basierte stabile Transfektion von pMT-DEST/DmTRPL-HcRed in die bereits Hygromycin B-resistenten Linien E4 und A8 resultierte in der Etablierung von Kulturen, die über mehrere Passagen hinweg mit unveränderter Penetranz rDmTRPL-HcRed co-exprimieren (untersucht: 10 Passagen). Offensichtlich kommt es erneut zur stabilen Integration des transfizierten Konstruktes.

Als Referenz zur Co-Expression von rDmTRPL-HcRed in A8-DmTRPL-HcRed und E4-DmTRPL-HcRed unter Bedingungen an der Grenze des verwendeten Expressionssystems

wurden die stabilen polyklonalen Linien S2-DmTRPL-HcRed zur Untersuchung der singulären rDmTRPL-HcRed-Expression und S2-[INAD-EGFP;TRPL-HcRed] zur Bewertung der Co-Expression erstellt und die rekombinanten Expressionsprodukte in Abbildung 4.41 dokumentiert. Das Lokalisationsmuster von rDmTRPL-HcRed stimmt in allen generierten Linien unabhängig von Co-Expressionsprodukten überein. Rekombinantes DmTRPL-HcRed ist vielfach in Aggregationen innerhalb der gesamten Zelle lokalisiert. Dieses Muster entspricht den intensiven EGFP-Fluoreszenzsignalen der Linie S2-DmTRPL-EGFP Klon A3. Die zusätzliche homogene Verteilung innerhalb der rekombinant exprimierenden S2-Zellen ist im roten Fluoreszenzkanal mit höherem Hintergrundsignalniveau im Gegensatz zum EGFP-Nachweis nur in geringerem Ausmaß dokumentierbar.

4.7.4 Interaktionsanalysen: Assemblierungsstudien an co-exprimiertem rDmTRPL-EGFP und Charakterisierung physiologischer Einflüsse der Co-Expression

Ein unzureichend analysierter Aspekt der Phototransduktion im mikrovillären Photorezeptor von *D. melanogaster* ist die diskutierte Bildung funktioneller heteromerer Kanäle aus TRP- und TRPL-Proteinuntereinheiten. Die dokumentierte Interaktion beider Kanalproteine bei rekombinanter Expression in HEK 293T-Zellen (XU *et al.*, 1997) lässt Fragen zur generellen Assemblierung offen, da eine stabile Assoziation von TRP und TRPL im Fliegenphotorezeptor im Gegensatz zur Interaktion von TRP und INAD nicht mehrfach unabhängig belegt werden konnte. Ebenso ungeklärt ist der Beitrag möglicher heteromerer Kanäle zur Photorezeptorantwort. Die heterologe Co-Expression von DmTRP und DmTRPL-EGFP in einem weiteren photorezeptorunabhängigen Hintergrund (S2-Linien e-H2 und e-A8) kann Beiträge zur Klärung offener Fragen leisten. Mögliche Interaktionen zwischen rDmTRPL-EGFP und den Co-Expressionsprodukten wurden mittels Immunpräzipitation und Analyse von Co-Präzipitationsprodukten untersucht.

Die Versuche in Darstellung 4.42 dokumentieren beispielhaft mehrfache Versuche zur Co-Präzipitation von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP aus co-exprimierenden Linien (e, e-H2, e-A8). Die Abbildung zeigt die Präzipitation von rDmTRPL-EGFP aus S2-[TRP;TRPL-EGFP] mit α -EGFP. Wenn rDmTRP co-präzipitiert wird, dann nur in Mengen, die im Immunoblot nicht nachweisbar sind. Das Vorhandensein von rDmTRP im Extrakt wurde durch Präzipitation mit α -DmTRP gezeigt. In keinem der IP-Ansätze mit α -DmTRP oder α -EGFP gegen rDmTRPL-EGFP konnten beide Proteine erfolgreich co-präzipitiert werden. Es erfolgt ausschließlich die Präzipitation des direkt erkannten Proteins. Festzuhalten ist, dass bei exklusiver Expression der beiden lichtabhängigen Ionenkanäle DmTRP und DmTRPL der Photorezeptoren von *Drosophila* in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund (S2-Zellen) keine biochemisch durch Immunpräzipitation detektierbare Bildung heteromultimerer Kanäle aus beiden Kanaluntereinheiten erfolgt.

Protein-Protein-Interaktionen können, neben Co-Immunpräzipitationen, auch durch die Analyse der wechselseitigen physiologischen Wirkungen charakterisiert werden. Neben ei-

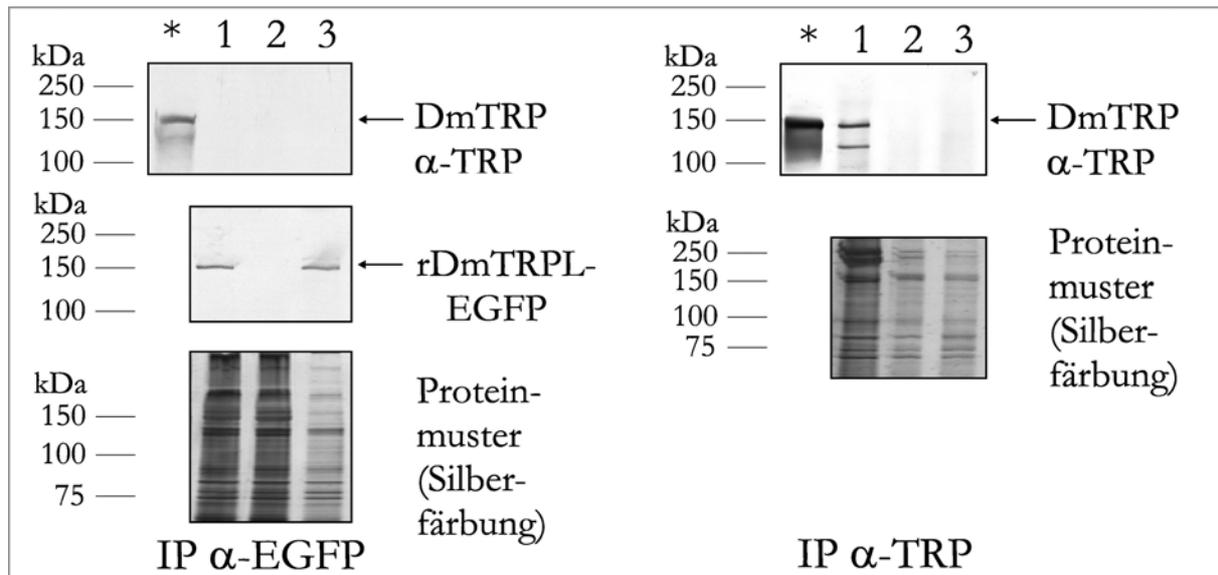


Abbildung 4.42: Co-Immunpräzitationsanalysen aus S2-[TRP;TRPL-EGFP] mit Co-Expression von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP

Die Proben sind gekennzeichnet durch: 1) IP aus S2-[TRP;TRPL-EGFP], 2) IP ohne Antikörper (Negativkontrolle) aus S2-[TRP;TRPL-EGFP] und 3) IP aus S2-DmTRPL-EGFP als Positivkontrolle für immunpräzipitiertes rDmTRPL-EGFP. Die DmTRP-Detektion in Western Blot Analysen wird verifiziert durch *Drosophila* Kopfextrakte (*, positive Kontrolle).

ner Zahl weiterer photorezeptorspezifisch exprimierter Proteine mit Einflüssen auf die Aktivität von TRPL durch Proteininteraktionen (Referenzen unter 2.3.2) ist die TRPL-Regulation durch TRP bei heterologer Co-Expression in HEK-Zellen anhand von elektrophysiologischen Daten beschrieben worden (XU *et al.*, 1997). Zur Analyse einer Wechselwirkung von rDmTRPL-EGFP mit rDmTRP im rekombinanten Expressionssystem S2 wurden die Ionenströme (WCR) in der Linie e-H2 in Referenz zur singulären rDmTRPL-EGFP-Expression gemessen. Aus den beispielhaften Daten der Abbildung 4.43 leitet sich ab, dass die Co-Expression von rDmTRPL-EGFP und rDmTRP zu keiner Veränderung der elektrophysiologisch erfassten Parameter gegenüber der singulären rDmTRPL-EGFP-Expression führt. Es sind weder Veränderungen der Amplitude (verschiedene Stromstärken im Rahmen der Messungen einzelner Zellen müssen berücksichtigt werden) noch der Regulation (weiterhin konstitutive Aktivität) nachzuweisen. Die WCR-Daten zeigen keinen Hinweis auf eine physiologische Aktivität von rDmTRP in e-H2.

Die Interaktionsanalysen einer physischen Kopplung von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP (Co-Immunpräzitationen) können in Übereinstimmung mit Untersuchungen physiologischer Einflüsse von rDmTRP auf rDmTRPL-EGFP (*whole cell recordings*) keine Hinweise auf Heteromerisierung beider Kanaluntereinheiten im rekombinanten System S2 belegen.

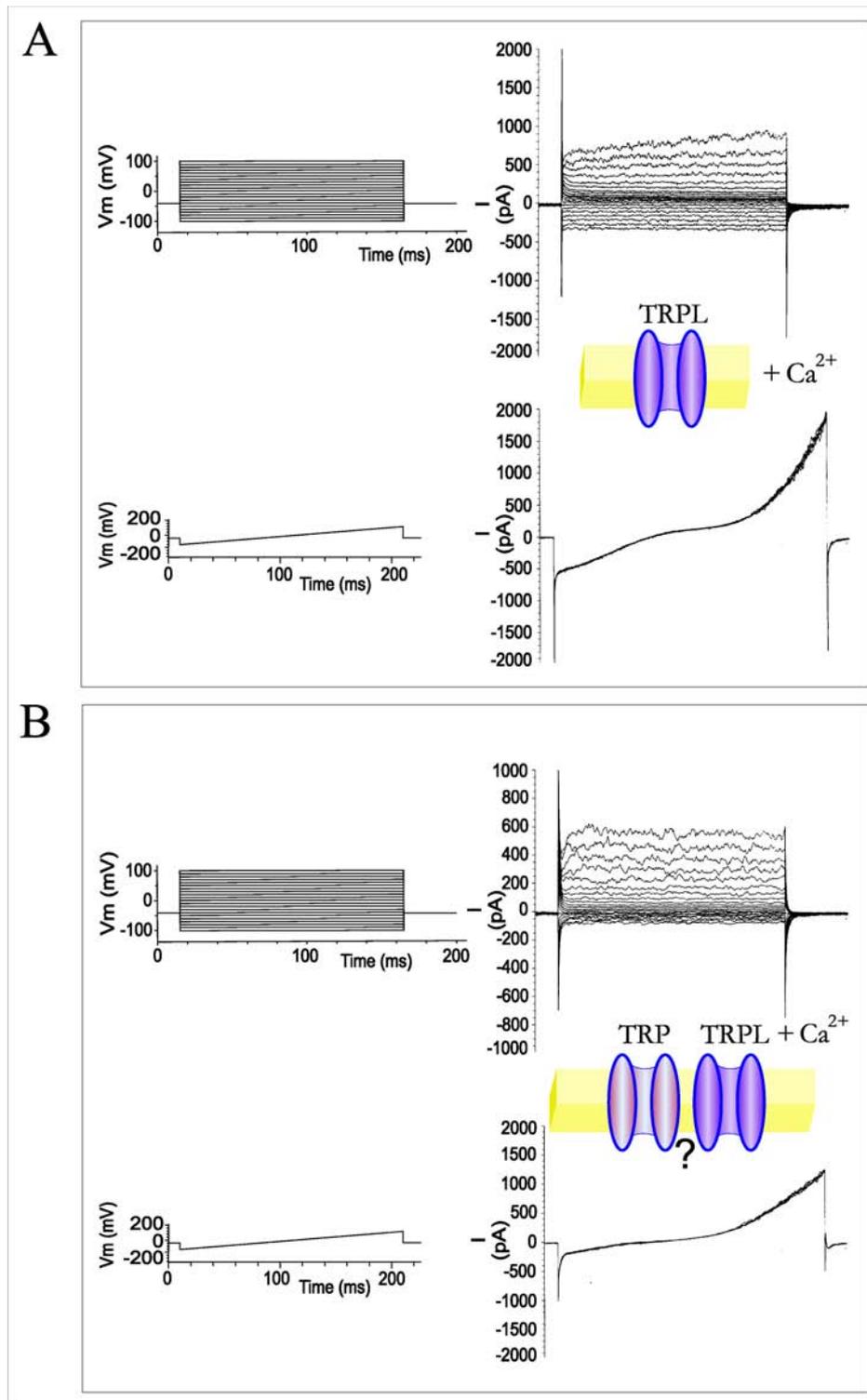


Abbildung 4.43: Elektrophysiologische Analyse des rDmTRPL-EGFP-abhängigen Ionenstroms bei Co-Expression von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP

Die Abbildungsteile dokumentieren *whole cell recording*-Analysen individueller Zellen der Linien S2-DmTRPL-EGFP Klon A3 (A, siehe auch Abbildung 4.37) und von S2-[TRP;TRPL-EGFP] e-H2 (B). Die ionischen Bedingungen während der WCR-Messungen wurden durch die Badlösung (mM: 130 Na-Gluconat, 10 TES) und die Pipettenlösung (mM: 140 K-Gluconat, 10 TES) eingestellt, wobei +Ca²⁺ 1,5 mM Ca²⁺ in der Badlösung angibt. ? deutet an, dass eine Heteromerisierung umstritten ist und nicht belegt werden kann. Die elektrophysiologischen Registrierungen (WCR-Daten) wurden von Herrn Dror Segal (Hebrew-Universität Jerusalem, Israel) durchgeführt und für diese Abbildung zur Verfügung gestellt.

4.8 Paramyosin - Identifizierung eines neuen Interaktionspartners des INAD-Komplexes?

Die Funktionen des INAD-Signalkomplexes stehen im Zusammenhang mit den Funktionen der Komplexmitglieder. Neben der Assoziation der Kernkomplexkomponenten des INAD-Komplexes wird die Anbindung weiterer Proteine, möglicherweise temporär, diskutiert. Die Identifizierung temporärer Interaktionspartner des INAD-Signalkomplexes kann hilfreich für das Verständnis der Komplexfunktionen sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Immunpräzipitationen des INAD-Signalkomplexes aus Köpfen von *D. melanogaster* für Untersuchungen der verschiedensten Aspekte. Im Vergleich beispielsweise zur Immunpräzipitation des rekombinanten INAD-Signalkomplexes aus S2-Zellen zeigen diese Präzipitationen hauptsächlich die vier zentralen Komponenten INAD, ePKC, PLC β und TRP (Beispiele in Abbildung 4.44 A). Darüber hinaus ist in einigen Fällen eine weitere prominente Proteinbande im Immunpräzipitat zu beobachten. Diese Bande besitzt auf SDS-PAGE-Gelen ein apparentes Molekulargewicht von etwa 105 kDa (4.44 A).

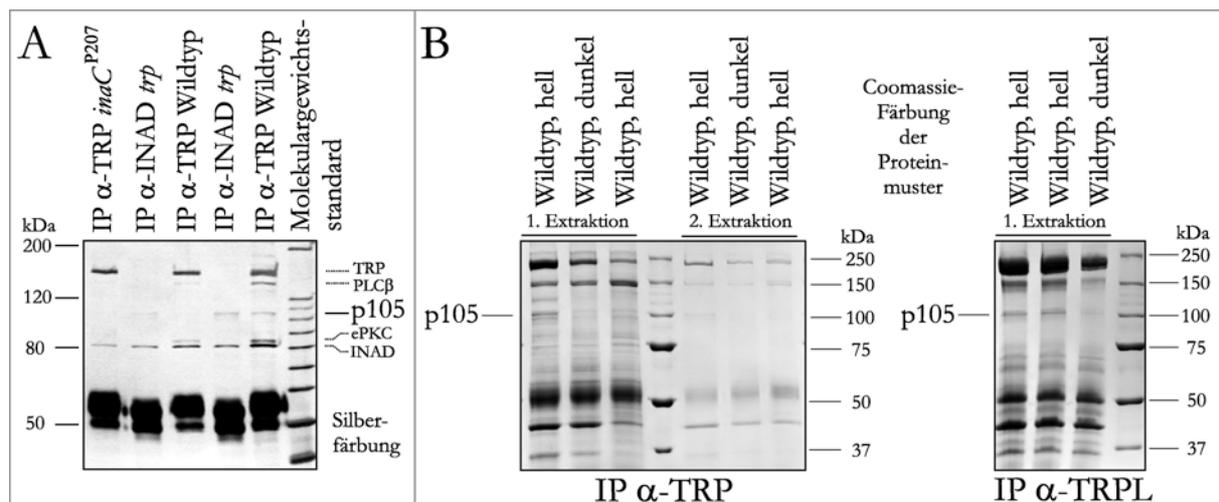


Abbildung 4.44: Immunpräzipitationen des INAD-Signalkomplexes aus Wildtypfliegen und Mutanten co-präzipitieren ein weiteres Protein: p105

Einige Immunpräzipitate aus Tritonextrakten von Köpfen zeigen neben Kernkomponenten des Komplexes ein weiteres Protein: p105 (A). Das Fehlen einzelner Komplexkomponenten im Immunpräzipitat dargestellter Mutanten beruht mutmaßlich auf der beschriebenen raschen Degradation von INAD-Komplexkomponenten in Mutanten. Immunpräzipitationen aus Triton X-100-Extrakten ganzer Fliegen zeigen lichtabhängig Schwankungen der Co-Präzipitation von p105 mit dem INAD-Signalkomplex (B).

Eingehendere Analysen zur Identifizierung der Bedingungen, unter denen p105 mit dem INAD-Signalkomplex co-präzipitiert, identifizierten in mehreren Analysen eine Abhängigkeit der Co-Präzipitation von den Lichtbedingungen (Beispielabbildung 4.44 B). Wird in diesen Experimenten der INAD-Komplex aus Fliegen präzipitiert, die an Raumlicht adaptiert sind, erfolgt die Co-Präzipitation von p105 als sich vom Hintergrund deutlich abhebende Bande im Proteinmuster. Im Gegensatz dazu steht das Präzipitationsmuster

aus dunkeladaptierten Kontrollfliegen: das Protein p105 ist nur sehr schwach im Proteinmuster zu identifizieren. Die exakten Lichtbedingungen der Co-Immunpräzipitation von p105 mit dem Signalkomplex konnten jedoch nicht bestimmt werden, da die Reproduzierbarkeit der lichtabhängigen Co-Präzipitation durch verschiedene Experimente in Frage gestellt wird. Einerseits ist p105 teilweise unter Raumlichtbedingungen in Verbindung mit Blaubelichtung (2–3 h) zur anhaltenden Aktivierung der Phototransduktion im Immunpräzipitat nicht nachweisbar. Andererseits zeigen Kontrollproben aus Köpfen dunkeladaptierter Fliegen, die im Rotlicht präpariert wurden, co-präzipitiertes p105 (Daten nicht gezeigt). Obwohl die exakten Co-Präzipitationsbedingungen nicht zweifelsfrei geklärt sind, spricht die Zugänglichkeit von p105 bei Präzipitation mit α -DmTRP, mit α -DmTRPL III und mit α -DmINAD für eine robuste und eher spezifische Interaktion dieses Proteins mit dem INAD-Signalkomplex. Diese beobachteten Proteinassoziationen sind Hintergrund der Versuche zur Identifizierung von p105 durch Massenspektrometrie.

Für massenspektrometrische Analysen wurden die benötigten Materialmengen durch Präzipitation aus ganzen Fliegen mit α -DmTRP beziehungsweise α -DmTRPL III nach dem Standardprotokoll (Abschnitt 3.6.6.1) gewonnen. Die Exzision von p105 aus SDS-PAGE-Gelen schloss sich an die Coomassie-Färbung des Proteinmusters an (Banden der Abbildung 4.44 B). Das erhaltene Material wurde tryptisch fragmentiert und anschließend in Matrix (α -cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, Protokoll siehe unter 3.6.7) für MALDI-TOFF-Analysen auf dem Probenträger kristallisiert. Die erhaltenen Massenspektren der beiden unabhängigen Proben identifizierten p105 bei computergestützter Datenbankrecherche (MASCOT-Search) in beiden Fällen als Paramyosin von *D. melanogaster* mit einem Molekulargewicht von ca. 102 kDa (Massenspektrum der α -DmTRP-IP in Abbildung 4.46). Paramyosin ist charakterisiert als Komponente des Kerns dicker Filamente von Invertebraten. Es ist kein Homolog von Vertebraten bekannt. Paramyosin kommt besonders häufig in nicht-fibrillären Muskeln vor und ist hauptsächlich in der Flugmuskulatur untersucht. Für Paramyosin ist die Interaktion mit Myosin beschrieben. Die Isolierung des Materials für massenspektrometrische Analysen durch Immunpräzipitation aus ganzen Fliegen legt bei einer Identifizierung des untersuchten Proteins als Muskelfilamentkomponente die Überlagerung mit Verunreinigungen aus Muskelgewebe nahe. Um Artefakte dieser Art zu umgehen, erfolgte die Präzipitation des INAD-Signalkomplexes bei verschiedenen Lichtbedingungen (Raumlicht und Blaubelichtung versus Dunkeladaptation und Rotlicht) auch aus isolierten Membranen separierter Köpfe. Das Präzipitationsmuster einer α -DmTRP-Präzipitation, dargestellt in Abbildung 4.45, dokumentiert die Co-Präzipitation von p105 mit dem INAD-Signalkomplex auch aus isolierten Kopfmembranen. Das durch MALDI-TOFF-Analyse erhaltene Massenspektrum (nicht dargestellt) dieser Bande identifiziert das Protein ebenfalls als Paramyosin.

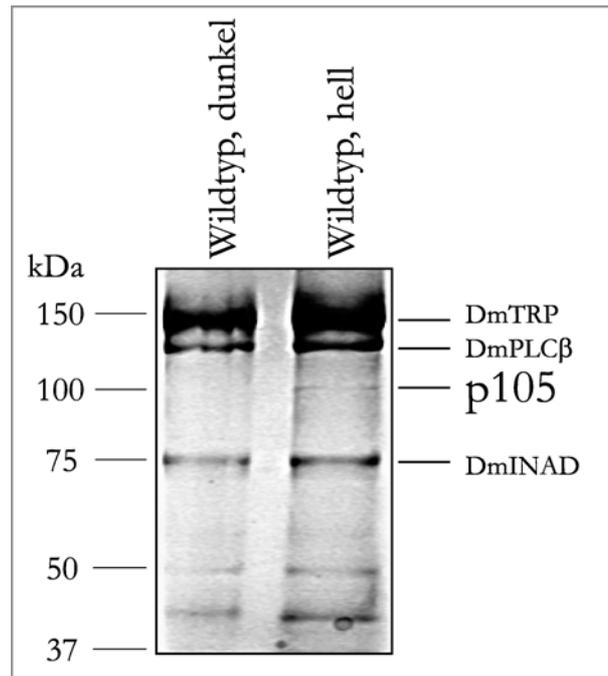
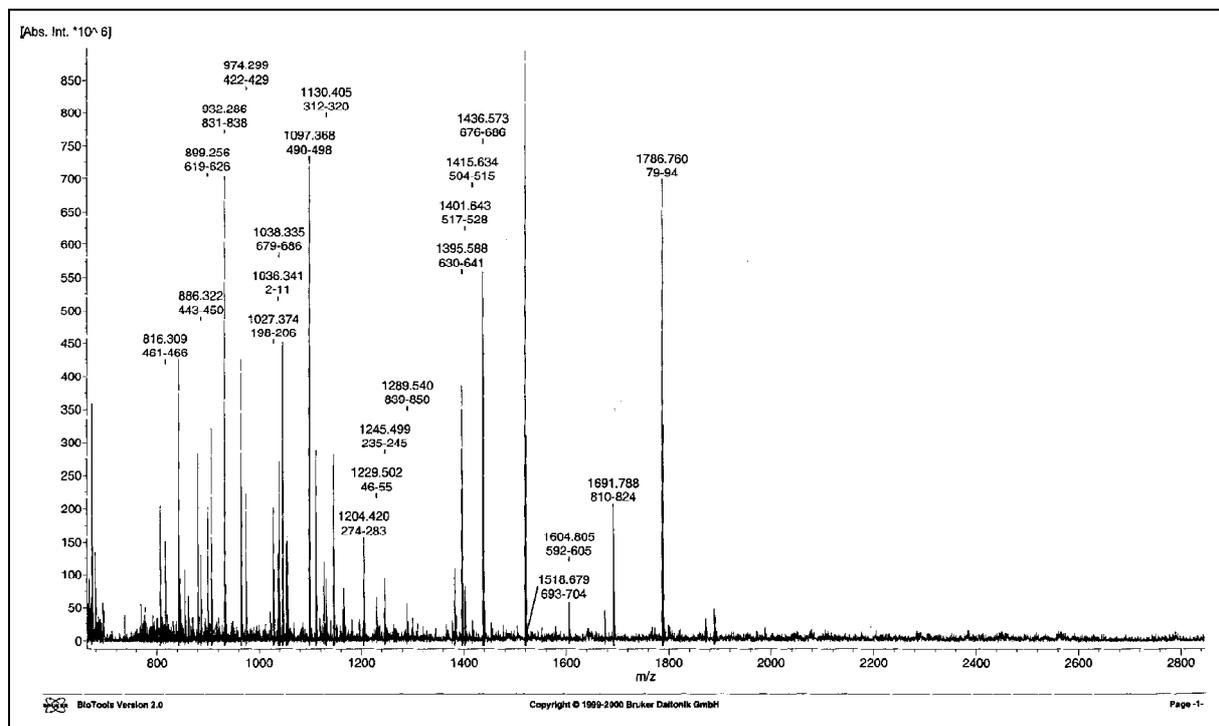


Abbildung 4.45: Co-Immunpräzipitation von p105 mit dem INAD-Signalkomplex aus isolierten Kopfmembranen von *D. melanogaster*

Das dargestellte Proteinmuster einer α -DmTRP-IP wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Immunpräzipitation erfolgte unter differierenden Lichtbedingungen aus Extrakten gewonnen aus isolierten Kopfmembranen von je 600 Fliegenköpfen. Die fehlende Co-Immunpräzipitation von ePKC im Proteinmuster beruht vermutlich auf Degradation der im Vergleich zu den übrigen Hauptkomponenten des INAD-Komplexes instabilen DmePKC.



(a) MALDI-TOFF-Massenspektrum von p105: Identifizierung als Paramyosin

Beobachtete Masse	Theoretische Masse monoisotopisch ⁺	Ionentyp	identifizierte Sequenz**	Spaltung	
				vollständig	unvollständig
816.309	815.425*	MH ⁺	461-466*		+
886.322	886.4741	MH ⁺	443-450	+	
899.256	899.4329	MH ⁺	619-626	+	
932.286	932.4319	MH ⁺	831-838	+	
	932.4584	MH ⁺	304-311	+	
974.299	974.4650	MH ⁺	422-429	+	
	974.4789 !	MH ⁺	509-516	+	
	974.4789 !	MH ⁺	312-319	+	
1027.374	1027.5531	MH ⁺	198-206	+	
1036.341	1035.531*	MH ⁺	2-11*		+
1038.335	1037.514*	MH ⁺	679-686*		+
1097.368	1097.5374	MH ⁺	490-498	+	
1130.405	1129.573*	MH ⁺	312-320*		+
1204.420	1205.5545	MH ⁺	274-283	+	
1229.502	1229.6372	MH ⁺	46-55	+	
1245.499	1245.6433	MH ⁺	235-245	+	
1289.540	1289.6695	MH ⁺	839-850	+	
1395.588	1395.6750	MH ⁺	630-641	+	
1401.643	1401.7332	MH ⁺	517-528	+	
1415.634	1414.730*	MH ⁺	504-515*		+
1436.573	1435.742*	MH ⁺	676-686*		+
1518.679	1518.7295	MH ⁺	693-704	+	
1604.805	1604.8391	MH ⁺	592-605	+	
1691.788	1691.8195	MH ⁺	810-824	+	
1786.760	1786.7990	MH ⁺	79-94	+	

⁺: PeptideMass-Berechnung für monoisotopische Peaks
* : Mascot-Referenzwert (MH⁺ Durchschnittswert),
Referenzwerte des Mascot-Programms abweichend (keine monoisotopischen Peaks)
** : Primärstrukturpositionsangaben nach Sequenzreferenz CAA41557 mit einer Protein-
sequenzabweichung an Position 500 im Vergleich zu P35415 und S22028
! : verschiedene Fragmente mit identischer Masse können nicht unterschieden werden

(b) Massenspektrometrische Analyse des Trypsinverdaus von p105: Identifizierung als Paramyosin.

MH⁺ bezeichnet einfach protonierte Peptide.

Abbildung 4.46: MALDI-TOFF-Massenspektrum von p105 (Präparation: α -DmTRP-IP aus ganzen Fliegen) nach tryptischer Fragmentierung

Die massenspektrometrische Identifizierung von p105 erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Kristina Hartmann. Das dargestellte Spektrum sowie die computergestützte Auswertung wurden dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Die dargestellten Studien belegen eine Co-Präzipitation von p105, identifiziert als Paramyosin, mit einer oder mehreren Komponenten des INAD-Signalkomplexes, wobei der oder die direkten Interaktionspartner sowie der Interaktionsmechanismus ungeklärt bleiben.

5 Diskussion

Der INAD-Signalkomplex ist integraler Bestandteil der Phototransduktion im visuellen System der Diptere *Drosophila melanogaster*. Als Funktionen werden beschleunigte Signalleitung und -wandlung, erhöhte Spezifität sowie die korrekte Lokalisation und Verankerung der Signalmoleküle in den lichtabsorbierenden Strukturen der Photorezeptorzellen, den Rhabdomeren (hochgeordnete mikrovilläre Membranstrukturen) diskutiert. Die Komplexfunktionen basieren auf den Eigenschaften und Funktionen der einzelnen INAD-Komplexkomponenten. Unumstritten ist die Bildung eines Haupt- oder Kernkomplexes aus den Proteinen INAD, TRP, PLC β und ePKC. Kontrovers wird dagegen die Anbindung weiterer Moleküle als Bestandteile des Komplexes diskutiert. Eine ungeklärte Frage ist die vorgeschlagene temporäre Assoziation des zweiten lichtabhängigen Ionenkanals TRPL mit dem INAD-Signalkomplex. Wichtige offene Punkte im Zusammenhang mit dem INAD-Signalkomplex sind weiterhin der exakte Öffnungsmechanismus und die Deaktivierung von TRP sowie TRPL, der Mechanismus und Ort der Komplexbildung sowie der Transport der Komplexproteine beziehungsweise von Teilkomplexen zur Photorezeptormembran. Eine Heteromerisierung von TRP- und TRPL-Kanaluntereinheiten als regulatorische Wechselwirkung ist umstritten.

Die Herstellung von Expressionskonstrukten und die Etablierung der rekombinanten Co-Expression von TRP, ePKC, INAD und PLC β in S2-Zellen im Rahmen dieser Arbeit bilden die Basis für Analysen der Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund. Zentrale Aspekte dieser Arbeit sind die Generierung, Dokumentation und Analyse von Zelllinien mit Co-Expression der vier Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes und von Linien, die jeweils drei der vier Komponenten co-exprimieren. Analysiert wurden Interaktionen der rekombinanten Proteine in Hinblick auf die Bildung von INAD-Komplexen beziehungsweise Teilkomplexen, um Hinweise auf Mechanismen der Komplexbildung zu erhalten. Die elektrophysiologische Charakterisierung des TRP-Kanals in Abhängigkeit von rekombinant co-exprimierten INAD-Komplexkomponenten soll Einflüsse einzelner Komplexkomponenten auf den TRP-abhängigen Ionenstrom erstmals unabhängig von weiteren photorezeptorspezifischen Faktoren identifizieren. Es wurde ausserdem untersucht, ob die Kanalproteine TRP und TRPL bei rekombinanter Expression in S2-Zellen heteromultimere Kanäle bilden.

5.1 Co-Expression in S2-Zellen: Systemcharakterisierung zur Analyse von Funktionen des INAD-Signalkomplexes

Eine Vielzahl von Co-Transfektionen im Rahmen vorliegender Arbeit mit Nachweis der Expressionsprodukte (Beispiele: INAD-Komplex oder S2-[TRP;TRPL-EGFP]) belegen die Eignung von S2-Zellen zur heterologen Co-Expression mehrerer Proteine. Sie stehen damit in Einklang mit publizierten Co-Expressionen in S2-Zellen, beispielsweise der LIN-Komplexkomponenten LIN-2, -7 und -10 von *C. elegans* (KAECH *et al.*, 1998) oder von DmTRPL und DM1 (muskarinischer Acetylcholinrezeptor, YAGODIN *et al.*, 1998).

Die Transfektionsversuche legen die Begrenzung des Niveaus rekombinanter Expression auf einen bestimmten Anteil des Gesamtproteingehalts einer S2-Zelle nahe. Bei Co-Transfektionen mehrerer Konstrukte, deren rekombinante Expression von dem identischen Promotor getrieben wird, erfolgt die Expression der einzelnen Proteine auf einem Niveau deutlich unter dem einer singulären rekombinanten Expression in S2. Dieser Effekt wird durch Expression von Fluorophoren direkt visualisiert, beispielsweise durch die rDmINAD-EGFP-Expression in Klon a-H7 (Komp[INAD;TRP;ePKC]) und in INAD-Komplex Klon A8 oder Klon E4. Obwohl jede der Linien unter optimalen Kultivierungs- und Expressionsbedingungen eine rDmINAD-EGFP-Expression in 100 % der lebenden Zellen zeigt, unterscheidet sich neben den Zellzyklus-abhängigen Variationen der Expressivität innerhalb einer Linie die Signalstärke zwischen den Linien signifikant. Dieser Effekt resultiert nicht aus der Individualität klonaler Linien. A8 und E4, beides Linien der Selektion Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC], zeigen gegenüber der Linie a-H7 den gleichen Effekt. Alle drei Linien wurden nach dem gleichen Gesichtspunkt (biochemisch nachgewiesene Expression aller transfizierten Komponenten) ausgewählt. Besonders deutlich wird die Veränderung des Expressionsniveaus bei Vergleich der HcRed-Fluoreszenzintensität in den polyklonalen Linien S2-DmTRPL-HcRed und S2-[INAD-EGFP;TRPL-HcRed], da das Co-Expressionsprodukt rDmINAD-EGFP im Versuchsansatz über seine EGFP-Fluoreszenz ebenfalls nachgewiesen wird. Aufgrund abnehmender Nachweisbarkeit und Zugänglichkeit der rekombinanten Expressionsprodukte für funktionelle Analysen ergibt sich für das Expressionssystem eine Limitierung der Anzahl co-exprimierter Produkte.

Die geringe Transfektionseffizienz für S2-Zellen verhindert die routinemäßige transiente Transfektion für biochemische Analysen. Die Etablierung stabil transfizierter Linien ist erforderlich. Die Variabilität des Mengenverhältnisses der rekombinant exprimierten Proteine zueinander zwischen verschiedenen transfizierten Zellen einer polyklonalen Kultur wird bei klonalen Selektionen deutlich. Beispielsweise wird in verschiedenen Zellklonen der Selektion Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC] mit nachgewiesenem (Western Blot) hohem Expressionsniveau von rDmTRP in Western Blot Analysen kein rDmINAD-EGFP detektiert, obwohl die primäre Auswahl aller analysierten Klone aufgrund der Fluoreszenz von rDmINAD-EGFP erfolgte (Daten nicht gezeigt). Die Etablierung und Auswahl klonal selektierter Linien, für die biochemisch die Expressionsprodukte aller transfizierten Kon-

strukture nachgewiesen werden können, stellt zwei wichtige Punkte sicher. Einerseits werden alle rekombinanten Proteine auf einem Mindestniveau exprimiert und andererseits ist das Verhältnis der rekombinanten Expressionsniveaus zueinander stabil. Die ausgewählten Zelllinien der einzelnen klonalen Selektionsexperimente dieser Arbeit ermöglichen die robust reproduzierbare Datengewinnung besonders in Einzelzellanalysen.

Die Ausgangslinien S2 und S2P15 exprimieren keine der Hauptkomponenten des visuellen INAD-Signalkomplexes auf einem Niveau, das biochemische oder immunocytochemische Analysen dokumentieren können. Ebenso kann keine Expression des zweiten lichtabhängigen Ionenkanals TRPL oder der γ -Untereinheit des visuellen heterotrimeren G-Proteins (Gq) nachgewiesen werden. Diese Daten kennzeichnen S2-Zellen als einen Photorezeptor nullhintergrund, die demnach für die funktionelle Analyse von Teilen oder einzelnen Komponenten der Phototransduktionskaskade von *D. melanogaster* nach rekombinanter Expression geeignet sind.

5.2 Heterologe Expression von Proteinen der TRP-Proteinfamilie

5.2.1 Heterologe Expression von DmTRP und DmTRPL

Als Grundlage zur Nutzung von S2-Zellen als geeignetes System zur Co-Expression mehrerer Proteine, insbesondere der Phototransduktionskaskade, erfolgte die Etablierung der rekombinanten Expression von DmTRPL und DmTRP. Die Charakterisierung dieser Expressionen im Vergleich zu publizierten heterologen Expressionen in anderen Systemen ist notwendig für die Bewertung darauf aufbauender Analysen. Wichtige Aspekte sind der Entwurf von Konstrukten, die bekannte Interaktionen oder Regulationsmechanismen der Expressionsprodukte nicht beeinträchtigen, die vollständige und korrekte Expression beider TRP-Proteine sowie die Dokumentation von Parametern mit möglichem Einfluss auf die Funktionalität (beispielsweise die subzelluläre Lokalisation).

Die rekombinante Expression von DmTRPL erfolgte mit C-terminaler Kopplung des Fluorophors EGFP beziehungsweise HcRed. Die Fusionsexpression dient der schnelleren und leichteren Nachweisbarkeit und Lokalisation des Expressionsproduktes rDmTRPL-EGFP. Ein weiterer Aspekt ist die mutmaßlich verbesserte Expressivität eines TRP-Proteins durch Bindung an EGFP. Darüber hinaus ermöglicht die Detektion des Fusionskonstruktes via EGFP-Fluoreszenz bei C-terminaler EGFP-Fusion den Nachweis der vollständigen Expression des TRPL-Proteins ohne Verschiebung des Leserasters oder Abbruch der Expression. Die Expression von rDmTRPL-EGFP wurde anhand von EGFP-Fluoreszenz und α -DmTRPL-Immunodetektion dokumentiert. Für TRPL ist keine direkte C-terminale Interaktion (z.B. mit PDZ-Domänen) oder Regulation belegt, die durch Expression als Fusionsprotein beeinträchtigt oder unterbunden werden könnte. Potentielle Regulationsinteraktionen, beispielsweise mit Calmodulin oder Immunophilin FKBP59, erfolgen intern distal vom C-Terminus. Für das Fusionskonstrukt wird deshalb davon ausgegangen, dass

es keine Eigenschaften aufweist, die die Charakteristika der TRPL-Expression überlagern. Der Ionenkanal DmTRPL ist bei Expression in verschiedenen Systemen konstitutiv aktiv (Sf9-Insektenzellen: HU *et al.*, 1994; HU AND SCHILLING, 1995 unter basalen nicht-stimulierenden Bedingungen; HARTENECK *et al.*, 1995; KUNZE *et al.*, 1997; Xenopus-Oocyten: LAN *et al.*, 1996; HEK 293T: XU *et al.*, 1997; COS- und HEK-Zellen: HAMBRECHT *et al.*, 2000; CHO: ZIMMER *et al.*, 2000). Rekombinant exprimiertes TRPL zeigt ebenso in S2-Zellen konstitutive Aktivität während ausgedehnter *whole cell recordings* (WCR; HARDIE *et al.*, 1997; YAGODIN *et al.*, 1998; HARDIE AND RAGHU, 1998). Die elektrophysiologischen Daten dieser Arbeit belegen in WCR-Analysen die konstitutive Aktivität in S2-Zellen auch für rDmTRPL-EGFP. In rDmTRPL-EGFP exprimierenden Zellen wird ein Ionenstrom detektiert, dessen Charakteristika denen für rDmTRPL publizierten entsprechen (Referenzdaten in: HU *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1997; HARDIE *et al.*, 1997; KUNZE *et al.*, 1997). Dazu zählen die strikte Auswärtsgleichrichtung (Strom-Spannungsbeziehung), konstitutive Aktivität oder bedingte Inhibition durch Ca^{2+} , die in einigen Fällen beobachtet wird (HARDIE AND RAGHU, 1998). Die für rDmTRPL publizierten Daten stimmen gut mit den *in situ*-Messungen in *trp*-Mutanten überein (Beispiel Permeabilitätsraten: geringe/fehlende Ca^{2+} -Selektivität bei bestehender Kationenleitung, siehe dazu REUSS *et al.*, 1997; HARDIE *et al.*, 1997; HARDIE AND MINKE, 1992). Der rDmTRPL-EGFP-getragene Ionenfluß wird teilweise von einem geringen Ca^{2+} -abhängigen S2-endogenen Ionenstrom überlagert, wie Messungen mit kontinuierlicher Änderung des *clamp*-Potentials zeigen. Die Membranbindung von rDmTRPL-EGFP belegen cytologische Experimente, die unter Verwendung von Detergentien zwischen löslichen und Membranproteinen differenzieren. Weiterhin wird in PBS-Extrakten aufgebrochener Zellen mit rDmTRPL-EGFP-Expression nach Abtrennung der Membranen im Gegensatz zu den Extrakten aus den separierten Membranen kein rDmTRPL-EGFP nachgewiesen. EGFP hat keinen Einfluß auf die Membranlokalisation von DmTRPL. Die partielle Co-Lokalisation von rDmTRPL-EGFP und extrazellulär bindendem WGA wird als Hinweis interpretiert, dass die Integration von rDmTRPL-EGFP in die Plasmamembran unabhängig von weiteren photorezeptorspezifischen Faktoren erfolgt. Die gemessenen WCR-Daten von S2-DmTRPL-EGFP A3 unterstützen diese Sichtweise. WCR-Daten zeigen Strom- oder Spannungsänderungen über die äussere Zellmembran an, wobei aufgrund der Kinetiken fast ausschließlich Änderungen bedingt durch Ionenkanäle erfasst werden. DmTRPL ist somit intrinsisch kompetent für den Transport zur Plasmamembran.

Die rekombinante Expression des lichtabhängigen Ionenkanals DmTRP ist bisher nicht in S2-Zellen beschrieben. Die heterologe Expression des DmTRP-Proteins beschränkt sich auf die Systeme HEK (XU *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2000), Xenopus-Oocyten (PETERSEN *et al.*, 1995) und Sf9 Insektenzellen (VACA *et al.*, 1994; HU *et al.*, 1994), in denen TRP von *Calliphora vicina*, einer nahen verwandten Diptere, ebenfalls erfolgreich exprimiert werden konnte (HARTENECK *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu TRPL ist heterologes TRP nicht intrinsisch konstitutiv aktiv, mehr selektiv für Ca^{2+} gegenüber Na^+ und wird im rekombinanten System durch die Leerung interner Ca^{2+} -Speicher aktiviert. Diese Leerung kann via Thapsigargin induziert werden. TRP agiert somit als *store operated channel*

(SOC). Verantwortlich für die Thapsigargin-vermittelte Aktivierung von TRP ist eine Prolin-reiche Region im C-Terminus (fehlt in TRPL), wie VACA *et al.*, 1994 vermuten und SINKINS *et al.*, 1996 nachweisen können. MONTELL, 1999 vergleicht die Eigenschaften TRP-abhängiger Leitfähigkeit *in vitro* (Daten basierend auf VACA *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1997) und *in vivo* (Daten: HARDIE AND MINKE, 1992; NIEMEYER *et al.*, 1996; REUSS *et al.*, 1997) ausführlich und stellt Ähnlichkeiten fest. Dazu zählen das Verhältnis der Durchlässigkeit von Na^+ zu Ca^{2+} , die Ca^{2+} -vermittelte Inaktivierung sowie die Inhibition durch La^{3+} und Mg^{2+} . Im Kontrast zu rDmTRPL unterscheiden sich die Eigenschaften der TRP-abhängigen Kanäle zwischen *trpl*-Mutanten und heterolog exprimierten DmTRP-Kanälen aber auch deutlich (REUSS *et al.*, 1997). Beispielsweise zeigt der lichtaktivierte Ionenstrom eine strikte Auswärtsgleichrichtung, die in heterologen Systemen nicht beobachtet wird (MONTELL, 1999). Ein weiteres signifikantes Beispiel ist die Permeabilität für divalente Ionen, was zu der Frage führt, ob nicht durch die jeweils gegebenen unterschiedlichen Bedingungen zwei verschiedene Kanäle untersucht werden (REUSS *et al.*, 1997). Vor diesem Hintergrund des bestehenden Untersuchungsbedarfs der DmTRP-Problematik wurde als Teil dieser Arbeit die Möglichkeit der rekombinanten Expression von DmTRP in S2-Zellen eruiert. Die Erstellung des Konstruktes erfolgte ohne die Kopplung weiterer Sequenzen, um mögliche Regulationsmechanismen und Interaktionen, beispielsweise die INAD-Bindung über proximale oder distale C-terminale PDZ-Domänen-Interaktionsmotive (SHIEH AND ZHU, 1996; VAN HUIZEN *et al.*, 1998; WES *et al.*, 1999; LI AND MONTELL, 2000), nicht zu beeinflussen. Mehrfach unabhängig nachgewiesen wurde das Expressionsprodukt rDmTRP immuncytochemisch und biochemisch durch Western Blot Analysen und Immunpräzipitationen in singular und co-transfizierten Linien (Betrachtung von Co-Expressionen unter 5.2.2 und 5.3). Die MALDI-TOFF-Analysen des durch α -DmTRP-Präzipitation partiell gereinigten Expressionsproduktes identifizierten das präzipitierte Protein eindeutig als DmTRP (MASCOT-Search und Vergleich mit Referenzprobe aus Wildtyp-Fliegen). Die Massenspektren belegen die rekombinante Expression des vollständigen DmTRP-Proteins, da sowohl N- als auch C-Terminus identifiziert werden konnten. Die Unterrepräsentation der TRP-Transmembranregionen in den Massenspektren ist auf fehlende Fragmentierung durch Trypsin in stark hydrophoben Bereichen und daraus folgende Artefakte der Probenaufbereitung (beispielsweise ineffiziente Elution größerer Fragmente aus dem Gelmaterial) zurückzuführen, möglicherweise in Verbindung mit geringerer Ionisation während der massenspektrometrischen Messungen. Die Analyse der publizierten TRP-Referenzen ergab, dass für *D. melanogaster* sechs verschiedene Primärstrukturen des TRP-Proteins identifiziert worden sind. Im Gegensatz zu beispielsweise INAD mit RFLP aber hoch konservierter Primärstruktur unterscheiden sich die veröffentlichten TRP-Sequenzen an mehreren Stellen mit einem Ausmaß bis zu acht aufeinanderfolgenden Aminosäuren, was Unterschiede aufgrund von Sequenzierfehlern unwahrscheinlich macht. Diese Sequenzunterschiede beruhen einerseits auf der Analyse verschiedener *D. melanogaster*-Stämme, andererseits sind mindestens drei Sequenzen dem Stamm Oregon R zugeordnet. Stellt man in Rechnung, dass die TRP-Primärstrukturen von Fliegenstämmen unterschiedlicher Laboratorien erhalten wurden, spricht das für eine

hohe Variabilität der Regionen mit Sequenzunterschieden. Die mehrfache massenspektrometrische Analyse des rekombinant exprimierten und des Fliegen-DmTRPs identifizierte die Sequenz AAA28976 mit hoher Wahrscheinlichkeit für beide Proben, wobei die Ergebnisse für natives DmTRP eindeutiger sind. Weitere stammspezifische Abweichungen sind jedoch nicht ausgeschlossen, da massenspektrometrisch bei tryptischem Verdau aufgrund ihrer Größen nicht alle entstandenen Fragmente erfasst werden können. Die Sequenzvariationen der TRP-Proteine liegen ausserhalb bisher identifizierter funktional relevanter Bereiche von TRP. Es wurden keine Referenzen über Analysen und funktionelle Auswirkungen der Primärstrukturunterschiede von DmTRP gefunden.

Polyklonale Linien S2-DmTRP wurden mehrfach klonal selektiert. Es konnte keine monoklonale TRP-Linie etabliert werden. Die Anzucht selektierter Linien resultierte entweder in ihrem Absterben oder im Verlust der rDmTRP-Expression. Exprimierte Fluorophore und die IMAC-Aufreinigung von rDmPLC β -V5-His belegen die *leakage*-Expression transfizierter Konstrukte bei exponentiellem Wachstum der S2-Kulturen. Während der Expansion klonaler TRP-Linien mit starkem logarithmischem Wachstum wird mutmaßlich rDmTRP exprimiert. Die Monoklonalität in Verbindung mit der *leakage*-Expression ist möglicherweise für das Absterben der Kulturen verantwortlich: in allen Zellen wird über einen längeren Zeitraum hinweg rDmTRP auf ähnlichem Niveau exprimiert. Obwohl singular exprimiertes TRP nicht als konstitutiv aktiv charakterisiert wird, könnte rDmTRP unter den Bedingungen der Kulturexpansion einen negativen Einfluß auf den Ionenhaushalt der Wirtszellen ausüben (zum Beispiel durch Porenbildung in intrazellulären Membranen). Fehlende Regulation mit konstitutiver Aktivität der TRP-Kanäle und der daraus folgende unkontrollierte Ca²⁺-Ionenstrom führt im Fliegenphotorezeptor zur retinalen Degeneration (MINKE AND AGAM, 2003; RAGHU *et al.*, 2000b). Dieser Vorgang, beobachtet in einer Reihe von *D. melanogaster*-Mutanten, wird ausgelöst durch metabolischen Stress und führt auch in Dunkelheit zu rascher Degeneration. Der toxische Anstieg von zellulärem Ca²⁺ wird auch als Mechanismus für Gehirnschäden diskutiert, die durch Ischämie (mangelnde Sauerstoffversorgung) induziert werden (MINKE AND AGAM, 2003). Vermutlich ist die rDmTRP-Menge bei singularer Expression ein kritischer Faktor im Selektionsprozess. Die Selektion klonaler Linien mit Co-Expression weiterer Komponenten ist erfolgreich (Anhang A.3). Möglicherweise ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, dass die hohe Zellmortalitätsrate der heterologen TRP γ -Expression mit konstitutiver Kanalaktivität bei Co-Transfektion von TRP γ und DmTRPL nicht mehr gegeben ist (XU *et al.*, 2000), was mit wechselseitiger Regulation begründet wird. Neben einem sinkenden rDmTRP-Niveau bei Co-Expression haben eventuell co-exprimierte INAD-Komplexkomponenten in den etablierten S2-Zellderivaten einen regulatorischen Einfluss auf rDmTRP. Ein Unterschied zwischen offensichtlich nicht toxischer Expression von rTRPL- / rTRPL-EGFP und der rTRP-Expression ist die unterschiedliche Ionenselektivität der gebildeten Kanäle, wobei rTRP selektiver für Ca²⁺ ist (Beispieldaten: Expression in HEK 293T-Zellen mit $P_{Ca}:P_{Na}$ für TRP ~ 10 , für TRPL ~ 3 : XU *et al.*, 1997).

Neben vollständiger und korrekter Expression erfordert die Funktionalität von TRP-Proteinen offensichtlich die korrekte subzelluläre Lokalisation, wie Untersuchungen rekomb-

binanter TRPC-Proteine (Ionenkanäle in Mammalia) belegen. Nicht alle TRPC-Proteine sind intrinsisch kompetent für den Transport zur Plasmamembran. Einige translozieren nur im Co-Transport mit kompetenten TRPCs, wobei nur TRPC-Untereinheiten festgelegter Struktursubfamilien Heteromere ausbilden (HOFMANN *et al.*, 2002). Verantwortlich für den Transport ist die N-terminale Region oberhalb der Ankyrin-Repeats. Die Transportmechanismen sind möglicherweise jedoch komplexer, wie mTRPC2 andeutet: bei Expression in Zellen (als GFP-Fusion) bleibt mTRPC2 in Endomembranen stecken. Keines der bekannten TRPC-Proteine konnte einen Co-Transport zur Plasmamembran bewirken. Eine Behandlung mit „chemischen Chaperonen“ zur Beseitigung einer möglicherweise inkorrekten Faltung als Ursache fehlender Plasmamembranlokalisation von mTRPC2 scheiterte ebenfalls (HOFMANN *et al.*, 2000). Die schwere Zugänglichkeit von rDmTRP in S2-Zellen für biochemische Analysen mit milden Detergentien oder niedriger Detergenz-Konzentration ist ein Indiz für eine Membranassoziation, zumal die Solubilisierbarkeitsproblematik ebenso für membrangebundenes rDmTRPL-EGFP und natives Fliegen-TRP sowie -TRPL besteht. Der direkte Nachweis von rDmTRP in der Cytoplasmamembran war nicht möglich. Einerseits fehlen für Co-Lokalisationsstudien von rDmTRP mit der Plasmamembran oder der extrazellulären Oberfläche geeignete S2-Marker. Zum anderen scheiterte die Generierung von Antikörpern zur exklusiven Erkennung extrazellulär lokalisierter Regionen des DmTRP- beziehungsweise DmTRPL-Proteins an der offenbar niedrigen Antigenizität der ausgewählten Bereiche. Die Auswahl der extrazellulären Schleifen erfolgte in Anlehnung an die erfolgreiche Etablierung derartiger Antikörper für mTRPC2 (JUNGNICKEL *et al.*, 2001) und mTRPC1 und basierte auf Homologievergleichen von DmTRP und DmTRPL mit 22 TRP-Proteinen von Mensch/Maus/Ratte sowie mit TRP-Proteinen von *Anopheles gambiae* zur Verifizierung der Transmembranbereiche und folglich auch der Extrazellulärbereiche. Die Sequenzen der Schleifen unterscheiden sich jedoch beträchtlich und bilden damit die Grundlage für differierende Antigenizität. Die subzelluläre Verteilung von rDmTRP in S2 gibt jedoch auch keine Hinweise auf eine Anreicherung des rekombinanten Proteins in intrazellulären Kompartimenten, die Bildung größerer Aggregate oder eine exklusiv cytoplasmatische Lokalisation unter Ausschluss der Plasmamembran und fehlenden Plasmamembrantransport. Zudem scheint für TRP der Transport in die Mikrovilli-Membranen unabhängig zu sein von Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes: im Photorezeptor der *C. vicina-inaD*-Mutante (*rpa*) wurde unabhängiger Transport beobachtet (HUBER *et al.*, 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch TSUNODA *et al.*, 2001 und LI AND MONTELL, 2000.

5.2.2 Heterologe Co-Expression von DmTRP und DmTRPL

Die Identifizierung von zwei Ionenkanalproteinen der TRP-Familie im Fliegenphotorezeptor warf die Frage einer Interaktion beider Proteine auf. Die heterologe Co-Expression von DmTRP und DmTRPL in *Xenopus*-Oocyten (GILLO *et al.*, 1996) und in HEK 293T (XU *et al.*, 1997) legen einen synergistischen Effekt der beiden Proteine nahe beziehungsweise weisen direkte Interaktion nach. Neben TRP / TRP- und TRPL / TRPL-Kanälen

tragen demnach TRP/TRPL-Kanäle in bedeutendem Umfang zum Rezeptorpotential bei. Die dargestellte TRP/TRPL-Heteromerisierung in HEK-Zellen basiert auf elektrophysiologischen und biochemischen Daten. Gegen eine Heteromerisierung sprechen nach REUSS *et al.*, 1997 *in vivo*-Messungen. Diese zeigen, dass die lichtaktivierte Wildtyp-Leitfähigkeit quantitativ durch Addition der in *trp*- beziehungsweise *trpl*-Mutanten gefundenen verbleibenden Leitfähigkeiten erhalten werden kann. TRP/TRPL-Heteromere sind nur dann konsistent mit der *in vivo*-Analyse, wenn sie exakt die gleichen Eigenschaften aufweisen wie TRPL-Homomere allein. Die von XU *et al.*, 1997 dargestellten *in vitro*-Eigenschaften der TRP/TRPL-Heteromere unterscheiden sich allerdings signifikant von denen von TRPL. Der auswärtsgerichtete Strom in TRP/TRPL-co-exprimierenden HEK-Zellen erinnert zwar an die Lichtantwort im Photorezeptor, muss allerdings nicht zwingend von TRPL herrühren (REUSS *et al.*, 1997). Als eine Erklärungsmöglichkeit der beobachteten Ströme in HEK-Zellen wird die Aktivierung endogener Ströme durch die heterologe Expression von DmTRP und DmTRPL aufgeführt. Darüber hinaus wäre eine Interaktion *in vitro* durchaus möglich, die *in vivo* nicht beobachtet wird (REUSS *et al.*, 1997). Gegen eine *in vivo*-Interaktion beider TRP-Proteine argumentieren auch SCOTT AND ZUKER, 1998. LEUNG *et al.*, 2000 dagegen fanden in elektrophysiologischen Untersuchungen an *inaD*-Mutanten Hinweise, die auf TRP-TRPL-Interaktion hindeuten könnten: der Beitrag von INAD-ungebundenem TRP zur lichtaktivierten Leitfähigkeit erfordert die Anwesenheit von TRPL. Favorisiert wird eine TRP-TRPL-Interaktion im Zusammenhang mit der diskutierten Bildung tetramerer Kanäle aus TRP-Proteinuntereinheiten nach dem Vorbild des Vanilloid-Rezeptors. Für diesen Vertreter der Mammalia-TRP-Proteine konnte die Ausbildung solcher Einheiten gezeigt werden (KEDEI *et al.*, 2001). Argumentativ unterstützt werden Überlegungen zur TRP/TRPL-Heteromerisierung auch durch Untersuchungen an den zu DmTRP und DmTRPL näher verwandten TRP-Proteinen der Mammalia, TRPC (HOFMANN *et al.*, 2002). Die Heteromultimerisierung von DmTRP und DmTRPL ist gegenwärtig weiterhin umstritten. Die Darstellung einer direkten Interaktion von DmTRP mit DmTRPL *in vivo* (siehe XU *et al.*, 1997) durch Co-Immunpräzipitation aus Köpfen von *D. melanogaster* müssen vor dem Hintergrund aktueller Forschung neu bewertet werden. Neben der mehrfach belegten Assoziation DmTRP/DmINAD wird die Interaktion von DmTRPL und DmINAD (XU *et al.*, 1998; in Sf9-Zellen: GOEL *et al.*, 2001) dokumentiert, wobei TRPL neben direkter Interaktion mit INAD über ein weiteres Protein, dFKBP59, mit INAD in Verbindung stehen kann (GOEL *et al.*, 2001, ausführliche Diskussion in Kapitel 5.2.3).

Die Analyse der gemeinsamen rekombinanten Expression von DmTRP und DmTRPL in S2-Zellen, besonders in der klonalen Linie e-H2, untersucht eine mögliche Heteromerisierung der beiden TRP-Proteine in einem System unabhängig vom Photorezeptor und bietet damit eine Referenz zu den Untersuchungen in HEK-Zellen. In verschiedenen Linien S2-[TRP;TRPL-EGFP] wurden beide Expressionsprodukte mit unabhängigen Methoden mehrfach nachgewiesen. Die Subzellulardistribution stimmt für rDmTRP und rDmTRPL-EGFP mit den singulären Expressionsmustern überein: die rekombinanten Proteine sind in der gesamten Zelle mit Ausnahme des Zellkerns lokalisiert. Rekomb-

binantes DmTRP und rDmTRPL-EGFP co-lokalisieren. Der Nachweis eines einzelnen Expressionsproduktes in einigen Zellen ist bedingt durch die Detektionsmethode: immunfluoreszenzmarkiertes TRP fluoresziert stets deutlich schwächer als TRPL-EGFP und unterschreitet bei niedriger Expressivität die Dokumentationschwelle. Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen stellen Immunpräzipitationen mit Analyse der Co-Präzipitationsprodukte eine geeignete Methode dar. Die Überprüfung einer Heteromultimerisierung von rDmTRP und rDmTRPL mittels Immunpräzipitation konnte keine Co-Präzipitation und somit Interaktion beider Proteine in co-exprimierenden S2-Zelllinien verifizieren. Um methodische Artefakte als Ursache des Scheiterns einer Co-Präzipitation von rDmTRP und rDmTRPL-EGFP auszuschließen beziehungsweise schwache Interaktionen beider Proteine detektieren zu können, erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung der rDmTRP / rDmTRPL-co-exprimierenden klonalen Linie e-H2. Die erhaltenen WCR-Messungen von e-H2-Zellen entsprechen in ihren Eigenschaften denen von singulärer TRPL-EGFP-Expression. Es kann von TRP weder ein Einfluß auf die Amplitude (Schwankungen im Rahmen der rDmTRPL-EGFP-Messungen) noch die Regulation (weiterhin konstitutive Aktivität, keine Änderung der Strom-Spannungsbeziehung) des TRPL-EGFP-getragenen Gesamtionenstroms nachgewiesen werden. Die vorliegenden elektrophysiologischen Daten der Linie e-H2 sprechen gegen eine Interaktion von TRP und TRPL mit Regulationsfunktion bei rekombinanter Expression in S2-Zellen. Sie stehen im Einklang mit den dargestellten biochemischen Interaktionsanalysen aus S2-Linien mit Co-Expression beider TRP-Proteine. Eine Erklärung der differierenden Ergebnisse bei rekombinanter TRP / TRPL-Co-Expression in HEK- und S2-Zellen besteht in einer möglichen Expression von Faktoren in HEK-Zellen, die eine Verbindung von TRP und TRPL ermöglichen beziehungsweise herstellen. Denkbar ist auch das Fehlen von Faktoren in S2-Zellen, die für die Aktivität von INAD-ungebundenem TRP (LEUNG *et al.*, 2000) erforderlich sind. Offen bleibt die Frage nach dem Anteil von TRPL-assoziiertem TRP in Anwesenheit des Komplexgerüstproteins INAD, das TRP in der Photorezeptormembran verankert (LI AND MONTELL, 2000; TSUNODA *et al.*, 2001).

5.2.3 TRPL – Interaktionspartner und der INAD-Komplex

Die Involvierung von DmTRPL in die Phototransduktion ist trotz eines geringeren Beitrags (verglichen mit DmTRP) zur Photoantwort, den erst die *trpl*-Nullmutante enthüllte, unumstritten. Kontrovers diskutiert wird dagegen die Anbindung von TRPL an den INAD-Komplex und das Verhältnis zu DmTRP. Im Verlauf dieser Arbeit erschienen mehrere Publikationen, die sich mit der Thematik der TRPL-Interaktionen auseinandersetzen. XU *et al.*, 1998 zeigten die Interaktion von TRPL mit INAD, wohingegen PAULSEN *et al.*, 2000 keine Assoziation finden. Diskutiert wird deshalb eine substöchiometrische (TRPL: TRP im Photorezeptor $\sim 1:10$, siehe beispielsweise XU *et al.*, 2000) und temporäre Assoziation von TRPL (und weiteren dynamischen Interaktionspartnern) mit dem Signalkomplex (LI AND MONTELL, 2000). Die Problematik der TRPL-INAD-Interaktion wurde daraufhin erneut untersucht, vorrangig in dem rekombinanten System Sf9-Insektenzellen. Dabei

fanden GOEL *et al.*, 2001 in reziproken Co-Immunpräzipitationsstudien aus TRPL / INAD-co-exprimierenden Zellen in beiden Fällen die Interaktion dieser zwei Proteine, die sie in Immunpräzipitationen aus co-exprimierenden S2-Zellen bestätigen konnten. Physiologische Konsequenzen einer TRPL-Anbindung an INAD sind bislang nicht charakterisiert. MONTELL, 1999 postuliert die Involvierung einer dritten Kanaluntereinheit aus der TRP-Proteinfamilie in den lichtabhängigen Ionenstrom im mikrovillären Photorezeptor. Diese könnte bestehende Diskrepanzen zwischen elektrophysiologischen *in vitro*- und *in vivo*-Messungen erklären. Beispielsweise würde die Frage beantwortet, wie TRPL *in vivo* in *trp*-Mutanten reguliert wird, da in diesen Mutanten keine konstitutive TRPL-Aktivität beobachtet wird, wie sie für die heterologe Expression von TRPL (in Abwesenheit von TRP) charakterisiert ist. Laut MONTELL, 1999 kommt es hypothetisch zur Bildung von TRP-Homo-, TRP / TRPL-Hetero- und TRPL / TRP γ -Heteromultimeren. Die Identifizierung, Analyse und rekombinante Expression zur Untersuchung von Eigenschaften, Interaktionen und Regulationsmechanismen des Proteins TRP γ (XU *et al.*, 2000) zeigen das Vorhandensein eines dritten, eng zu den lichtabhängigen Kanalproteinen DmTRP und DmTRPL verwandten Proteins in Drosophila. Dieses Protein wurde stark angereichert in Drosophila-Photorezeptorzellen nachgewiesen und bildet bei singulärer rekombinanter Expression in HEK-Zellen einen nicht-regulierten Ionenkanal. TRP γ wird als weitere regulatorische Untereinheit für TRPL angesehen, die in *trp*-Mutanten mit fehlenden TRP- und postulierten TRP γ / TRPL-Kanälen die verbleibende lichtaktivierte Leitfähigkeit erklärt. Die Involvierung von TRP γ in die Phototransduktion ist jedoch umstritten, da bisher *in vivo* keine direkten Interaktionen mit DmTRPL physiologisch belegt sind. Lediglich die rekombinante Expression eines Fusionskonstruktes aus DmTRPL und DmTRP γ in HEK 293T-Zellen resultiert in einer Veränderung der elektrophysiologisch charakterisierbaren Eigenschaften von rTRPL (Fusionskonstrukt: TRP γ -10 Glycinreste-TRPL), die Co-Expression beider Proteine ist nicht ausreichend. Obwohl beispielsweise die C-terminale Fusion des cytoplasmatisch lokalisierten EGFPs keine elektrophysiologisch messbaren Auswirkung auf DmTRPL hat, wie die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen, kann ein Effekt der physischen Kopplung eines mutmaßlichen Transmembranproteins an TRPL möglicherweise die Eigenschaften des gebildeten Kanals modifizieren. Bisher wirft die Charakterisierung von DmTRP γ mehr Fragen auf als beantwortet werden und gibt Raum für Spekulationen über die Funktion und die Art der Involvierung dieses Proteins in die Lichtantwort.

Von besonderem Interesse ist die Identifizierung einer neuen Komponente, die mit DmTRPL interagiert und in die TRPL-Regulation eingebunden ist: Immunophilin FKBP59 (dFKBP59: GOEL *et al.*, 2001). Immunophiline umfassen hauptsächlich Proteine einer Rezeptorfamilie, die das Immunsuppressiv FK506 binden (FKBP-Proteine). Neben der FKBP-Ähnlichkeit besitzt dFKBP ein TPR-Motiv (Tetratricopeptid-Repeat). Proteine mit TPR-Motiv sind mit Multiproteinkomplexen verschiedenartigster Funktionen assoziiert (Chaperone, Zellzyklus, Transkription, Protein-Transport-Komplexe). Präferentiell erfolgt die Interaktion über das TPR-Motiv mit WD-40-Repeat-tragenden Proteinen, ein Strukturmotiv, dass beispielsweise auch β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine besitzen. Das beschriebene TRPL-Interaktionsmotiv (LP-Dipeptid, mit P kritisch für Inter-

aktion) entspricht einem anderen Interaktionsmotiv für FKBP, das von der Interaktion FKBP52 mit dem IP₃-Rezeptor-Kanalprotein (CAMERON *et al.*, 1997) abgeleitet ist (GOEL *et al.*, 2001). Es folgt fast unmittelbar der sechsten Transmembranregion von DmTRPL und hat deshalb eine ideale sterische Position zur Regulation der Kanalpore. Dieses Motiv findet sich in abgewandelter Form auch in TRP, allerdings wurde bisher keine Interaktion DmTRP/dFKBP59 gezeigt. Fura-Assays belegen, dass die Interaktion mit dFKBP59 den Ca²⁺-Einstrom via TRPL hemmt (GOEL *et al.*, 2001). Die Interaktionen von TRPL, INAD und dFKBP59 werden in dieser Arbeit durch rekombinante Co-Expression von jeweils zwei Komponenten untersucht. Folgende Interaktionen werden belegt: DmTRPL / dFKBP59, DmTRPL / DmINAD sowie DmINAD / dFKBP. Ob die Assoziationen miteinander um die entsprechenden Interaktionspartner konkurrieren oder gleichberechtigt nebeneinander bestehen, bleibt aufgrund dualer Co-Expression unbeantwortet.

Alle dargestellten Untersuchungsansätze befassen sich mit singulären Wechselwirkungen von TRPL durch heterologe Co-Expression eines potentiellen Interaktionspartners. Es gibt jedoch keine Erkenntnisse über mögliche wechselseitige Beeinflussung der Interaktionen.

5.2.4 Regulationsmechanismen TRPL- und TRP-abhängiger Ionenströme

Gegenwärtige Sichtweisen der Phototransduktion beruhen auf einer Vielzahl von Daten, die die Generierung des lichtabhängigen Ca²⁺- und Na⁺-getragenen Rezeptorpotentials in mikrovillären Photorezeptorzellen von *D. melanogaster* unter Involvierung TRP- und TRPL-abhängiger Ionenkanäle belegen. Während die TRP-basierten Kanäle den Hauptanteil der lichtinduzierten Photorezeptorantwort vermitteln (Ca²⁺ / Na⁺-Einstrom), wird TRPL eher für Feinmodulationen verantwortlich gemacht: BÄHNER *et al.*, 2002 konnten zeigen, dass funktionelle TRPL-Kanäle bei dunkeladaptierten Fliegen im Gegensatz zur Lichtsituation in der Photorezeptormembran angereichert sind. Diese Kanalanreicherung ermöglicht eine erhöhte Sensitivität im schwachen Hintergrundlicht.

Für heterolog exprimiertes TRPL lassen sich die zahlreich beschriebenen regulatorischen Einflüsse wie folgt zusammenfassen: Im Gegensatz zur Situation im Photorezeptor besitzt rekombinant exprimiertes DmTRPL per se ein Grundniveau an konstitutiver Aktivität (Referenz sind zusammengestellt im Abschnitt 5.2.1). Durch verschiedene Einflüsse, die Prozesse im Photorezeptor simulieren, kann die konstitutive TRPL-Grundaktivität erhöht werden. Ein zentraler Aspekt ist die TRPL-Aktivierung über einen Prozess unter G-Protein- und PLC-Beteiligung. Belege dafür sind: I) G-Protein-aktivierende Mechanismen erhöhen die TRPL-Aktivität: co-exprimierte heptahelikale Rezeptoren (aktivieren PLC β) führen bei Stimulation durch Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu einem auswärtsgerichteten Ionenstrom (Sf9-Zellen, HARTENECK *et al.*, 1995; KUNZE *et al.*, 1997); die Co-Expression des muskarinischen Acetylcholinrezeptors aktiviert TRPL vermittelt über ein Pertussis-Toxin-insensitives G-Protein (S2-Zellen, YAGODIN *et al.*, 1998); II) G-Proteinaktivität vermittelt die TRPL-Aktivierung: eine stabilisierte Form von GTP

führt zur Aktivierung von TRPL (Xenopus-Oocyten, LAN *et al.*, 1996); direkte $G\alpha_{11}$ -vermittelte Aktivierung ist dokumentiert (OBUKHOV *et al.*, 1996) und III) PLC-Aktivität ist über die erzeugten Produkte (DAG und IP_3) in die Aktivierung von TRPL involviert (ungeklärt ist, über welches der beiden Produkte die weiteren Schritte der Signaltransduktion vermittelt werden): die Aktivierung von PLC-Signalwegen verstärkt den TRPL-Strom (COS-Zellen, HAMBRECHT *et al.*, 2000); ein Aktivierungsmechanismus über IP_3 (ein Produkt von PLC β -Aktivität) wird beschrieben (Sf9-Zellen, DONG *et al.*, 1995); die Zugabe von PUFAs (metabolisierbar aus DAG, einem Produkt von PLC β -Aktivität) aktiviert heterologes TRPL (CHYB *et al.*, 1999, PUFA-Aktivierung wird auch im Photorezeptor beobachtet). Gegen eine IP_3 -vermittelte Aktivierung der Ionenkanäle spricht allerdings, dass in Fliegenmutanten mit Defekt im IP_3 -Rezeptor keine Defekte in der visuellen Signaltransduktion beobachtet werden. Ein zweiter bedeutender Aspekt der TRPL-Regulation ist die Rolle Ca^{2+} -abhängiger Prozesse. Beschrieben sind: I) die Co-Expression mit einem Rezeptor, der in Ca^{2+} -Signaltransduktionswege eingebunden ist (M5 muskarinischer Rezeptor), vermittelt eine TRPL-Regulation ähnlich zum Photorezeptor (Sf9-Zellen, HU AND SCHILLING, 1995); II) in TRPL wurden Calmodulin-Bindungsstellen identifiziert (WARR AND KELLY, 1996); III) die Thapsigargin-Applikation induziert einen TRPL-Aktivitätsanstieg (Sf9-Zellen, ESTACION *et al.*, 1999; COS-Zellen, HAMBRECHT *et al.*, 2000) und IV) TRPL wird durch Ca^{2+} und Calmodulin (CaM) aktiviert (Xenopus-Oocyten, LAN *et al.*, 1996); für die trans-Stimulation von TRPL durch CCE (kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom, neuer: SOCE - *store-operated calcium entry*) ist die Bindung von CaM über das zweite CaM-Bindungssequenzmotiv (CBS-2) wichtig (ESTACION *et al.*, 1999; Calmodulin-Einfluss in CHO-Zellen: ZIMMER *et al.*, 2000). Für rDmTRPL in S2-Zellen stellen HARDIE AND RAGHU, 1998 fest, dass die ermittelten Daten mit dem Modell einer TRPL-Aktivierung über G-Protein- und PLC-vermittelte Prozesse konsistent sind, aber weder Ca^{2+} noch IP_3 die primären Aktivatoren des Kanals sind.

Ebenso sind hemmende Einflüsse auf rDmTRPL beschrieben. Im Gegensatz zur zahlreich dargestellten Erleichterung der TRPL-Aktivierung durch Ca^{2+} berichten HARDIE AND RAGHU, 1998 über einen inhibierenden Effekt der Freisetzung von *caged*- Ca^{2+} in S2-Zellen in einigen Fällen. Die Bedingungen konnten allerdings nicht bestimmt werden. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten WCR-Messungen stützen einen inhibitorischen Einfluss von Ca^{2+} auf den DmTRPL-abhängigen Ionenstrom: unter Ca^{2+} -freien Bedingungen werden reproduzierbar deutlich höhere Ionenstromamplituden bei singulärer Expression von rDmTRPL-EGFP in S2-Zellen erzielt. GOEL *et al.*, 2001 identifizieren das Immunophilin dFKBP59 als inhibierend wirksamen Interaktionspartner von TRPL.

Heterolog exprimiertes TRP ist nicht konstitutiv aktiv sondern agiert als SOC, was bedeutet, dass die Aktivierung durch Leerung interner Ca^{2+} -Speicher erfolgt (Darstellung der TRP-Eigenschaften unter 5.2.1). Die beobachtete Aktivität wird durch Co-Expression von INAD beeinflusst. In Anwesenheit von INAD geht der beobachtete *store operated* Ca^{2+} *entry* via TRP INAD-konzentrationsabhängig verloren (*Calliphora vicina*-TRP in Sf9-Zellen, HARTENECK *et al.*, 2002), was auf regulatorische Einflüsse der TRP-INAD-Assoziation hindeutet. Mit Ausnahme des dargestellten Experiments wurde der Einfluss

von INAD-Signalkomplexkomponenten auf rekombinant exprimiertes TRP bisher jedoch nicht untersucht. Der Einfluss des INAD-Kernkomplexes auf TRP-Ionenströme wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht und wird unter 5.3 diskutiert.

Die zusammengetragenen und dargestellten Daten sind konsistent mit der Vorstellung distinkter TRP- und TRPL-Kanäle im Photorezeptor von *D. melanogaster*. Möglicherweise bildet TRP γ einen dritten Ionenkanal im Photorezeptor, da bei heterologer Expression in HEK-Zellen ein konstitutiver Ionenstrom detektiert wird ähnlich zur Situation singulärer TRPL-Expression (XU *et al.*, 2000). Aktiviert werden die TRP- und TRPL-Kanäle (möglicherweise auch TRP γ) lichtabhängig unter Involvierung des visuellen G-Proteins und von *norpA*-kodierter PLC β . Die Entkopplung der INAD-TRP-Interaktion mit resultierender Fehllokalisierung von TRP führt zum nahezu vollständigen Verlust der Signaltransduktion (TSUNODA *et al.*, 1997). Die INAD-vermittelte Verankerung von TRP im Rhabdomer bindet das Ionenkanalprotein demnach an Regulationsmechanismen seiner Aktivität an. Ähnliches ist für die TRPL-Aktivität vorstellbar. Die Interaktion von TRPL mit INAD ist sowohl bei rekombinanter Expression als auch im Photorezeptor von *Drosophila* gezeigt (GOEL *et al.*, 2001). In *trp*-Mutanten, auf die sich *in vivo*-Daten über TRPL stützen, verbleiben ca. 25 % des INAD-Wildtypniveaus im Rhabdomer (TSUNODA *et al.*, 2001) und könnten TRPL-Regulationsmechanismen vermitteln, die die in heterologen Systemen beobachtete konstitutive Aktivität von TRPL unterbinden. Denkbar ist, dass das verbleibende rhabdomerlokalisierte INAD auch in *trp*-Mutanten dFKBP59 im Rhabdomer lokalisiert und die beschriebene inhibitorische Interaktion dFKBP / TRPL unterstützt (Interaktionen von INAD, TRPL und dFKBP sowie regulatorischer Einfluss von dFKBP siehe GOEL *et al.*, 2001). Zusammengenommen ergibt sich daraus eine alternative Erklärungsmöglichkeit zur TRPL-Heteromerisierungshypothese (XU *et al.*, 2000) für die *in vivo* fehlende konstitutive TRPL-Aktivität in *trp*-Mutanten.

Differierende Interaktionen und Regulationen der verschiedenen TRP-Kanalproteine modulieren möglicherweise den Einsatzbereich distinkter TRP-Kanäle im mikrovillären Photorezeptor. BÄHNER *et al.*, 2002 belegen beispielsweise für TRPL eine Funktion in der Adaptation an verschiedene Lichtbedingungen. Die belegte lichtabhängige Translokation von TRPL aus den Rhabdomeren heraus als Adaptationsmechanismus könnte notwendig sein zur Kompensation einer temporären TRPL-Abkopplung von INAD und den assoziierten Regulationsmechanismen. Abgeleitet aus heterologen TRPL-Expressionen ist freies TRPL mutmaßlich konstitutiv aktiv. Die Hypothese distinkter TRP-Kanäle, aktiviert über den Prozess G-Protein-aktivierter PLC β -Aktivität und mit differierenden Regulationsmechanismen, ist konform mit den Feststellungen von NIEMEYER *et al.*, 1996: TRP und TRPL müssen keine heteromeren Kanäle bilden - die Mutanten *trp* und *trpl* besitzen jeweils nur das verbleibende TRP-Protein und antworten dennoch auf Lichtaktivierung woraus folgt, dass beide Kanäle zur Wahrnehmung des intrazellulären Botenstoffes fähig sein müssen, der die lichtaktivierte Leitfähigkeit vermittelt; darüber hinaus benötigt keines der beiden Kanalproteine die vorherige Aktivierung des anderen Kanalproteins. Ein weiterer Aspekt differierender Regulationsmechanismen der DmTRP- und DmTRPL-Kanäle wäre auch im Zusammenhang mit ePKC-abhängiger Phosphorylierung denkbar.

Für TRPL konnte bisher keine ePKC-abhängige Phosphorylierung gezeigt werden. Neben fehlendem Nachweis, bedingt durch mutmaßlich nur temporäre Assoziation von TRPL mit dem INAD-Signalkomplex, ist es möglich, dass TRPL vergleichbar zu PLC β (LIU *et al.*, 2000) nicht phosphoryliert wird (beide Proteine besitzen PKC-Konsensusmotive). Für heteromere Kanäle reicht möglicherweise die Phosphorylierung einer Kanaluntereinheit zur Inaktivierung aus. Fehlende ePKC-abhängige TRPL-Phosphorylierung ist vielleicht aber Teil eines abweichenden Mechanismus, der differenzierte Steuerung distinkter Kanäle unter gleichen Lichtbedingungen und damit Adaptation an verschiedene Lichtverhältnisse ermöglicht. Ebenso ist eine TRPL-Steuerung durch Phosphorylierung von INAD nicht ausgeschlossen. Eine Situation ähnlich zur Adaptation an verschiedene Lichtbedingungen ist die Perzeption unterschiedlicher Temperaturen. Für die Temperatursensitivität der Mammalia ist belegt, dass verschiedene Kanalproteine, im übrigen Mitglieder der TRP-Proteinfamilie, in die Wahrnehmung verschiedener Temperaturbereiche involviert sind (TRPV1 [Vanilloidrezeptor Subtyp 1]: CATERINA *et al.*, 1997; TRPV2 [Vanilloidrezeptor-ähnlich Typ 1]: CATERINA *et al.*, 1999; TRPV3 und TRPV4: GULER *et al.*, 2002; TRPM8 [=CMR1]: MCKEMY *et al.*, 2002 und PEIER *et al.*, 2002).

5.3 Co-Expression von zentralen Komponenten des INAD-Signalkomplexes von *D. melanogaster* in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund

Eine Vielzahl von Komponenten, die in ihrem Zusammenwirken die Photorezeptorantwort auf perzipierte Lichtsignale vermitteln, wurden in Mutagenese-Experimenten identifiziert. Die Durchmusterung der erzeugten Fliegenmutanten erfolgte mit differierenden Methoden (Einblicke: genetischer *Screen*: PAK, 1979 und PAK, 1995; revers-genetischer Ansatz [*Screening* von Western Blots zur Nullproteinidentifizierung]: DOLPH *et al.*, 1993 mit *trpl*-Identifizierung durch NIEMEYER *et al.*, 1996). Allerdings sind in vielen Mutanten der Phototransduktionskaskade weitere Komponenten, vor allem die Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes, instabil und es kommt zur retinalen Degeneration. Funktionsanalysen einzelner Komponenten werden weiterhin begrenzt durch das Fehlen geeigneter Mutanten und durch den nicht exakt definierten photorezeptorspezifischen Hintergrund, wie die kürzliche Identifizierung weiterer Proteine mit Einfluss auf die Phototransduktion (beispielsweise dFKBP59 oder TRP γ) zeigt. Die Auswirkungen einer Mutation können überlagert oder modifiziert werden. Die Analyse einzelner und definiert zusammengestellter Komponenten in einem vom Photorezeptor unabhängigen genetischen und vor allem Proteomhintergrund wird ermöglicht durch rekombinante Expression. Durch rekombinante Expression ist ebenfalls eine schnelle Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen an gezielt mutierten Proteinen möglich. Ausserdem sind beispielsweise S2-Zellen als rekombinantes Expressionssystem für elektrophysiologische Analysen (*patch clamp*-Messungen, besonders Einzelkanalableitungen) besser zugänglich als Photorezeptoren.

5.3.1 Co-Expression der vier INAD-Kernkomplexkomponenten

Für die Signaltransduktion im mikrovillären Photorezeptor von *D. melanogaster* wurde die Bildung eines Multiproteinkomplexes identifiziert. Im INAD-Signalkomplex eingebunden sind TRP, ePKC, INAD und PLC β (HUBER *et al.*, 1996a; CHEVESICH *et al.*, 1997; TSUNODA *et al.*, 1997). Als Hauptträger des lichtabhängigen Ca²⁺-Einstroms in die Photorezeptorzellen nimmt die Untersuchung der Regulation von TRP eine zentrale Rolle ein. Versuche, TRP rekombinant zu exprimieren, führten entweder zu keiner funktionellen Expression oder resultierten in der Bildung von Kanälen mit Charakteristika, die deutlich von denen des nativen TRP abweichen (Zusammenfassung der rekombinanten TRP-Expressionen im Abschnitt 5.2.1). Eine mögliche Ursache für die Unterschiede könnte im Fehlen der weiteren Komponenten des INAD-Signalkomplexes in den rekombinanten Expressionssystemen begründet sein. Daher erfolgte im Rahmen des dargestellten Dissertationsprojektes erstmals die Etablierung der rekombinanten Co-Expression einerseits aller vier Hauptkomponenten des INAD-Komplexes und zum anderen von jeweils drei der Komponenten in variierenden Kombinationen. Die Expression von rDmePKC, rDmINAD-EGFP, rDmTRP und rDmPLC β -V5 wurde biochemisch durch Immunpräzipitationen, IMAC und Western Blot Analysen sowie immunocytochemisch verifiziert. Die Analyse der subzellulären Distribution der rekombinanten Proteine ergibt bei singulärer Expression, unabhängig von der Zugehörigkeit zu Klassen wie integrale oder periphere Membranproteine oder cytoplasmatische Proteine, eine nahezu homogene Verteilung innerhalb der gesamten S2-Zelle mit Ausnahme des Zellkerns. Dieses Lokalisationsmuster ändert sich für keine der rekombinant exprimierten Komponenten in Abhängigkeit von der Co-Expression weiterer Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes, wie die immunocytochemischen Lokalisationsmuster der klonal selektierten Linien Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC] A8 und E4, Komp[ePKC;TRP;PLC] cAH12, Komp[INAD;ePKC;PLC] b-E12, Komp[INAD;TRP;ePKC] a-H5 und Komp[INAD;TRP;PLC] 2-D12 belegen. Ebenso stimmen die Co-Lokalisationsmuster aller Linien überein. Ursache der Proteinlokalisationen innerhalb der gesamten Zelle ist mutmaßlich die subzelluläre Struktur von S2-Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von S2-Zellen (YAGODIN *et al.*, 1999) enthüllen die Verteilung eines Netzwerks von tubulärem Endoplasmatischem Reticulum innerhalb der gesamten Zelle. Die Synthese rekombinanter Proteine innerhalb der gesamten S2-Zelle überdeckt möglicherweise co-expressionsabhängige Relokalisationen. Die Lokalisationsdaten der co-exprimierenden S2-Linien erlauben somit keine Differenzierungen zwischen einer Co-Lokalisation aufgrund assemblierter INAD-Teilkomplexe und der losen Verteilung von Co-Expressionsprodukten, wie sie in der Linie Komp[ePKC;TRP;PLC] mit fehlendem Gerüstprotein erwartet wird. Abweichende Lokalisationsmuster exprimierter INAD-Komplexkomponenten (INAD und ePKC in CHO-Zellen, TSUNODA *et al.*, 2001) beruhen mutmaßlich auf einer differierenden Subzellulärstruktur, beispielsweise in polarer strukturierten Zellen, die eine Differenzierung zwischen dem Synthesort und der endgültigen Lokalisation des Proteins erlauben.

Die zur Expression von rDmINAD verwendete DmINAD-cDNA, inaDN2 (Sequenz ent-

spricht INAD-N / INAD-V unter A.13), hat mutmaßlich keinen Einfluss auf dargestellte Ergebnisse. Die Analysen publizierter INAD-Aminosäuresequenzen ergeben trotz abweichender Nukleinsäureabfolge eine hochkonservierte INAD-Primärstruktur und schließen somit funktionelle Differenzen aus (Sequenzanalysen im Anhang unter A.13 und A.12). Die einzige Ausnahme davon bildet die im Verlauf der Entstehung dieser Arbeit publizierte natürliche Variation der INAD-Proteinsequenz (PDZ2) mit unterschiedlicher Bindungsstärke für ePKC (KUMAR AND SHIEH, 2001).

Die generierten klonalen Linien Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC], Komp[ePKC;TRP;PLC], Komp[INAD;ePKC;PLC], Komp[INAD;TRP;ePKC] und Komp[INAD;TRP;PLC] sind geeignet, erstmals komplexere Wechselwirkungen der Kernkomplexkomponenten des INAD-Signalkomplexes isoliert von ihrem Umfeld im Photorezeptor reproduzierbar zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Analysen stehen folgende Fragen: I) wird der INAD-Signalkomplex autonom assembliert, II) resultiert die rekombinante Co-Expression von TRP, INAD, ePKC und PLC β in der Bildung funktioneller TRP-Ionenkanäle und III) welchen Einfluss haben die co-exprimierten Komplexkomponenten auf die Funktion der TRP-Kanäle und damit die Modulation des TRP-abhängigen Ionenstroms.

5.3.2 Assemblierung eines rekombinanten INAD-Komplexes

Verschiedene unabhängige Publikationen beschäftigten sich mit Einflüssen auf die Bildung des INAD-Signalkomplexes. Der INAD-Signalkomplex liegt im Photorezeptor, mit Rücksicht auf Protein-*turn over*, stationär vor. Messungen zum Verbleib von TRP in der rhabdomerischen Membran finden eine Reduktion um 25% nach neun Tagen (INAD-Halbwertszeit: 5,5 d, LI AND MONTELL, 2000). Der Versuch belegt eine relative Konstanz der INAD-Signalkomplexe in den lichtsensitiven Membranen, da ohne Komplexanbindung die TRP-Lokalisation nicht mehr auf die Mikrovilli beschränkt ist sondern sich über die gesamte Plasmamembran erstreckt (TSUNODA *et al.*, 1997). Aus Immunpräzipitationsuntersuchungen an Drosophila-Mutanten ging hervor, dass verschiedene PDZ-Domänen differierende und hoch-spezifische Targets besitzen (TSUNODA *et al.*, 1997). Diese Experimente legen ferner nahe, dass die Interaktion zwischen einem Gerüstprotein und dem jeweiligen Partner unabhängig von weiteren Interaktionspartnern entsteht. Die Interaktion von TRP und INAD wird als Kern zum Aufbau und Verbleib des Komplexes in der rhabdomerischen Membran dargestellt, wobei der Transport beider Proteine zur Membran unabhängig voneinander erfolgt (LI AND MONTELL, 2000 und TSUNODA *et al.*, 2001). Erste Belege für eine Präassemblierung von ePKC und PLC β an INAD, bevor INAD die rhabdomerische Membran erreicht, finden TSUNODA *et al.*, 2001. Demnach käme INAD eine entscheidende Rolle im zielgerichteten Membrantransport zu. Die Frage nach der Involvierung zusätzlicher Faktoren in den Mechanismus der Komplexetablirung führt zu NINAC (Myosin III). NINAC besitzt eine INAD-Bindungsstelle, das C-terminale PDZ-Domänen-Interaktionsmotiv VDI (Interaktion mit PDZ1, KIMPLE *et al.*, 2001). WES *et al.*, 1999 konnten jedoch zeigen, dass NINAC nicht für die Lokalisation des INAD-Signalkomplexes erforderlich ist sondern vermutlich in einen Prozess zur sta-

bilen Termination der Phototransduktion involviert ist. Für Rhodopsin, PLC β , ePKC und TRPL wird festgestellt, dass sie für die rhabdomerische Verteilung von INAD entbehrlich sind (LI AND MONTELL, 2000). PSD-95 ist ein weiteres PDZ-Domänenprotein und Gerüst eines Komplexes. Es wurde gezeigt, dass der Transport von PSD-95 in das postsynaptische Kompartiment vesikelabhängig ist und nach der Assemblierung von Komplexkomponenten erfolgt (EL-HUSSEINI *et al.*, 2000). Ein ähnlicher Mechanismus könnte dem INAD-Signalkomplextransport zugrunde liegen. Zusammengefasst sind weder der Ort der Komplexbildung noch die Form des Transports der einzelnen Komponenten beziehungsweise des präassemblierten Komplexes zur mikrovillären Photorezeptormembran bekannt und es fehlen ebenso Informationen über die Involvierung weiterer Faktoren in den Zusammenbau des INAD-Signalkomplexes.

Die erfolgreiche Co-Expression der vier Hauptkomponenten (lichtabhängiger Ca²⁺-Ionenkanal TRP, augenspezifische Proteinkinase C, *norpA*-kodierte Phospholipase C- β und Gerüstprotein INAD) des INAD-Signalkomplexes von *D. melanogaster* in S2-Zellen wirft die Frage auf, ob die rekombinante Co-Expression der Komponenten in einem photorezeptorunabhängigen Hintergrund ausreichend ist für die Assemblierung des INAD-Signalkomplexes. Die generierten S2-Linien mit Co-Expression der Kernkomponenten des INAD-Signalkomplexes wurden durch Immunpräzipitationen mit Analyse der Co-Präzipitationsprodukte auf Interaktionen zwischen den rekombinanten Proteinen untersucht. Die Immunpräzipitationen aus den Linien INAD-Komplex, im besonderen den zellklonbasierten Linien A8 und E4, wurden mit Antikörpern gerichtet gegen verschiedene Komponenten des mutmaßlichen Komplexes vorgenommen. Die Analysen mit α -DmTRP präzipitieren zusammen mit rDmTRP spezifisch rDmPKC und rDmPLC β -V5 aus polyklonalen Linien. Die Anwesenheit dieser Komponenten legt die Interaktion zwischen rDmTRP und rDmINAD-EGFP nahe, da die Präzipitation des INAD-Komplexes aus *D. melanogaster* die Anwesenheit des Gerüstproteins INAD erfordert (Kapitel 2.3.1) und keine direkte Interaktion beider Proteine mit TRP unter Ausschluss von INAD (*inaD*-Nullmutante) erfolgt. Die direkte Interaktion von rDmTRP mit rDmINAD-EGFP in S2-Zellen dokumentieren die Daten der α -DmTRP-Präzipitation aus Klon A8. Präzipitationsuntersuchungen mit α -V5 und α -EGFP resultieren ebenfalls in Co-Präzipitationen von mehreren Komponenten des rINAD-Signalkomplexes in nachweisbarer Quantität, wie die dargestellten Experimente in Abbildung 4.26 dokumentieren. Allerdings kann rDmTRP in beiden Immunpräzipitaten nicht nachgewiesen werden. Unspezifische Wechselwirkungen, beispielsweise zwischen α -DmINAD und DmTRP, schränken die Nachweisbarkeit der Proteininteraktionen ein. Festzuhalten ist, dass durch den redundanten direkten und indirekten Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen die Bildung eines rekombinanten INAD-Signalkomplexes, bestehend aus den vier rekombinant in S2-Zellen exprimierten Komponenten, nahegelegt wird. Analog wurde die Etablierung von Teilkomplexen und somit eine mögliche Präassemblierung durch Immunpräzipitation untersucht. Wie erwartet, ist in Abwesenheit des Gerüstproteins rDmINAD-EGFP in der Linie Komp[ePKC;TRP;PLC]cAH12 keine Co-Präzipitation der rekombinanten Expressionprodukte möglich. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von *inaD*-Nullmutanten (*D. melanogaster*) über-

ein. Ebenfalls vergleichbar zur Situation im Photorezeptor resultiert die Expression von nur drei INAD-Komplexkomponenten unter Einbeziehung von INAD in der Bildung eines Teilkomplexes. Beispielhaft dargestellt ist die Co-Präzipitation von rDmINAD-EGFP, rDmPKC sowie rDmTRP aus der Linie a-H5, die damit dem Präzipitationsverhalten einer *norpA*-Nullmutante entspricht. Die Bildung stabiler rekombinanter INAD-Teilkomplexe stützt die Sichtweise einer voneinander unabhängigen Anbindung der INAD-Interaktionspartner an das Gerüstprotein, die TSUNODA *et al.*, 1997 darstellen.

Die Immunpräzipitationsuntersuchungen an rekombinant co-exprimierenden S2-Zellen weisen erstmals nach, dass die Bildung rekombinanter INAD-Signalkomplexe beziehungsweise Teilkomplexe keine weiteren photorezeptorspezifischen Komponenten erfordert. Vielmehr handelt es sich um einen selbstorganisierenden Prozess, vermutlich unter Involvierung von allgemeinen intrazellulären Transportmechanismen. Die Erkennung und Bindung von PDZ-Interaktionsmotiven an PDZ-Domänen erfolgt vermutlich spontan. Diese Beobachtung wird gestützt durch mehrere Untersuchungen mit Peptiden von Targetproteinen (nachzuschlagen beispielsweise in RANGANATHAN AND ROSS, 1997; FUH *et al.*, 2000).

Die Immunpräzipitationen des INAD-Signalkomplexes aus rekombinant exprimierenden S2-Zellen unterscheiden sich in zwei Punkten von denen aus Photorezeptormembranen von *D. melanogaster*: I) Im Gegensatz zum stöchiometrischen Verhältnis der vier Hauptkomplexkomponenten zueinander im Präzipitat aus Photorezeptormembranen, in denen die INAD-Signalkomplexe stark angereichert sind, erfolgt die Präzipitation von Komponenten des rINAD-Komplexes substöchiometrisch: die jeweils direkt präzipitierte Komponente läßt sich im gefärbten Proteinmuster identifizieren wohingegen co-präzipitierte Proteine nur durch spezifische Immunmarkierung detektierbar sind; II) in keinem Präzipitationsansatz können alle vier rekombinanten Signalmoleküle nachgewiesen werden. Entweder liegt ein Teil der rekombinant exprimierten Proteine immer komplexengebunden in den S2-Zellen vor oder ein Teil der Interaktionen zwischen den Komplexkomponenten wird während der Präzipitationen gelöst. Ursache der unterschiedlichen Präzipitationsergebnisse ist hauptsächlich der deutlich geringere Anteil an exprimiertem und assembliertem Komplex im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt in S2-Zellen verglichen mit Photorezeptorzellen. Dieses Verhältnis bestimmt den weitaus höheren Hintergrund an unspezifisch präzipitierten Proteinen als methodisches Artefakt bei Immunpräzipitationen aus S2-Zellen verglichen mit nahezu hintergrundfreien INAD-Komplexen präzipitiert aus Fliegenköpfen. Diese unspezifisch gebundenen Proteine behindern einerseits die effiziente Präzipitation des rINAD-Komplexes und überlagern zum anderen die Immunmarkierung der Co-Präzipitate. Ein Bild ähnlich zur Präzipitation aus S2-Zellen ergibt sich bei der Immunpräzipitation des INAD-Signalkomplexes aus ganzen Fliegen (Referenz: Abbildung 4.44 B): die Co-Präzipitation der Komplexkomponenten erfolgt substöchiometrisch und das Immunpräzipitat umfasst einen hohen unspezifischen Hintergrund. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Teil der fehlenden stöchiometrischen Assemblierung des rekombinanten INAD-Signalkomplexes in S2-Zellen auf einem Präparationsartefakt bei Immunpräzipitation beruht.

Für PLC β sind zwei differierende Interaktionen mit INAD beschrieben: A) die Bindung

einer nicht näher definierten internen Region von PLC β an INAD-PDZ5 (VAN HUIZEN *et al.*, 1998) und B) eine schwefelbrückenbasierte Interaktion des PDZ-Domänen-Interaktionsmotivs von PLC β (FCA) mit PDZ1 von INAD. Die schwefelbrückenbasierte Interaktion wird mehrfach als sehr stabil beschrieben: I) da die Disulfidbrücke kritisch für die *high-affinity*-Heterotetramerbildung aus INAD und PLC β ist und als Absicherung einer konstitutiven Assoziation dient, wird sie sogar in der reduzierenden Umgebung eukaryotischer Zellen gebildet (KIMPLE *et al.*, 2001) und II) die Nutzung der letzten fünf Aminosäuren von *norpA*-kodierter PLC β ist aufgrund kovalenter Interaktion als *affinity purification tag* möglich (KIMPLE AND SONDEK, 2002). Die rekombinante Expression von PLC β in S2-Zellen erfolgte als rDmPLC β -V5-His. Durch die C-terminale Fusion der beiden Epitope V5 und Hexahistidin wird das C-terminale PDZ-Interaktionsmotiv von PLC β in die Primärstruktur des Fusionsproteins hinein verlagert und damit möglicherweise die Interaktionsfähigkeit gestört. Die dargestellten Immunpräzipitationsexperimente belegen eine robuste Interaktion der Proteine rDmINAD-EGFP und rDmPLC β -V5-His in S2-Zellen. Die offensichtliche Festigkeit der Interaktion rDmINAD-EGFP – rDmPLC β -V5-His spricht für die Ausbildung beider beschriebenen Interaktionen. Ein Erhalt der Interaktionsfähigkeit mit PDZ-Domänen bei Verlagerung der Interaktionsmotive distal vom unmittelbaren C-Terminus wirft möglicherweise ein neues Licht auf die umstrittene Frage des PDZ-Interaktionsmotives von TRP: endterminal (LI AND MONTELL, 2000, *pull down assay*) oder 12 Aminosäuren vom COOH-Terminus entfernt (SHIEH AND ZHU, 1996, ermittelt in *ligand overlay assays* mit mehreren Fusionsproteinen). Obwohl PDZ-Domänen-Interaktionsmotive endterminal charakterisiert sind, wird die strukturbedingte Assoziation von Domäne und Interaktionsmotiv vermutlich nicht zwingend durch eine Verlängerung des Peptides unterbunden. PDZ-Interaktionen mit internen Peptidsequenzen wurden zudem in den letzten Jahren mehrfach dokumentiert (Referenzen unter: <http://www.expasy.org/prosite/>, PROSITE cross-reference: PS50106, PDZ). Eine mögliche PDZ-Domänen-basierte Interaktion mit INAD über nicht endterminal gelegene Motive wäre dann auch für TRPL denkbar. Mögliche PDZ-Interaktionsmotive bestehen 12 und 15 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt: die Aminosäuren 1107-1112 der DmTRPL-Sequenz entsprechen mit SDISSI zweimal direkt hintereinander einem PDZ-Domänen-Interaktionsmotiv vom TypI. Die TRPL-Interaktion mit INAD muss jedoch nicht auf PDZ-Domänen begrenzt sein.

Der Nachweis der unabhängigen Bildung von rINAD-Signalkomplexen als Folge der rekombinanten Co-Expression führt zu der Frage, ob TRP im rekombinanten Signalkomplex funktional ist.

5.3.3 Funktionalität von rDmTRP im rINAD-Signalkomplex und Einflüsse assoziierter Komplexkomponenten

Im Wildtyp von *D. melanogaster* liegt TRP eingebunden im INAD-Signalkomplex vor. Die Bildung eines rekombinanten INAD-Signalkomplexes in den S2-Linien Komp[INAD;TRP;

PLC;ePKC] unter Einbindung von rDmTRP generiert für Untersuchungen von rDmTRP erstmals ein Umfeld vergleichbar zur Situation im mikrovillären Photorezeptor. Von besonderem Interesse ist daher das physiologische Verhalten dieser rDmTRP-Proteine. Die in dieser Arbeit dargestellten elektrophysiologischen Analysen (*whole cell recordings*) zeigen für den rekombinanten INAD-Signalkomplex in den beiden klonalen Linien A8 und E4 einen konstitutiven Ionenstrom. Der detektierte Ionenstrom in den Linien E4 und A8 besitzt eine große auswärts gerichtete Komponente, ein Charakteristikum von TRP-Kanälen, sowie eine kleine einwärts gerichtete. Der Vergleich mit der S2-Linie b-E12, die alle INAD-Kernkomplexkomponenten mit Ausnahme von TRP exprimiert, enthüllt, dass der dargestellte auswärtsgerichtete Ionenstrom spezifisch auf rDmTRP zurückgeführt werden kann. Die kleinere einwärtsgerichtete Komponente des Ionenstroms wird in der Referenzlinie ebenfalls detektiert und ist somit nicht spezifisch für TRP. Vergleiche mit weiteren untersuchten Linien, beispielsweise S2, zeigen, dass die einwärtsgerichtete Komponente von S2-endogenen Kanälen verursacht wird und Ca^{2+} -abhängig ist. Die Steuerung S2-endogener Kanäle durch rekombinante Co-Expression von rDmINAD-EGFP, rDmePKC und rDmPLC β -V5-His wird nicht beobachtet. Aus diesen Darstellungen folgt, dass in S2-Zellen bei rekombinanter Expression der Hauptkomponenten des INAD-Signalkomplexes mit Bildung eines rINAD-Signalkomplexes rDmTRP funktional exprimiert wird. TRP-charakteristische Parameter, wie beispielsweise die Inhibition durch La^{3+} , können nachgewiesen werden.

Die in Photorezeptoren von *D. melanogaster* beobachteten Charakteristika des TRP-Ionenkanals sind neben intrinsischen Eigenschaften des TRP-Proteins bedingt durch regulatorische Wechselwirkungen von TRP mit Effektoren. Zu diesen Effektoren gehört INAD. INAD ist erforderlich für die räumliche Lokalisierung von TRP im Rhabdomer der Photorezeptorzelle. Darüber hinaus bindet INAD TRP an ePKC an, eine Voraussetzung für die ePKC-abhängige Phosphorylierung und damit mutmaßlich Inaktivierung von TRP-Kanälen. Die Aktivierung von TRP über PLC β -vermittelte Prozesse steht ebenfalls mit INAD in Verbindung durch Assemblierung von PLC β und TRP im INAD-Signalkomplex. Im rekombinanten System S2, speziell in den klonalen S2-Linien a-H5 (Komp[INAD;TRP;ePKC]), 2-D12 (Komp[INAD;TRP;PLC]), b-E12 (Komp[INAD;ePKC;PLC]) sowie cAH12 (Komp[ePKC;TRP;PLC]), sind die exprimierten Komponenten des INAD-Komplexes, im Gegensatz zu Fliegenmutanten mit Defekten in Proteinen der Phototransduktion, abgekoppelt von weiteren photorezeptorspezifischen Interaktionspartnern bekannter und vor allem unbekannter Natur und damit einem gezielten Studium der individuellen Funktion auf den INAD-Signalkomplex und im besonderen auf den TRP-abhängigen Ionenstrom zugänglich.

Der in A8 und E4 (Komp[INAD; TRP;PLC;ePKC]) detektierte TRP-abhängige Ionenstrom ist gekoppelt an die Anwesenheit von rDmPLC β -V5-His: die WCR-Messungen von Klonen der Selektion Komp[INAD;TRP;ePKC] können keinen rDmTRP-abhängigen Ionenstrom nachweisen, obwohl die rDmTRP-Expression verifiziert wurde. Entweder ist eine konstitutive Aktivität von rDmPLC β -V5-His im rekombinanten INAD-Signalkomplex für die Aktivität von rDmTRP erforderlich oder das Fehlen des rekombinanten Phospholipa-

seproteins resultiert in einer veränderten, inaktiven Konformation von rDmTRP oder des rINAD-Komplexes im Vergleich zu den rINAD-Signalkomplexen in den Klonen A8 und E4. Mit den vorliegenden WCR-Messungen ist keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Situationen möglich. Fehlende Lokalisation in der Plasmamembran kann als Ursache ausgeschlossen werden, da PLC β und ePKC für die INAD-Lokalisation entbehrlich sind (LI AND MONTELL, 2000).

Die WCR-Messungen der Linie cAH12 (Komp[ePKC;TRP;PLC]) detektieren ebenfalls keinen Ionenstrom mit TRP-Abhängigkeit. Im Vergleich zur Situation mit Expression aller vier Kernkomplexkomponenten in den Klonen A8 und E4 zeigt das die Bedeutung von rDmINAD-EGFP für die Funktionalität von rDmTRP deutlich. Die Co-Expression des Aktivators rDmPLC β -V5-His sowie des mutmaßlichen Inaktivators rDmePKC ist nicht ausreichend, eine physische Kopplung an rDmTRP vermittelt über das Gerüstprotein rDmINAD-EGFP ist erforderlich für die Aktivität von rDmTRP-basierten Ionenkanälen. Unklar bleibt für das rekombinante System, ob die Enzymaktivität der Proteine rDmePKC und rDmPLC β für funktionelle TRP-Ionenkanäle erforderlich ist oder ob rDmTRP in Abwesenheit der Proteine eine nicht-aktivierbare Konformation einnimmt. Im mikrovillären Photorezeptor von *inaD*-Nullmutanten ist die elektrophysiologische Antwort dramatisch verändert, es verbleibt jedoch ein restliches Rezeptorpotential. Offensichtlich beruht dieses Rezeptorpotential auf dem Vorhandensein mindestens eines weiteren lichtabhängigen Ionenkanals, TRPL, dessen Regulation bisher ebenfalls nicht vollständig geklärt ist. Selbst die Analyse einer *inaD, trpl*-Doppelnullmutante kann die Auswirkungen eines Fehlens von INAD auf TRP nicht abschließend klären, da die Involvierung eines weiteren TRP-Proteins, TRP γ , in die Phototransduktion nicht geklärt ist. Darüber hinaus existieren eine Reihe weiterer photorezeptorspezifischer Faktoren mit nicht eindeutig bestimmter Funktion. Die Unterbrechung möglicher (temporärer) INAD-Anbindungen weiterer Proteine verursacht mutmaßlich einen Teil des mutanten Phänotyps. Ausserdem werden in Abwesenheit von INAD zumindest die INAD-Komplexproteine rasch degradiert. Die Analysen im rekombinanten System, speziell unter Verwendung der Referenzlinie cAH12, stellen eine Alternative für funktionelle Studien dar.

Die elektrophysiologischen Messungen der Linie Komp[INAD;TRP;PLC] 2-D12 unterscheiden sich überraschenderweise nicht von den Daten der Linien Komp[INAD;ePKC;PLC] beziehungsweise Komp[ePKC;TRP;PLC]: es wird kein rDmTRP-abhängiger Ionenstrom detektiert. Obwohl die Aktivität von rDmePKC bei Co-Expression in verschiedenen S2-Linien nicht gezeigt ist, hat das Fehlen des gesamten Proteins offensichtlich dramatische Auswirkungen auf die übrigen Mitglieder des rINAD-Signalkomplexes. Die ePKC-abhängige Phosphorylierung von INAD und TRP wird im Zusammenhang mit der Deaktivierung der Photorezeptorantwort gesehen, da *inaC*-Nullmutanten (*inaC* kodiert ePKC) bei einem nachweisbaren Ionenstrom elektrophysiologisch Inaktivierungsdefekte zeigen. Eine ePKC-Funktion im TRP-Aktivierungsmechanismus wird nicht diskutiert. Einflüsse von ePKC auf die Assemblierung des INAD-Komplexes oder auf den Transport präassemblierter Teilkomplexe sind ebenfalls nicht beschrieben. LI AND MONTELL, 2000 und TSUNODA *et al.*, 2001 schließen sogar, dass die Lokalisation von INAD und TRP unab-

hängig von ePKC ist. Da die Linien A8 und E4 die Bildung von rINAD-Komplexen mit funktionalem rDmTRP als Bestandteil der Plasmamembran belegen, verbleiben zwei alternative Erklärungsmöglichkeiten der Resultate aus 2-D12. Entweder ist die Anwesenheit des rDmePKC-Proteins unabhängig von der PKC-Aktivität erforderlich für die Ausbildung einer funktionalen Konformation des gesamten rINAD-Komplexes oder rDmePKC ist neben weiteren Funktionen involviert in den Aktivierungsmechanismus von rDmTRP. Auf Basis der WCR-Analysen dieser Arbeit kann keine Aussage getroffen werden, welche der beiden Möglichkeiten Ursache des beobachteten elektrophysiologischen Verhaltens ist. Zusammenfassend wird festgehalten, dass die Etablierung eines assemblierten rINAD-Signalkomplexes mit funktionalem rDmTRP und von S2-Zelllinien mit rekombinanten Teilkomplexen einen wichtigen Schritt in der Analyse der Funktionen des INAD-Signalkomplexes darstellt. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals direkt, dass die Anbindung von TRP an den INAD-Signalkomplex die physiologischen Eigenschaften des Ionenkanals unter Ausschluss weiterer photorezeptorspezifischer Faktoren verändert. Die Funktionalität von rDmTRP ist jedoch an die Co-Expression aller INAD-Kernkomplexkomponenten gekoppelt. Die ermittelten elektrophysiologischen Daten können keine spezifischen Einflüsse einzelner Komponenten ausmachen. Die Analysen im rekombinanten System zeigen, dass das Fehlen einer Komponente des rINAD-Komplexes die Funktionalität des gesamten Komplexes beeinträchtigt. Das spricht für die Ausbildung einer spezifischen funktionalen Konformation von rDmTRP bedingt durch die Konformation des gesamten rINAD-Komplexes. In elektrophysiologischen Messungen am mikrovillären Photorezeptor werden diese Effekte von weiteren Proteinen überlagert, die an der visuellen Signaltransduktion beteiligt sind. Eine Ausnahme davon stellt das Fehlen des Aktivators $PLC\beta$ dar: ohne *norpA*-kodierte Phospholipase erfolgt keine Änderung des Rezeptorpotentials. Die generierten S2-Linien bilden Basis und Ansatzpunkt für zukünftige Analysen verschiedenster Aspekte der INAD-Komplexabhängigen Signaltransduktion. Ein Beispiel dafür ist die Bestimmung der TRP-Einzelkanalleitfähigkeit in den Linien A8 und E4. Die erste direkte Messung dieses Wertes kann beispielsweise Auskunft geben, ob TRP-Kanäle eine geringe Einzelleitfähigkeit besitzen und koordiniert agieren, wie von HAAB *et al.*, 2000 postuliert wird.

5.4 Paramyosin - temporäre Assoziation mit dem INAD-Signalkomplex?

Die Identifizierung der Assoziation wichtiger Signalmoleküle der Phototransduktion in einem Multiproteinkomplex ist ein Meilenstein der Untersuchungen zum Verständnis der Signalwandlung und -leitung im Auge von *D. melanogaster*. Folgende Analysen zu Aufbau und Regulation des INAD-Signalkomplexes zeigten jedoch rasch deutlich, dass die untersuchten Prozesse komplexer sind. Allein die Frage nach der Zusammensetzung des INAD-Komplexes erwies sich als schwierig zu beantworten. Neben den vier Hauptkom-

ponenten sind weitere Assoziationspartner beschrieben, deren Status jedoch nicht eindeutig geklärt ist (Darstellung: Kapitel 2.3.5). Prominentestes Beispiel dafür ist TRPL: die unter anderem in rekombinanten Co-Immunpräzipitationsexperimenten gezeigte TRPL-Interaktion mit INAD (GOEL *et al.*, 2001) steht versus die belegte lichtabhängige TRPL-Translokation zwischen Rhabdomer und intrazellulären Membrankompartimenten (BÄHNER *et al.*, 2002). Diskutiert wird daher eine Dynamik des INAD-Signalkomplexes mit temporären Interaktionen. Experimentelle Belege fehlen jedoch. Allerdings ist für verschiedene identifizierte Proteine mit Einfluss auf die visuelle Signaltransduktion (NINAC Myosin III, INAF, dFKBP59, TRP γ) der Mechanismus ihrer Wirkung beziehungsweise ihre Funktion unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres Protein identifiziert, dass mit dem INAD-Signalkomplex immunpräzipitiert werden kann: p105. In weitgehend hintergrundfreien Co-Immunpräzipitationsexperimenten des INAD-Komplexes aus Wildtypfliegen erschien im Proteinstreifen, neben den vier Hauptkomponenten, sporadisch eine weitere Proteinbande. Verschiedene Analysen zeigen einen Zusammenhang der Co-Präzipitation von p105 mit den Lichtbedingungen während der Fliegenanzucht. P105 wäre damit ein Kandidat für temporäre Komplexassoziation. Allerdings konnten keine Lichtbedingungen (Qualität, Intensität, Belichtungsdauer) identifiziert werden, unter denen p105 robust reproduzierbar im Vergleich zu einer Dunkelkontrolle verstärkt co-präzipitiert wird. Massenspektrometrische Analysen von p105, co-präzipitiert aus ganzen Fliegen zur Gewinnung von ausreichend Material, identifizierten das untersuchte Protein als Paramyosin. Paramyosin von *D. melanogaster* wurde hauptsächlich als Bestandteil von Muskulatur identifiziert (VINOS *et al.*, 1991). Es ist ein stabähnliches Molekül aufgebaut aus Dimeren monomerer *coiled coil*-Strukturen. Paramyosin bildet eine helikale Netzstruktur aus, die einen Teil des Kerns von dicken Filamenten bildet. Paramyosin interagiert mit Myosin, speziell nur mit dem alpha-helikalen Stab von leichtem Meromyosin (zusammengefaßt bei BECKER *et al.*, 1992). Dabei formt es einen parakristallinen Kern mit dem Motorprotein Myosin auf der Oberfläche. Mit oder ohne Myosinpartner könnte Paramyosin die Funktion haben, die Intermediärfilamente in Vertebraten erfüllen (LIU *et al.*, 2003). Die Gewinnung von p105-Material durch Co-Immunpräzipitation unter Verwendung ganzer Fliegen schließt eine mögliche Kontamination des Co-Präzipitationsproduktes p105 mit Proteinen aus verschiedenen Geweben, darunter vor allem Muskulatur (beispielsweise aus dem Thorax) ein. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde p105 aus isolierten Membranen separierter Köpfe präpariert. Das Massenspektrum dieses Materials identifizierte p105 erneut als Paramyosin. Die Präparation von p105 aus isolierten Kopfmembranen in Verbindung mit der Zugänglichkeit des Proteins durch Co-Präzipitation mit verschiedenen Antikörpern (α -DmTRP, α -DmTRPL, α -DmINAD) sprechen gegen unspezifische Co-Präzipitation von Paramyosin mit dem INAD-Komplex und gegen eine unspezifische Kreuzreaktion eines Antikörpers mit p105. Die Identifizierung von p105 als Paramyosin ermöglicht gezielte Studien, die eine Interaktion des Proteins mit dem INAD-Signalkomplex untersuchen können, beispielsweise die Generierung von α -Paramyosin-Antikörpern für Co-Immunpräzipitationsanalysen aus Kopfmembranen, die Untersuchung des Paramyosinexpressionmusters in Köpfen von

D. melanogaster oder die rekombinante Co-Expression.

Über die Funktion einer möglichen temporären Assoziation von Paramyosin mit dem INAD-Signalkomplex kann nur spekuliert werden. Priorität in weiteren Analysen hat die Identifizierung des exakten Interaktionspartners, unter anderem durch Untersuchung von Fliegen mutant für eine oder mehrere Komponenten des INAD-Signalkomplexes. Denkbar wäre eine Interaktion mit INAD, da für PDZ-Domänen auch die Bindung direkt cytoskelettassoziiertes Elemente angegeben wird (TSUNODA *et al.*, 2001). Mit NinaC ist bereits die Involvierung eines Proteins mit Cytoskelettcharakter in die Phototransduktion beschrieben, wobei auch hier die exakte Funktion ungeklärt ist. Denkbar wäre die Beteiligung an Prozessen wie Transport, Lokalisation oder Verankerung. Die Verifizierung einer lichtabhängigen Bindung von p105-Paramyosin an den INAD-Komplex wäre der erste Beleg für Dynamik des INAD-Signalkomplexes mit temporären Interaktionen.

Literaturverzeichnis

- ABRAMS J M, LUX A, STELLER H, AND KRIEGER M (1992). Macrophages in *Drosophila* embryos and L2 cells exhibit scavenger receptor-mediated endocytosis. *PNAS USA*, **89**:10375–10379
- ACHARYA J K, JALINK K, HARDY R W, HARTENSTEIN V, AND ZUKER C S (1997). InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*. *Neuron*, **18**:881–887
- ADAMSKI F M, ZHU M Y, BAHIRAEI F, AND SHIEH B H (1998). Interaction of eye protein kinase C and INAD in *Drosophila*. Localization of binding domains and electrophysiological characterization of a loss of association in transgenic flies. *JBC*, **273**:17713–17719
- AGAM K, VON CAMPENHAUSEN M, LEVY S, BEN-AMI H C, COOK B, KIRSCHFELD K, AND MINKE B (2000). Metabolic stress reversibly activates the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL in vivo. *J. Neurosci.*, **20**:5748–5755
- AITKEN A (1995). 14–3–3 proteins on the MAP. *Trends Biochem. Sci.*, **20**:95–97
- Anti-GFP Product Description (1999). Anti-GFP: mixture of two monoclonal antibodies (clones 7.1 and 13.1) to GFP, stabilized antibody preparation (Product Description). Version 1 pi1814460-08/99, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA
- Anti-mouse IgG Product Description (1998). Anti-mouse IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase conjugate (Product Description). Product Information A3562 04/98, Sigma-Aldrich, München
- Anti-V5 Product Description (2001). Anti-V5 Antibody. Version F 073001 28-0140, Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
- APPLEBURRY M L AND HARGRAVE P A (1986). Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res.*, **26**:1881–1895
- BASHAW G J AND BAKER B S (1995). The *msl-2* dosage compensation gene of *Drosophila* encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex specifically regulated by Sex-lethal. *Development*, **121**:3245–3258

- BASHAW G J AND BAKER B S (1997). The regulation of the *Drosophila* msl-2 gene reveals a function for Sex-lethal in translational control. *Cell*, **89**:789–798
- BECKER K D, O'DONNELL P T, HEITZ J M, VITO M, AND BERNSTEIN S I (1992). Analysis of *Drosophila* Paramyosin: Identification of a Novel Isoform Which Is Restricted to a Subset of Adult Muscles. *J. Cell Biol.*, **116**:669–681
- BEEBE K D, SHIN J S, PENG J, CHAUDHURY C, KHERA J, AND PEI D (2000). Substrate Recognition through a PDZ Domain Tail-Specific Protease. *Biochemistry*, **39**:3149–3155
- BÄHNER M (2001). Ionenkanäle im mikrovillären Photorezeptor: TRP, TRPL und ihre Organisation im INAD-Signalkomplex. *Universität Karlsruhe (TH)*
- BÄHNER M, FRECHTER S, DA SILVA N, MINKE B, PAULSEN R, AND HUBER A (2002). Light-Regulated Subcellular Translocation of *Drosophila* TRPL Channels Induces Long-Term Adaptation and Modifies the Light-Induced Current. *Neuron*, **34**:83–93
- BÄHNER M, SANDER P, PAULSEN R, AND HUBER A (2000). The visual G protein of fly photoreceptors interacts with the PDZ domain assembled INAD signaling complex via direct binding of activated G α_q to phospholipase C β . *JBC*, **275**:2901–2904
- BIRNBAUMER L, ZHU X, JIANG M, BOULAY G, PEYTON M, VANNIER B, BROWN D, PLATANO D, SADEGHI H, STEFANI E, AND BIRNBAUMER M (1996). On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *PNAS USA*, **93**:15195–15202
- BIRNBOIM H C AND DOLY J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR*, **7**:1513–1523
- BLOOMQUIST B T, SHORTRIDGE R D, SCHNEUWLY S, PERDEW M, MONTELL C, STELLER H, RUBIN G, AND PAK W L (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell*, **54**:723–733
- BOULAY G, ZHU X, PEYTON M, JIANG M, HURST R, STEFANI E, AND BIRNBAUMER L (1997). Cloning and Expression of a Novel Mammalian Homolog of *Drosophila* Transient Receptor Potential (Trp) Involved in Calcium Entry Secondary to Activation of Receptors Coupled by the G $_q$ Class of G Protein. *JBC*, **272**:29672–29680
- CAMERON A M, NUCIFORE F C, FUNG E T, LIVINGSTON D J, ALDAPE R A, ROSS C A, AND SNYDER S H (1997). FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400–1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *JBC*, **272**:27582–27588
- CATERINA M J, ROSEN T A, TOMINAGA M, BRAKE A J, AND JULIUS D (1999). A capsaicin receptor homologue with a threshold for noxious heat. *Nature*, **398**:436–441

- CATERINA M J, SCHUMACHER M, TOMINAGA M, ROSEN T A, LEVINE J D, AND JULIUS D (1997). The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**:816–824
- CHEVESICH J, KREUZ A J, AND MONTELL C (1997). Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron*, **18**:95–105
- CHYB S, RAGHU P, AND HARDIE R C (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature*, **397**:255–259
- CLAPHAM D E, RUNNELS L W, AND STRÜBING C (2001). The TRP Ion Channel Family. *Nature Neurosci.*, **2**:387–396
- COOK B, BAR-YAACOV M, COHEN B, GOLDSTEIN R E, PAROUSH Z, SELINGER Z, AND MINKE B (2000). Phospholipase C and termination of G-protein-mediated signalling *in vivo*. *Nat. Cell Biol.*, **2**:296–301
- CULLEN P J (2001). Ras effectors: buying shares in Ras plc. *Curr. Biol.*, **11**:R342–344
- DANIELS D L, COHEN A R, ANDERSON J M, AND BRUNGER A T (1998). Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition. *Nat. Struct. Biol.*, **5**:317–325
- DEVARY O, HEICHAL O, BLUMENFELD A, CASSEL D, SUSS E, BARASH S, RUBINSTEIN C T, MINKE B, AND SELINGER Z (1987). Coupling of photoexcited rhodopsin to inositol phospholipid hydrolysis in fly photoreceptors. *PNAS USA*, **84**:6939–6943
- DIETRICH W (1909). Die Facettenaugen der Dipteren. *Z. Wiss. Zool.*, **92**:465–539
- DOLPH P J, RANGANATHAN R, COLLEY N J, HARDY R W, SOCOLICH M, AND ZUKER C S (1993). Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin *in vivo*. *Science*, **260**:1910–1916
- DONG Y, KUNZE D L, VACA L, AND SCHILLING W P (1995). Ins(1,4,5)P₃ activates *Drosophila* cation channel Trpl in recombinant baculovirus-infected Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.*, **269**:C1332–C1339
- DOYLE M L (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**:31–35
- EL-HUSSEINI A E, CRAVEN S E, CHETKOVICH D M, FIRESTEIN B L, SCHNELL E, AOKI C, AND BRETT D S (2000). Dual Palmitoylation of PSD-95 Mediates Its Vesiculotubular Sorting, Postsynaptic Targeting, and Ion Channel Clustering. *J. Cell Biol.*, **148**:159–171
- ESTACION M, SINKINS W G, AND SCHILLING W P (1999). Stimulation of *Drosophila* TrpL by capacitative Ca²⁺ entry. *Biochem. J.*, **341**:41–49

- FANNING A S AND ANDERSON J M (1999). Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**:432–439
- FERGUSON K M, KAVRAN J M, SANKARAN V G, FOURMIER E, ISAKOFF S J, SKOLNIK E Y, AND LEMMON M A (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell*, **6**:373–384
- FERNANDEZ J M, FERNANDEZ J, AND HOEFFLER J P (1999). *Gene Expression Systems*. Academic Press, San Diego, USA, first edition
- FUH G, PISABARRO M T, LI Y, QUAN C, LASKY L A, AND SIDHU S S (2000). Analysis of PDZ Domain-Ligand Interactions Using Carboxyl-terminal Phage Display. *JBC*, **275**:21486–21491
- GILLO B, CHORNA I, COHEN H, COOK B, MANISTERSKY I, CHOREV M, ARNON M, POLLOCK J A, SELINGER Z, AND MINKE B (1996). Coexpression of *Drosophila* TRP and TRP-like proteins in *Xenopus* oocytes reconstitutes capacitative Ca^{2+} entry. *PNAS USA*, **93**:14146–14151
- GOEL M, GARCIA R, ESTACION M, AND SCHILLING W P (2001). Regulation of *Drosophila* TRPL channels by immunophilin FKBP59. *JBC*, **276**:38762–38773
- GULER A, LEE H, IIDA T, SHIMIZU I, TOMINAGA M, AND CATERINA M (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J. Neurosci.*, **22**:6408–6414
- HAAB J E, VERGARA C, BACIGALUPO J, AND O'DAY P M (2000). Coordinated Gating of TRP-Dependent Channels in Rhabdomeral Membranes from *Drosophila* Retinas. *J. Neurosci.*, **20**:7193–7198
- HAMBRECHT J, ZIMMER S, FLOCKERZI V, AND CAVALIE A (2000). Single-channel currents through transient-receptor-potential-like (TRPL) channels. *Pflugers Arch.*, **440**:418–426
- HARDIE R C AND MINKE B (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, **8**:643–651
- HARDIE R C, PERETZ A, SUSS-TOBY E, ROM-GLAS A, BISHOP S A, SELINGER Z, AND MINKE B (1993). Protein kinase C is required for light adaption in *Drosophila* photoreceptors. *Nature*, **363**:634–637
- HARDIE R C AND RAGHU P (1998). Activation of heterologously expressed *Drosophila* TRPL channels: Ca^{2+} is not required and InsP_3 is not sufficient. *Cell Calcium*, **24**:153–163
- HARDIE R C, REUSS H, LASDELL S J, AND MILLAR N S (1997). Functional equivalence of native light-sensitive channels in the *Drosophila trp*³⁰¹ mutant and TRPL cation channels expressed in a stably transfected *Drosophila* cell line. *Cell Calcium*, **21**:431–440

- HARTENECK C, KUCHTA S N, HUBER A, PAULSEN R, AND SCHULTZ G (2002). The PDZ scaffold protein INAD abolishes apparent store-dependent regulation of the light-activated cation channel TRP. *FASEB J*, **16**:1668–1670
- HARTENECK C, OBUKHOV A G, ZOBEL A, KALKBRENNER F, AND SCHULTZ G (1995). The Drosophila cation channel trpl expressed in insect Sf9 cells is stimulated by agonists of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.*, **358**:297–300
- HARTENECK C, PLANT T D, AND SCHULTZ G (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.*, **23**:159–166
- HATA Y, NAKANISHI H, AND TAKAI Y (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci. Res.*, **32**:1–7
- HEUKESHOVEN J AND DERNICK R (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in Phast System development unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, **9**:28–32
- HILLIER B C, CHRISTOPHERSON K S, PREHODA K E, BREDT D S, AND LIM W A (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science*, **284**:812–815
- HOFMANN T, SCHAEFER M, SCHULTZ G, AND GUDERMANN T (2000). Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem. J.*, **351**:115–122
- HOFMANN T, SCHAEFER M, SCHULTZ G, AND GUDERMANN T (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *PNAS USA*, **99**:7461–7466
- HOFSTEE C A, HENDERSON S, HARDIE R C, AND STAVENGA D G (1996). Differential effects of ninaC proteins (p132 and p174) on light-activated currents and pupil mechanism in Drosophila photoreceptors. *Visual Neurosci.*, **13**:897–906
- HOTTA Y AND BENZER S (1970). Genetic dissection of the Drosophila nervous system by means of mosaics. *PNAS USA*, **67**:1156–1163
- HU Y AND SCHILLING W P (1995). Receptor-mediated activation of recombinant Trpl expressed in Sf9 insect cells. *Biochem. J.*, **305**:605–611
- HU Y, VACA L, ZHU X, BIRNBAUMER L, KUNZE D L, AND SCHILLING W P (1994). Appearance of a novel Ca²⁺ influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of Drosophila. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**:1050–1056
- HUBER A (2001). Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Europ. J. Neurosci.*, **14**:769–776

- HUBER A, BELUSIC G, DA SILVA N, BÄHNER M, GERDON G, DRASLAR K, AND PAULSEN R (2000). The *Calliphora rpa* mutant lacks the PDZ domain-assembled INAD signalling complex. *Eur. J. Neurosci.*, **12**:3909–3918
- HUBER A, SANDER P, BÄHNER M, AND PAULSEN R (1998). The TRP Ca^{2+} channel assembled in a signaling complex by the PDZ domain protein INAD is phosphorylated through the interaction with protein kinase C (ePKC). *FEBS Lett.*, **425**:317–322
- HUBER A, SANDER P, GOBERT A, BÄHNER M, HERMANN R, AND PAULSEN R (1996a). The transient receptor potential protein (TRP), a putative store-operated Ca^{2+} channel essential for phosphoinositide-mediated photoreception, forms a signaling complex with NorpA, InaC and InaD. *EMBO J.*, **15**:7036–7045
- HUBER A, SANDER P, AND PAULSEN R (1996b). Phosphorylation of the InaD gene product, a photoreceptor membrane protein required for recovery of visual excitation. *JBC*, **271**:11710–11717
- INOUE H, YOSHIOKA T, AND HOTTA Y (1988). Membrane-associated phospholipase C of *Drosophila* retina. *J. Biochem.*, **103**:91–94
- JUNGNICKEL M K, MARRERO H, BIRNBAUMER L, LEMOS J R, AND FLORMAN H M (2001). Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*, **3**:499–502
- KAECH S M, WHITFIELD C W, AND KIM S K (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 Complex Mediates Basolateral Membrane Localization of the *C. elegans* EGF Receptor LET-23 in Vulva Epithelial Cells. *Cell*, **94**:761–771
- KEDEI N, SZABO T, LILE J D, TREANOR J J, OLAH Z, IADAROLA M J, AND BLUMBERG P M (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *JBC*, **276**:28613–28619
- KELLEY R L, SOLOVYEVA I, LYMAN L M, RICHMAN R, SOLOVYEV V, AND KURODA M I (1995). Expression of *msl-2* causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and femal lethality in *Drosophila*. *Cell*, **81**:867–877
- KELLEY R L, WANG J, BELL L, AND KURODA M I (1997). Sex lethal controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. *Nature*, **387**:195–199
- KIMPLE M E AND SONDEK J (2002). Affinity tag for protein purification and detection based on the disulfide-linked complex of InaD and NorpA. *Biotechniques*, **578**:584–588
- KIMPLE R J, SIDEROVSKI D P, AND SONDEK J (2001). Functional relevance of the disulfide-linked complex of the N-terminal PDZ domain of InaD with NorpA. *EMBO J.*, **20**:4414–4422

- KIRSCHFELD K (1967). Die Projektion der optischen Umwelt auf das Raster der Rhabdomere im Komplexauge von *Musca*. *Exp. Brain. Res.*, **3**:248–270
- KOCKEL L, VORBRUEGGEN G, JAECKLE H, MLODZIK M, AND BOHMANN D (1997). Requirement for *Drosophila* 14-3-3 zeta in Raf-dependent photoreceptor development. *Genes Dev.*, **11**:1140–1147
- KUMAR R AND SHIEH B H (2001). The second PDZ domain of InaD is a type I domain involved in binding to eye protein kinase C. Mutational analysis and naturally occurring variants. *JBC*, **276**:24971–24977
- KUNZE D L, SINKINS W G, VACA L, AND SCHILLING W P (1997). Properties of single *Drosophila* Trpl channels expressed in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.*, **272**:C27–C34
- KYUHYUNG H (1996). An efficient DDAB-mediated transfection of *Drosophila* S2 cells. *NAR*, **24**:4362–4363
- LAEMMLI U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:682–685
- LAN L, BAWDEN M J, AULD A M, AND BARRITT G J (1996). Expression of *Drosophila trpl* cRNA in *Xenopus laevis* oocytes leads to the appearance of a Ca²⁺ channel activated by Ca²⁺ and calmodulin, and by guanosin 5' [γ -thio]-triphosphate. *Biochem. J.*, **316**:793–803
- LEE Y J, DOBBS M B, VERARDI M L, AND HYDE D R (1990). dgq: a *Drosophila* gene encoding a visual system-specific G α molecule. *Neuron*, **5**:889–898
- LEUNG H T, GENG C, AND PAK W L (2000). Phenotypes of trpl mutants and interactions between the transient receptor potential (TRP) and TRP-like channels in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **20**:6797–6803
- LI C, GENG C, LEUNG H T, HONG Y S, STRONG L L R, SCHNEUWLY S, AND PAK L W (1996). INAF, a protein required for transient receptor potential Ca²⁺ channel function. *PNAS USA*, **23**:13474–13479
- LI H S AND MONTELL C (2000). TRP and the PDZ protein, INAD, form the core complex required for retention of the signalplex in *Drosophila* photoreceptor cells. *JBC*, **150**:1411–1422
- LI H S, PORTER J A, AND MONTELL C (1998). Requirement for the NINAC Kinase/Myosin for stable termination of the visual cascade. *J. Neurosci.*, **18**:9601–9606
- LIU H, MARDAHL-DUMESNIL M, SWEENEY S T, O'KANE C J, AND BERNSTEIN S I (2003). *Drosophila* paramyosin is important for myoblast fusion and essential for myofibril formation. *J. Cell Biol.*, **160**:899–908

- LIU M, PARKER L L, WADZINSKI B E, AND SHIEH B H (2000). Reversible phosphorylation of the signal transduction complex in *Drosophila* photoreceptors. *JBC*, **275**:12194–12199
- Living Colors® User Manual (1999). Living Colors® User Manual. Technical Report PT2040-1 (PR94845), Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA
- MASLOV S AND SNEPPEN K (2002). Specificity and stability in Topology of Protein Networks. *Science*, **296**:910–913
- MCKAY R R, ZHU L, AND SHORTRIDGE R D (1994). Membrane association of phospholipase C encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, **61**:141–148
- MCKEMY D D, NEUHAUSSER W M, AND JULIUS D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**:52–58
- MERY L, STRAUSS B, DUFOUR J F, KRAUSE K H, AND HOTH M (2002). The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *Cell. Sci.*, **115**:3497–3508
- MINKE B AND AGAM K (2003). TRP gating is linked to the metabolic state and maintenance of the *Drosophila* photoreceptor cells. *Cell Calcium*, **33**:395–408
- MOCHLY-ROSEN D AND GORDON A S (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.*, **12**:35–42
- MONTELL C (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**:231–268
- MONTELL C (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Science STKE*, **90**:RE1
- MONTELL C, BIRNBAUMER L, AND FLOCKERZI V (2002). The TRP Channel, a Remarkable Functional Family. *Cell*, **108**:595–598
- MONTELL C AND RUBIN G (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, **2**:1313–1323
- MORAIS CABRAL J, PETOSA C, SUTCLIFFE M J, RAZA S, BYRON O, POY F, MARFATIA S M, CHISHTI A H, AND LIDDINGTON R C (1996). Crystal structure of a PDZ domain. *Nature*, **382**:649–652
- MORGAN N S (1995). The myosin superfamily in *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Zool.*, **273**:104–117

- NG K P, KAMBARA T, MATUSUURA M, BURKE M, AND IKEBE M (1996). Identification of myosin III as a protein kinase. *Biochemistry*, **35**:9392–9399
- NIEMEYER B A, SUZUKI E, SCOTT K, JALINK K, AND ZUKER C S (1996). The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell*, **85**:651–659
- NucleoBond® Plasmid Purification (1997). NucleoBond® Plasmid Purification. Protocol Mega-Preps PT3179-2, Version: PR7X200, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
- OBUKHOV A G, HARTENECK C, ZOBEL A, HARHAMMER R, KALKBRENNER F, LEOPOLDT D, LÜCKHOFF A, NÜRNBERG B, AND SCHULTZ G (1996). Direct activation of trpl cation channels by Galpha 11 subunits. *EMBO J.*, **15**:5833–5838
- OVCHINNIKOV Y A, ABDULAEV N G, FEIGINA M Y, ARTAMONOV I D, ZOLOTAREV M S, KOSTINA M B, BOGACHUTE A S, MIRISHINIKOV A, MARTYNOV V, AND KUDELIN A B (1982). The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. *Bioorg. Khim.*, **8**:1011–1014
- PAK W L (1979). Study of photoreceptor function using *Drosophila* mutants. In: Neurogenetics: genetic approaches to the nervous system. (X. Breakfield, ed.). *New York: Elsevier-North Holland*, 67–99
- PAK W L (1995). *Drosophila* in vision research. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**:2340–2357
- PAK W L, GROSSFIELD J, AND ARNOLD K S (1970). Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **227**:518–520
- PAPATSENKO D, NAZINA A, AND DESPLAN C (2001). A conserved regulatory element present in all *Drosophila* rhodopsin genes mediates Pax6 functions and participates in the fine-tuning of cell-specific expression. *Mech. Develop.*, **101**:143–153
- PAULSEN R, BÄHNER M, AND HUBER A (2000). The PDZ assembled „transducisome“ of microvillar photoreceptors: the TRP / TRPL problem. *Pflugers Arch.*, **439**:R181–R183
- PAWSON T AND NASH P (2003). Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science*, **300**:445–452
- PEIER A M, MOQRICH A, HERGARDEN A C, REEVE A J, ANDERSSON D A, STORY G M, EARLEY T J, DRAGONI I, MCINTYRE P, BEVAN S, AND PATAPOUTIAN A (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**:705–715
- PETERSEN C C H, BERRIDGE M J, BORGESSE M F, AND BENNETT D L (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem. J.*, **311**:41–44

- PHILLIPS A M, BULL A, AND KELLY L E (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron*, **8**:631–642
- PORTER J A, MINKE B, AND MONTELL C (1995). Calmodulin binding to *Drosophila* *ninaC* required for termination of phototransduction. *EMBO J.*, **14**:4450–4459
- PORTER J A, YU M, DOBERSTEIN S K, AND POLLARD C T D AN MONTELL (1993). Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINAC unconventional myosin. *Science*, **262**:1038–1042
- QIAprep Miniprep Handbook (2001). QIAprep Miniprep Handbook. Handbook Version PR7X200, Qiagen, Hilden
- RAGHU P, COLLEY N J, WEBEL R, JAMES T, HASAN G, DANIN M, SELINGER Z, AND HARDIE R C (2000a). Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP_3 receptor gene. *Mol. Cell. Neurosci.*, **15**:429–445
- RAGHU P, USHER K, JONAS S, CHYB S, POLYANOVSKY A, AND HARDIE R C (2000b). Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the *Drosophila* diacylglycerol kinase mutant, *rdgA*. *Neuron*, **26**:169–179
- RANGANATHAN R, HARRIS G L, STEVENS C F, AND ZUKER C S (1991). A *Drosophila* mutant defective in extracellular calcium-dependent photoreceptor deactivation and rapid desensitization. *Nature*, **354**:230–232
- RANGANATHAN R AND ROSS E M (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr. Biol.*, **7**:R770–R773
- RAUCHER D, STAUFFER T, CHEN W, SHEN K, GUO S, YORK J D, SHEETZ M P, AND MEYER T (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, **100**:221–228
- REUSS H, MOJET M H, CHYB S, AND HARDIE R C (1997). In Vivo Analysis of the *Drosophila* Light-Sensitive Channels, TRP and TRPL. *Neuron*, **19**:1249–1259
- RYNER L C AND BAKER B S (1991). Regulation of doublesex pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. *Genes Dev.*, **5**:2071–2085
- SAMAKOVLIS C, KIMBRELL D A, KYLSTEN P, ENGSTROM A, AND HULTMARK D (1990). The immune response in *Drosophila*: Pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.*, **9**:2967–2976
- SAMBROOK J, FRITSCH E F, AND MANIATIS T (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, volume 1. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition

- SANDER P (1996). Signaltransduktion in mikrovillären Photorezeptoren: Funktion der augenspezifischen Proteinkinase C. *Universität Karlsruhe (TH)*
- SANGER F, NICKLEN S, AND COULSEN A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA*, **74**:5463–5467
- SCHAEFFER E, SMITH D, MARDON G, QUINN W, AND ZUKER C S (1989). Isolation and characterization of two new drosophila protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell*, **57**:403–412
- SCHNEIDER I (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **27**:353–365
- SCOTT K, SUN Y, BECKINGHAM K, AND ZUKER C S (1997). Calmodulin regulation of *Drosophila* light-activated channels and receptor function mediates termination of the light response *in vivo*. *Cell*, **91**:375–383
- SCOTT K AND ZUKER C (1998). TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8**:383–388
- SELINGER Z, DOZA Y N, AND MINKE B (1993). Mechanisms and genetics of photoreceptors desensitization in *Drosophila* flies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**:283–299
- SHIEH B H AND NIEMEYER B (1995). A novel protein encoded by the *InaD* gene regulates recovery of visual transduction in *Drosophila*. *Neuron*, **14**:201–210
- SHIEH B H AND ZHU M Y (1996). Regulation of the TRP Ca^{2+} channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, **16**:991–998
- SHIEH B H, ZHU M Y, LEE J K, KELLY I M, AND BAHIRAEI F (1997). Association of INAD with NORPA is essential for controlled activation and deactivation of *Drosophila* phototransduction *in vivo*. *PNAS USA*, **94**:12682–12687
- SIDI S, FRIEDRICH R W, AND NICOLSON T (2003). NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science*, **301**:96–99
- SINGER A U, WALDO G L, HARDEN T K, AND SONDEK J (2002). A unique fold of phospholipase C- β mediates dimerization and interaction with G α_q . *Nature Struct. Biol.*, **9**:32–36
- SINGER W D, BROWN H A, AND STERNWEIS P C (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**:475–509
- SINKINS W G, VACA L, HU Y, KUNZE D L, AND SCHILLING W P (1996). The COOH-terminal domain of *Drosophila* TRP channels confers thapsigargin sensitivity. *JBC*, **271**:2955–2960

- SKEER J M, NORMANN R I, AND SATTELLE D B (1995). Invertebrate voltage-dependent calcium channel subtypes. *Biol. Rev.*, **71**:137–154
- SMITH D P, RANGANATHAN R, MARX J, HARDY R W, TSUCHIDA T, AND ZUKER C S (1991). Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor-specific protein kinase C. *Science*, **254**:1478–1484
- SMITH E R, PANNUTI A, GU W, STEURNAGEL A, COOK R G, ALLIS C D, AND LUCCHESI J C (2000). The Drosophila MSL Complex Acetylates Histone H4 at Lysine 16, a Chromatin Modification linked to Dosage Compensation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**:312–318
- SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, MALLIA A K, GARTNER F H, PROVENZANO M D, FUJIMOTO E K, GOEKE N M, OLSON B J, AND KLENK D C (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**:76–85
- SONGYANG Z, FANNING A S, FU C, XU J, M M S, CHRISHTI A H, CROMPTON A, CHAN A C, ANDERSON J M, AND CANTLEY L C (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, **275**:73–77
- SWANSON K D AND GANGULY R (1992). Characterization of a Drosophila melanogaster gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor proteins. *Gene*, **113**:183–190
- SWATTON J E, MORRIS S A, WISSING F, AND TAYLOR C W (2001). Functional properties of Drosophila inositol trisphosphate receptors. *Biochem. J.*, **359**:435–441
- The QIAexpressionist (2002). The QIAexpressionist. Handbook 08/2002, Qiagen GmbH, Hilden
- TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (1998). TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems. Technical Bulletin No. 126 TB126, Promega Corporation, Madison, USA
- TOCHIO H, ZHANG Q, MANDAL P, LI M, AND ZHANG M (1999). Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat. Struct. Biol.*, **6**:417–421
- TSUNODA S, SIERRALTA J, SUN Y, BODNER R, SUZUKI E, BECKER A, SOCOLICH M, AND ZUKER C S (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature*, **388**:243–249
- TSUNODA S, SUN Y, SUZUKI E, AND ZUKER C S (2001). Independent Anchoring and Assembly Mechanisms of INAD Signaling Complexes in Drosophila Photoreceptors. *J. Neurosci.*, **21**:150–158

- TSUNODA S AND ZUKER C S (1999). The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium*, **26**:165–171
- UltraMobius™ Plasmid Preparation 1000 Kit (2000). UltraMobius™ Plasmid Preparation 1000 Kit00. TB 279 09/00, Novagen Inc., Bad Soden
- VACA L, SINKINS W G, HU Y, KUNZE D L, AND SCHILLING W P (1994). Activation of recombinant *trp* by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.*, **267**:C1501–1505
- VAN HUIZEN R, MILLER K, CHEN D M, LI Y, LAI Z C, RAAB R W, STARK W S, SHORTRIDGE R D, AND LI M (1998). Two distantly positioned PDZ domains mediate multivalent INAD-phospholipase C interactions essential for G protein-coupled signaling. *EMBO J.*, **17**:2285–2297
- VINOS J, DOMINGO A, MARCO R, AND CERVERA M (1991). Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin. *J. Mol. Biol.*, **220**:687–700
- WARR C G AND KELLY L E (1996). Identification and characterization of two distinct calmodulin-binding sites in the Trpl ion-channel protein of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, **314**:497–503
- WES P D, XU X Z, LI H S, CHIEN F, DOBERSTEIN S K, AND MONTELL C (1999). Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nat. Neurosci.*, **2**:447–453
- WONG F, SCHAEFER E L, ROOP B C, LAMENDOLA J N, JOHNSON-SEATON D, AND SHAO D (1989). Proper function of the *Drosophila* *trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron*, **3**:81–94
- XU X Z, BUTLER A, SALKOFF L, AND MONTELL C (2000). TRPgamma, a *Drosophila* TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron*, **26**:647–657
- XU X Z, CHOUDHURY A, LI X, AND MONTELL C (1998). Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J. Cell. Biol.*, **142**:545–555
- XU X Z, LI H S, GUGGINO W B, AND MONTELL C (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell*, **89**:1155–1164
- YAGODIN S, HOYLAND J, MASON W T, MIYAKE T, AND SATTELLE D (1998). Imaging of intracellular Ca^{2+} , pH and Cl^- transients in *Drosophila* cell lines. *Bioimages*, **5**:111–118
- YAGODIN S, PIVOVAROVA N B, ANDREWS S B, AND SATTELLE D B (1999). Functional characterization of thapsigargin and agonist-insensitive acidic Ca^{2+} stores in *Drosophila melanogaster* S2 cell lines. *Cell Calcium*, **25**:429–438

- ZIMMER S, TROST C, WISSENBACH U, PHILIPP S, FREICHEL M, FLOCKERZI V, AND CAVALIE A (2000). Modulation of recombinant transient-receptor-potential-like (TRPL) channels by cytosolic Ca^{2+} . *Pflugers Arch.*, **440**:409–417
- ZIMMERMANN P, MEERSCHAERT K, REEKMANS G, LEENAERTS I, SMALL J V, VAN-DEKERCKHOVE J, DAVID G, AND GETTEMANS J (2002). PIP₂-PDZ Domains Binding Controls the Association of Syntenin with the Plasma Membrane. *Mol. Cell*, **9**:1215–1225

6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Ac	Acetat
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
bp / kb	Basenpaare / Kilobasen
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaM	Calmodulin
CAM	Carbamidomethylgruppe
CBS	CaM-Bindungssequenzmotiv
CCE	<i>capacitative calcium entry</i> , kapazitativer Ca ²⁺ -Einstrom
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
Cv	<i>Calliphora vicina</i>
Cys-CAM, Cys-PAM	Carbamidomethylcystein, Cysteinyl-S-Propionamid
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DAG	Diacylglycerol
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxynukleotidtriphosphat, Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ePKC	augenspezifische (<i>eye-specific</i>) Proteinkinase C
ERG	Elektroretinogramm
EST	<i>expressed sequence tags</i>

Fa.	Firma
f.c.	<i>final concentration</i> , Endkonzentration
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKBP	FK506-bindendes Protein (FK506: Immunsuppressiv)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat
G-Protein	Guanosinnukleotidbindendes Protein
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Hexahistidin
IA	Iodacetamid
IC	Immuncytochemie
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> , immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
INAD	<i>inactivation no afterpotential D</i>
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
LSM	Laserscanningmikroskop bzw. Laserscanningmikroskopie
MALDI-TOFF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization time of flight</i> Analysator
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MSO	Methioninsulfoxid
NBT	Nitroblautetrazolium(chlorid)
Nk	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDZ	post synaptic density disc-large zo-1-Domäne
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
Pk	Positivkontrolle
PLC	Phospholipase C
PMA	β -Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUFA	<i>poly unsaturated fatty acids</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäuren
r	kennzeichnet rekombinant exprimierte Proteine
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RNA	Ribonukleinsäure
S2	Drosophila-Schneider2-Zellen
SDS, SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC, SOCE	<i>store-operated channel, store-operated calcium entry</i>
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRP, TRPL	<i>transient receptor potential, transient receptor potential-like</i>
TX-100	Triton X-100
UV	ultraviolettes Licht
vol.	Volumen
v/v, w/v	Volumen pro Volumen, Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WCR	<i>whole cell recordings</i>
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
z.B.	zum Beispiel

A Anhang

A.1 Antigen DmTRP3.1 und Antiserum α -DmTRP_{#088}

A.2 Charakterisierung erstellter Konstrukte zur induzierbaren Expression in S2

A.3 Klonale Selektion: Übersicht generierter Linien

A.4 Charakterisierung ausgewählter klonal selektierter S2-Linien

Immuncytochemischer Nachweis und Lokalisation der Expressionprodukte in e-A8

Verifizierung immuncytochemischer rDmTRP-Signale in Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC] Klon E4 durch S2-Zellen als interne Negativkontrolle

Charakterisierung der monoklonalen Referenzlinien S2-DmINAD-EGFP A1 und S2-DmPLC β -BA3 sowie rDmePKC-Expression in klonalen Linien

A.5 Differenzierung zwischen DmTRP und DmTRPL mit α -DmTRP_{#088}

A.6 Analyse von *D. melanogaster*-INAD-Sequenzen

A.7 Charakterisierung extrazellulärer WGA-Markierung von S2-DmTRPL-EGFP-Zellen

A.8 Rekombinante S2-Expression: Abhängigkeit von Wachstumszustand und Induktionsstärke

A.1 Antigen DmTRP3.1 und Antiserum α -DmTRP_{#088}

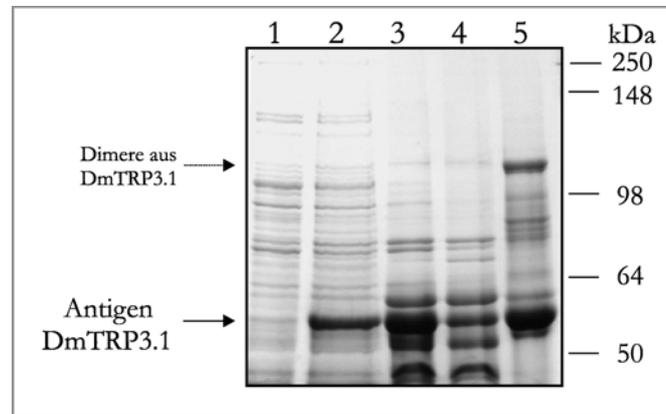


Abbildung A.1: Rekombinante Expression des Antigens DmTRP3.1 in *E. coli*

Die Proteine von Proben der rekombinanten Expression und Aufreinigung des Antigens DmTRP3.1 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-Färbung visualisiert. Das Gel wurde beladen mit: SDS Extrakt aus *E. coli* vor (Spur 1) und nach (2) IPTG-Induktion der Expression von DmTRP3.1, Harnstofflysate der DmTRP3.1-exprimierenden *E. coli* vor der Reinigung (3) und nach Bindung von DmTRP3.1 an die Nickel-Agarose (4) sowie das zur Immunisierung eingesetzte Antigen DmTRP3.1 nach der IMAC-Reinigung (5).

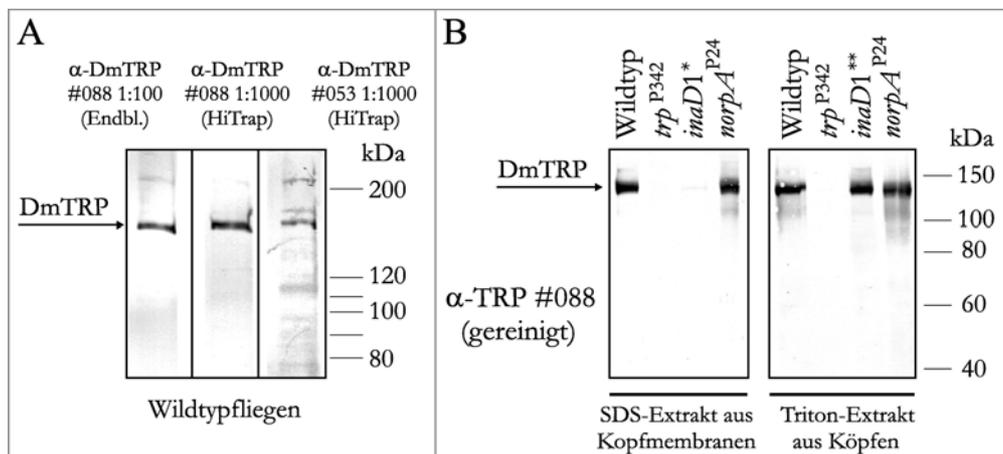


Abbildung A.2: Spezifität des Antiserums α -DmTRP_{#088} in Western Blot Analysen

Die Spezifität der DmTRP-Detektion durch α -DmTRP_{#088} (Serum und antigengereinigter Antikörper) in Extrakten von Wildtypfliegen wurde durch Western Blot Analysen sowohl im Vergleich zu antigengereinigtem α -DmTRP_{#053} (A) als auch unter Verwendung von *D. melanogaster*-Mutanten überprüft (B). In Abbildung A wurden pro Spur SDS-Extrakte aus 5 Köpfen von Wildtypfliegen (A35) aufgetragen (Endbl.: Serum der Endblutung; HiTrap: antigengereinigter Antikörper). B weist die Spezifität der Erkennung von DmTRP durch α -DmTRP_{#088} in Wildtypfliegen (A35), TRP-Nullmutanten (*trp*³⁴²), INAD-Nullmutanten (*inaD1*, *: Alter 6–7 Tage, **: Alter 1–2 Tage) und PLC β -Nullmutanten (*P*²⁴) nach.

A.2 Charakterisierung erstellter Konstrukte zur induzierbaren Expression in S2

- EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)

Mit einer Variante des aus *Aequoria victoria* stammenden *Green Fluorescent Protein* erfolgte die Generierung des Konstruktes pMT/EGFP durch EcoRI/NotI-Klonierung von EGFP aus pEGFP-1 (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg; Referenz: Living Colors® User Manual) in pMT/V5-HisA. Das entstandene Konstrukt hat eine Größe von 4,3 kb mit einem erwarteten Expressionsprodukt von ca. 25 kDa. PMT/EGFP diente als Kontrolle für verschiedene Aspekte der induzierbaren rekombinanten Expression in S2-Zellen. Dazu zählt zum einen die schnelle Überprüfung der Transfektions- und Expressionseffizienz. Das hergestellte EGFP-Konstrukt wurde darüber hinaus zur Optimierung der Zellkulturhaltung, Transfektion und der Expressionsbedingungen genutzt.

- *D. melanogaster*-TRP

Der lichtabhängige Ionenkanal TRP von *Drosophila melanogaster* (DmTRP) wurde aus pcDNA3-DmTRP KpnI/NotI (Schnittstellen des Vektors) in pMT/V5-HisA überführt. Das entstandene Konstrukt pMT/DmTRP hat eine Größe von 7,7 kb und kodiert für ein Protein mit einem erwarteten Molekulargewicht von 142,6 kDa.

- *D. melanogaster*-ePKC

Die kodierende Sequenz für die augenspezifische Proteinkinase C (DmePKC) wurde SpeI/ApaI aus dem Ausgangsvektor pBSC in pMT/V5-HisA eingebracht. Die Konstruktgröße von pMT/DmePKC beträgt 5,9 kb mit einem erwarteten 79,8 kDa-Expressionsprodukt (keine fusionierten Sequenzen).

- *D. melanogaster*-INAD

Für die rekombinante Expression des Gerüstproteins INAD von *D. melanogaster* erfolgte die Erstellung eines Fusionskonstruktes, wobei im Expressionsprodukt INAD N-terminal an EGFP fusioniert ist. Das Konstrukt pMT/DmINAD-EGFP entstand in mehreren Teilschritten. Ein EcoRI/PstI-Fragment der INAD-kodierenden Sequenz aus dem Konstrukt inaDN2 (siehe Abbildung 4.4) wurde in pEGFP-1 überführt. Eine PCR-Amplifikation der C-terminalen Sequenz von INAD mit dem Primerpaar FU1/FU2 wandelte das Stop-Codon in eine Kodierung für Threonin (T) um und stellte gleichzeitig einen einheitlichen Leserahmen mit EGFP her. Dieses PCR-Fragment wurde PstI/KpnI in das INAD-pEGFP-1-Zwischenkonstrukt überführt und somit die INAD-Kodierung komplettiert sowie der durchgehende ORF für INAD-EGFP hergestellt. Das vollständige INAD-EGFP-Fusionskonstrukt wurde aus dem pEGFP-1-Vektor EcoRI/NotI in pMT/V5-HisA überführt (Abbildung A.3). Das Konstrukt pMT/DmINAD-EGFP weist eine Größe von 6,3 kb auf. Erwartet wird ein Expressionprodukt mit einem Molekulargewicht von 99,3 kDa.

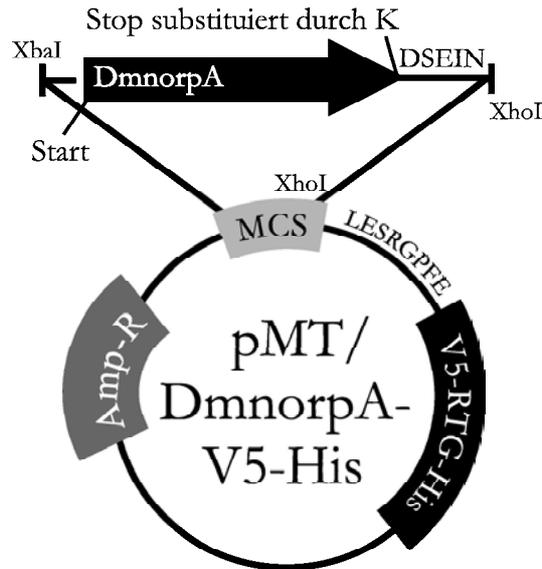


Abbildung A.4: Schematische Darstellung von pMT/DmnrpA-V5-His
MCS: *multiple cloning site*, Amp-R: Ampicillinresistenz-Kodierung

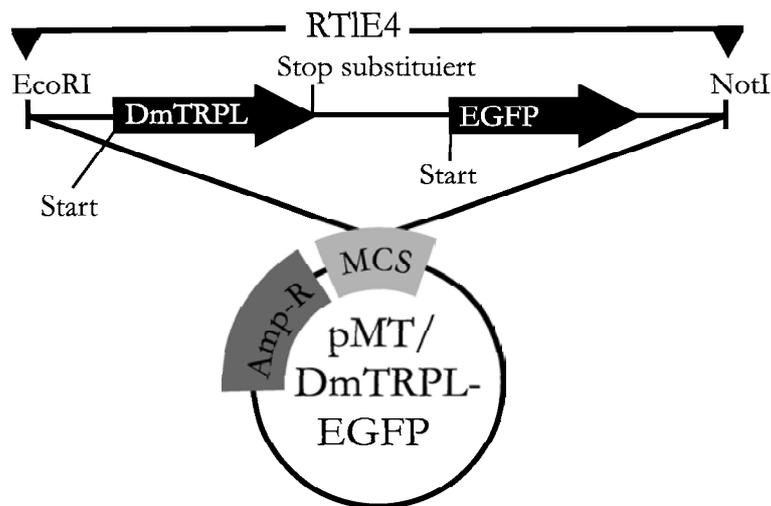


Abbildung A.5: Schematische Darstellung von pMT/DmTRPL-EGFP
MCS: *multiple cloning site*, Amp-R: Ampicillinresistenz-Kodierung

eine C-terminale Fusion von HcRed (aus pHcRed1, Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg) an die CDS von DmTRPL mit modifiziertem Stop-Codon dar. Das Fusionskonstrukt DmTRPL-HcRed in einem Entry-Vektor (pENTRTM) des Gateway[®] Systems, ebenfalls ein laboreigenes Konstrukt (pENTRTMA1-TRPL_K-HcRed), sowie der Destination-Vektor pMT-DEST48 wurden als Ausgangsvektoren der Rekombinationsreaktion eingesetzt. Mit Ausnahme der Modifizierungen für die Verwendung als Destination-Vektor entspricht pMT-DEST48 dem S2-Expressionsvektor pMT/V5-HisA. Das Konstrukt pMT-DEST/DmTRPL-HcRed besitzt eine Größe von ca. 7,7 kb.

A.3 Klonale Selektion: Übersicht generierter Linien

POLYKLONALE S2-AUSGANGSLINIE	ANSÄTZE	SELEKTIONSVERLAUF	ETABLIERTE LINIEN	KLONALITÄTSBEWERTUNG
INAD-Komplex (Komp[INAD;TRP;PLC;ePKC])	96	18 INAD-EGFP+ 9 expandierbar: 3 mit ausgeglichener Expression aller Komponenten 6 mit schwacher/fehlender Expression von Komponenten	A8, E4 (C1)	A8 und E4 INAD-EGFP-mono C1 mindestens biklonal (INAD-EGFP-Rate ≤ 50 %)
INAD-Komplex—ePKC (Komp[INAD;TRP;PLC])	96	10 INAD-EGFP+ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 3 nicht mono	2-D12, 2-C10 (2-E4, 2-D8: nicht umfassend charakterisiert)	2-D12 und 2-C10: mono INAD-EGFP
S2-DmINAD-EGFP	24	Test 6 Linien: 2 mit Nachweis aller Komponenten, eine unausgeglichenes Niveau: TRP 2 mit schwacher/fehlender Expression 2 nicht umfassend charakterisiert 13 INAD-EGFP+ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 3 nicht mono	I+E A1, I+E B1, (I+E B3, I+E A12)	I+E A1, I+E B1 INAD-EGFP-mono I+E B3, I+E A12 (nicht INAD-EGFP mono)
S2-DmTRPL-EGFP	24	9 INAD-EGFP+ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 3 nicht mono	TL-E A3, TL-E B4 (TL-E A9) (TL-E B5: keine Endcharakterisierung)	TL-E B4, TL-E A3 TRPL-EGFP-mono TL-E A9 nicht mono
S2-DmTRP	24	2 initial getestet TRP+	beide tot	—
S2-DmTRP Linie n Selektion 1	24	9 initial getestet TRP+, Expansionsbeginn 6 Weiterzucht 3 überlebende Linien WB-Verifizierung mehrfach erfolglos	(Tn B10, Tn B11, Tn B12: WB-Analyse mehrfach erfolglos)	—
S2-DmTRP Linie n Selektion 2	96	partielle Expansion überlebende Linien: alle 4 Weiterzucht, initial getestet TRP+ WB-Verifizierung mehrfach erfolglos 3 IC-Test negativ 1 IC-Test vereinzelt positiv	(TRP H4, TRP H8, TRP D4, TRP F10: WB-Analysen mehrfach erfolglos; IC-Analyse: in H4, H8, D4 keine TRP-Detektion, F10 nicht mono für TRP) alle tot	TRP F10: vereinzelt TRP-IC-Detektion
S2-DmePKC	24	IC-Vorauswahl erfolglos: 10 Anzucht (zufällig gewählt) 6 Expansion	alle tot	—
S2-DmePKC Linie A	48	10 initial getestet ePKC- sowie 12 Zufallsauswahl: Anzucht 2 positiv in WB-Analyse, verschiedene Intensität	A-A3, A-C12 (B-A3, B-A4, B-B1, B-C4, B-A1)	Mono
S2-DmPLC-V5-His	24	10 initial getestet PLCβ-V5+ 6 Expansion	alle tot	—

POLYKLONALE AUSGANGSLINIE	ANSÄTZE	SELEKTIONSVERLAUF	ETABLIERTE LINIEN	KLONALITÄTSBEWERTUNG
S2-DmPLC-V5-His Linie A	48	10 initial getesteter PLCβ-V5 ⁺ sowie 12 Zufallsauswahl: Anzucht 2 WB-positiv (mehrfach)	B-A3, A-C7 (B-C4)	B-A3 PLCβ-monoklonal (IC-check α-V5) A-C7: nicht monoklonal
S2-ds (TRPL-EGFP, INAD-EGFP, TRP) Selektion 1	96	1 EGFP ⁺	ds A10	ds A10 nicht monoklonal
S2-ds (TRPL-EGFP, INAD-EGFP, TRP) Selektion 2	96	0 EGFP ⁺	_____	_____
S2-ds (TRPL-EGFP, INAD-EGFP, TRP) Selektion 3	96	8 EGFP ⁺ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 6 nicht monoklonal 2 positiv für alle Komponenten	d-E10, d-B8 (d-A6, d-A11, d-E4, d-A7, d-B12, d-H9)	d-E10, d-B8 EGFP-monoklonal (TRPL und INAD: IC-Nachweis, IC-Monoklonalitätsnachweis unmöglich)
INAD-Komplex—DmTRP (Komp[INAD;ePKC;PLC])	96	6 INAD-EGFP ⁺ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 5 expandiert 1 Nachweis aller Komponenten	b-E12 (b-H2, b-H4, b-B6,)	b-E12: INAD-EGFP-monoklonal
INAD-Komplex—DmINAD-EGFP (Komp[ePKC;TRP;PLC])	96	Anzucht überlebender Linien: 12 Zufallsauswahl und 20 initial ePKC-positiv (IC-Screen) 1 positiv für alle Komponenten 1 TRP- und PLCβ-positiv	cA-H12 (cI-C1)	cA-H12: monoklonal für PLCβ-V5-His, TRP und ePKC cI-C1: TRP-monoklonal, vereinzelt PLCβ-V5-Expression
INAD-Komplex—DmPLCβ (Komp[INAD;TRP;ePKC])	96	3 INAD-EGFP ⁺ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 1 schwache Fluoreszenzsignale 1 alle Komponenten, ausgeglichene Expression 1 alle Komponenten, eine Komponente (ePKC) schwach	a-H5, a-H7 (a-A1)	a-H5, a-H7: INAD-EGFP-monoklonal
S2-eA (TRPL-EGFP, TRP)	96	3 INAD-EGFP ⁺ EGFP-Fluoreszenzrate verschieden: 1 nicht monoklonal 1 alle Komponenten, ausgeglichene Expression 1 alle Komponenten, schwache Komponenten	e-H2, e-A8	e-H2, e-A8: TRPL-EGFP-monoklonal

EGFP-Fluoreszenzrate: Anteil EGFP-fluoreszierender Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl

A.4 Charakterisierung ausgewählter klonal selektierter S2-Linien

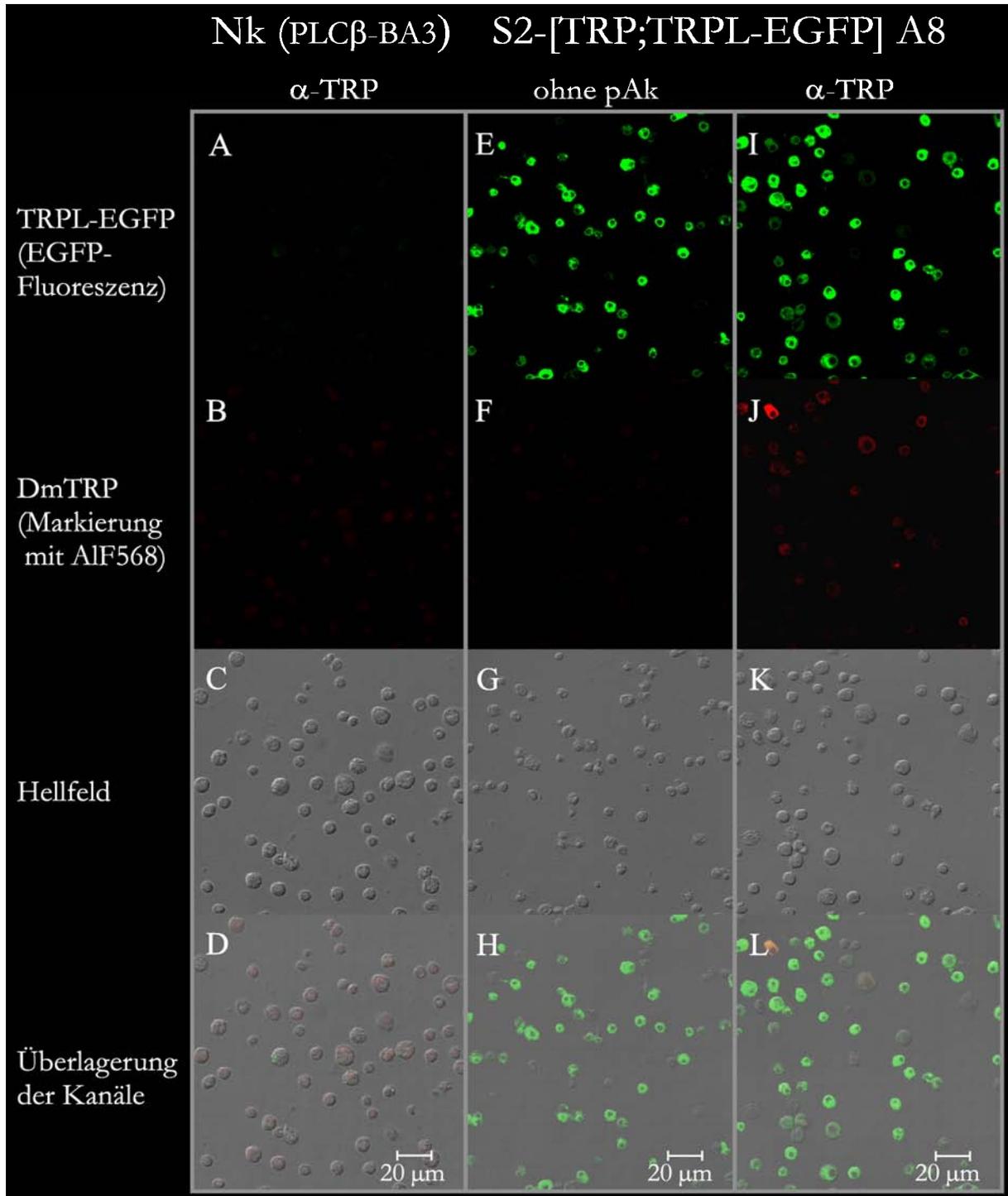


Abbildung A.6: Charakterisierung der rekombinanten Expressionsprodukte der Linie e-A8 (S2-[TRP;TRPL-EGFP])

Nk: Negativkontrolle, pAk: primärer Antikörper

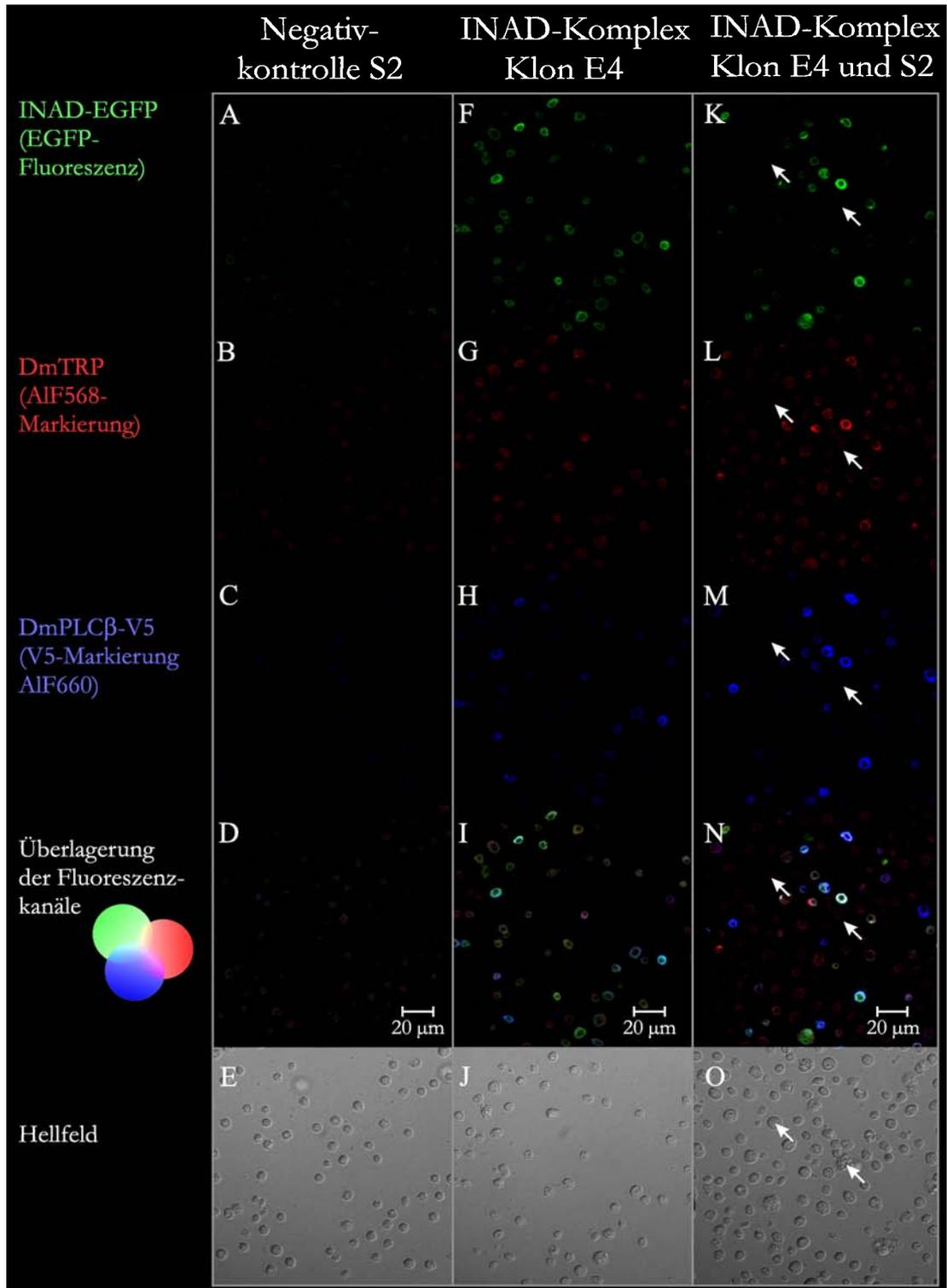


Abbildung A.7: Verifizierung rekombinanter Expressionsprodukte in INAD-Komplex E4: Immuncytochemische Detektion von rDmTRP und rDmPLC β -V5

Durch Konfokalmikroskopie dokumentieren A–E S2-Zellen (inkubiert mit sekundären Antikörpern) als negative Kontrolle. Die Detektionsschwellenparameter der Negativkontrolle sind Basis immuncytochemischer Analysen der rekombinanten Expression in Klon E4 (F–J). Verifiziert werden Signale durch zugemischte S2-Zellen als probeninterne Negativkontrollen der Dokumentation (K–O). Probeninterne Negativkontrollen erhöhen die Sensitivität der Dokumentation (Feineinstellung der Detektionsschwellenparameter möglich) während sie Hintergrundsignale, verursacht durch primäre Antikörper, überprüfen. Die Pfeile zeigen unmarkierte S2-Zellen.

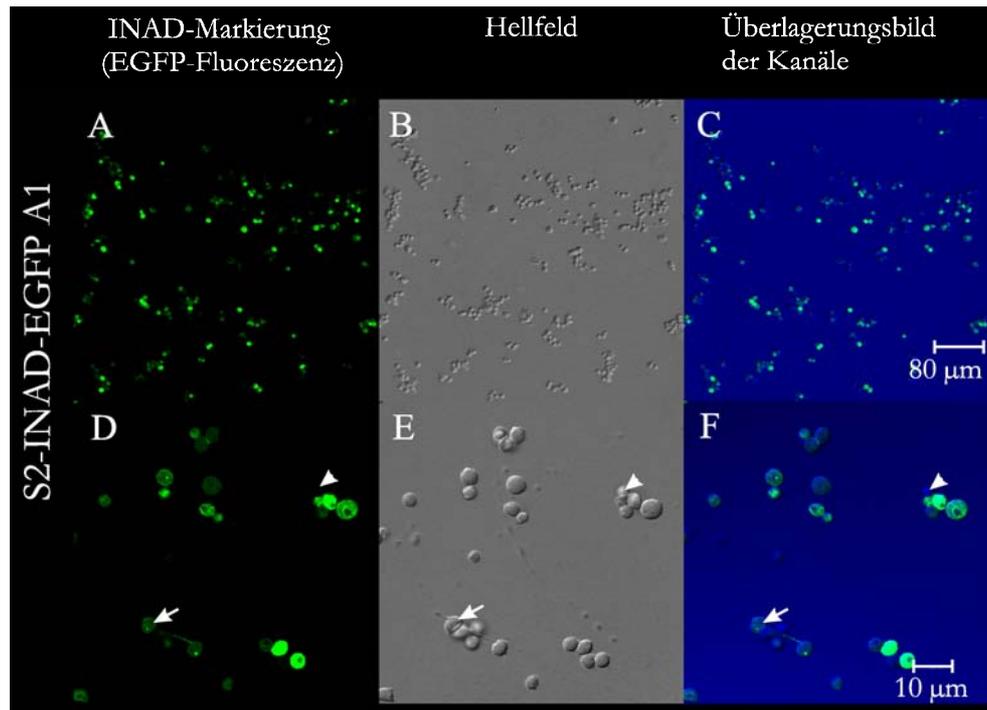


Abbildung A.8: Monoklonalität der S2-Linie INAD-EGFP A1

Zellen mit geringerer Expressivität von rDmINAD-EGFP sind durch einen Pfeil markiert. Die Pfeilspitze kennzeichnet Zellen ohne EGFP-Fluoreszenz, die ausserhalb der Fokusebene der Dokumentation liegen.

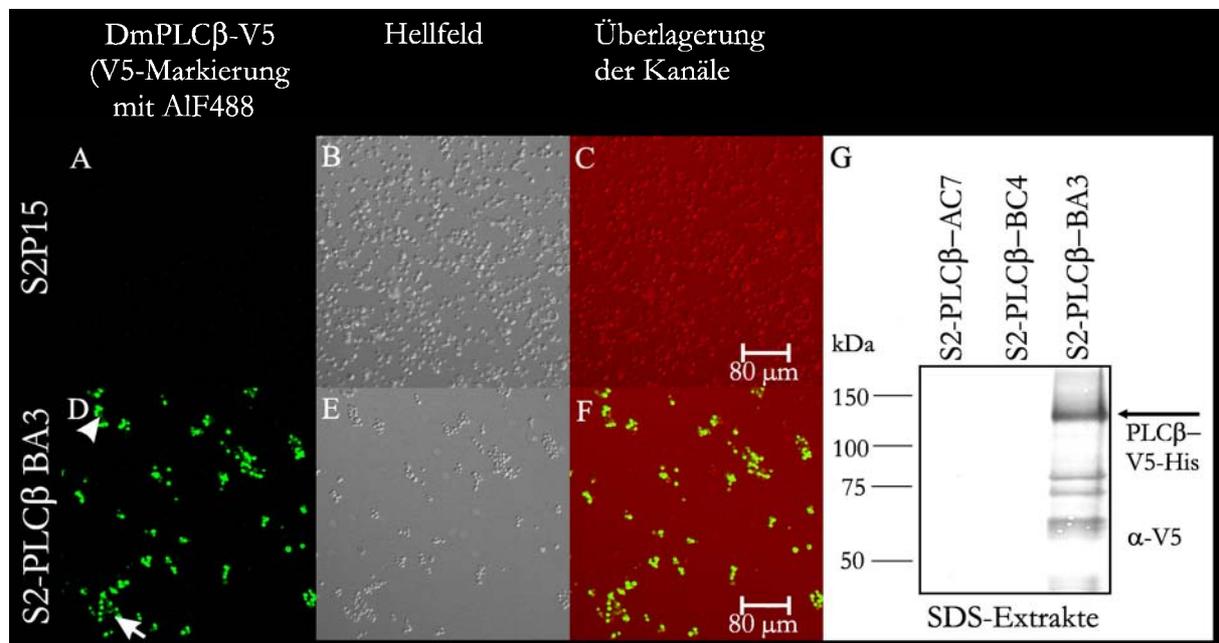


Abbildung A.9: PLC β -BA3: S2-Linie mit monoklonaler PLC β -V5-His-Expression

Die Pfeile kennzeichnen Zellen mit starker rDmPLC β -V5-His-Expression. Die Pfeilspitze markiert schwächere rekombinante Expression.

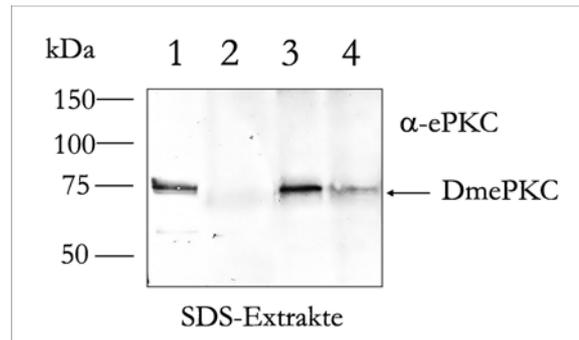


Abbildung A.10: Biochemische Dokumentation (Western Blot Analysen) der rDmePKC-Expression klonaler DmePKC-Linien

Die Spuren dokumentieren den DmePKC-Nachweis in SDS-Extrakten der Proben 1: Positivkontrolle Fliegenköpfe, 2: S2-ePKC Klon BA1, 3: S2-ePKC Klon AA3 sowie 4: S2-ePKC Klon AC12.

A.5 Differenzierung zwischen DmTRP und DmTRPL mit α -DmTRP_{#088}

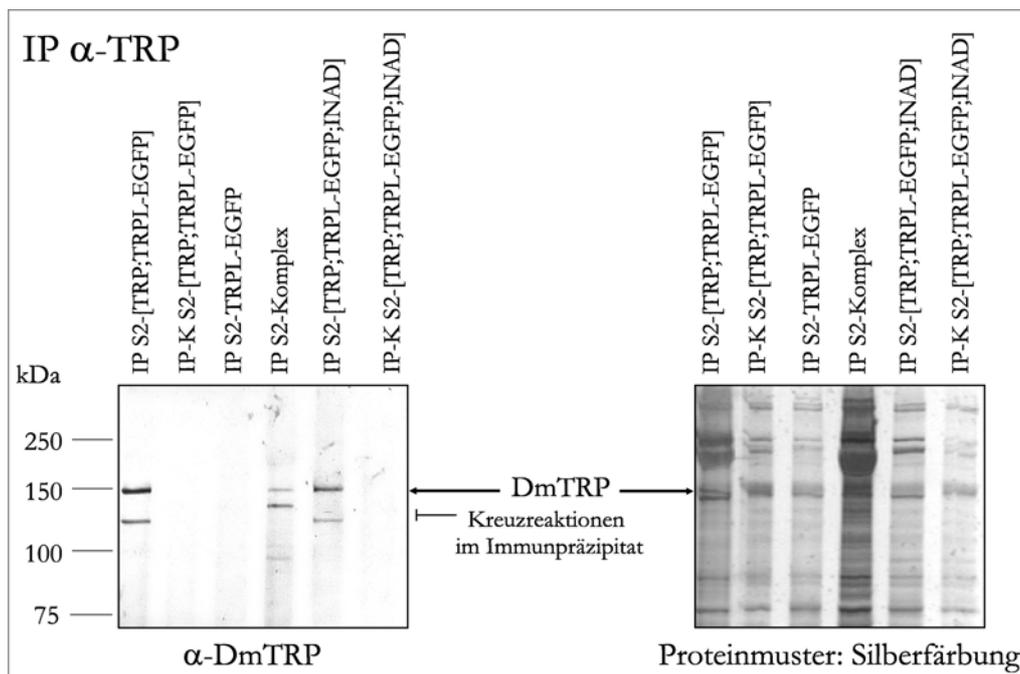


Abbildung A.11: Die Differenzierung zwischen rDmTRP und rDmTRPL-EGFP ist mit α -DmTRP_{#088} spezifisch möglich: in S2-DmTRPL-EGFP ist kein Präzipitationsprodukt detektierbar.

Negativkontrollen der Immunpräzipitation (IP) sind Ansätze ohne Präzipitationsantikörper (IP-K). Positivkontrolle für die TRP-Erkennung ist die Präzipitation aus der Linie INAD-Komplex, die TRPL in keiner Form exprimiert.

A.6 Analyse von *D. melanogaster*-INAD-Sequenzen

Alignment INAD Aminosäuresequenz:

N: Sequenz aus dem NCBI Annotation Project (NCBI Accession: XM080984, mRNA)
 S: Sequenz publiziert von Shieh und Niemeyer, Neuron 14 (1), 201-210 (1995),
 NCBI Accession: U15803
 V: Sequenz aus der Celera-Sequenzierung des Drosophila-Genoms
 (NCBI Accession: AE003458, mRNA Flybase-Annotation: CG3504)

	1	11	21	31	41	51	61	71
INAD-P-N	MVQFLGKQGTAGELIHMVTLDKTGKKSFGICIVRGEVKDPSNTKTTGFIKGI	VPDSPAHL	CGRLKVGDRILSLNGKDVR					
INAD-P-V	MVQFLGKQGTAGELIHMVTLDKTGKKSFGICIVRGEVKDPSNTKTTGFIKGI	VPDSPAHL	CGRLKVGDRILSLNGKDVR					
INAD-P-S	MVQFLGKQGTAGELIHMVTLDKTGKKSFGICIVRGEVKDPSNTKTTGFIKGI	VPDSPAHL	CGRLKVGDRILSLNGKDVR					
Consensus	mvqflgkqgtagelihmvtldktgkksfgicivrgevkdspntkttgifikg	ivpds	pahlcgrlkgvdrilslngkdvr					
	81	91	101	111	121	131	141	151
INAD-P-N	NSTEQAVIDLKIEADFKIELEIQTFDKSDEQQA	KSDPR	SNGYMQAKN	KNFQEQ	TTNN	NASGGQ	GMGQ	GGQGGQGMAGMNR
INAD-P-V	NSTEQAVIDLKIEADFKIELEIQTFDKSDEQQA	KSDPR	SNGYMQAKN	KNFQEQ	TTNN	NASGGQ	GMGQ	GGQGGQGMAGMNR
INAD-P-S	NSTEQAVIDLKIEADFKIELEIQTFDKSDEQQA	KSDPR	SNGYMQAKN	KNFQEQ	TTNN	NASGGQ	GMGQ	GGQGGQGMAGMNR
Consensus	nsteqavidlikeadfkieleiqtfdkseqqaksdprsnngymqaknkfnqe	q	ttnnnasggqgm	gqggqggqgmagmnr				
	161	171	181	191	201	211	221	231
INAD-P-N	QQSMQKRNTTFTASMRQKHSNYADEDED	TRDM	TGRIRTEAGYE	IDRAS	AGNCKLNKQEK	DRDKEQE	DEF	FGYTMAKINKR
INAD-P-V	QQSMQKRNTTFTASMRQKHSNYADEDED	TRDM	TGRIRTEAGYE	IDRAS	AGNCKLNKQEK	DRDKEQE	DEF	FGYTMAKINKR
INAD-P-S	QQSMQKRNTTFTASMRQKHSNYADEDED	TRDM	TGRIRTEAGYE	IDRAS	AGNCKLNKQEK	DRDKEQE	DEF	FGYTMAKINKR
Consensus	qqsmqkrnttftasmrqkhsnyadeddedtrdmtgrirteagyeidrasagncklnkqekdrdkeqede	fgytmakinkr						
	241	251	261	271	281	291	301	311
INAD-P-N	YNNMKDLRRIEVQRDASKPLGLALAGHKDRQKMACFVAGVDP	NGALGSVDIK	PGDEIVEV	NGNVLK	NRCHLN	ASAVF	KNV	
INAD-P-V	YNNMKDLRRIEVQRDASKPLGLALAGHKDRQKMACFVAGVDP	NGALGSVDIK	PGDEIVEV	NGNVLK	NRCHLN	ASAVF	KNV	
INAD-P-S	YNNMKDLRRIEVQRDASKPLGLALAGHKDRQKMACFVAGVDP	NGALGSVDIK	PGDEIVEV	NGNVLK	NRCHLN	ASAVF	KNV	
Consensus	ynnmkdlrrievqrdaskplglalaghkdrqkmacfvagvdpngalgsvdi	kpgdeivevngnvlknrchlnasavfknv						
	321	331	341	351	361	371	381	391
INAD-P-N	DGDKLVMITSRRKPNDEGMCVKPIKKFPTASDETKFIFDQ	FPPKARTVQ	VRKEGFLG	IMVIYGK	HAEVGSG	IFISDL	REGS	
INAD-P-V	DGDKLVMITSRRKPNDEGMCVKPIKKFPTASDETKFIFDQ	FPPKARTVQ	VRKEGFLG	IMVIYGK	HAEVGSG	IFISDL	REGS	
INAD-P-S	DGDKLVMITSRRKPNDEGMCVKPIKKFPTASDETKFIFDQ	FPPKARTVQ	VRKEGFLG	IMVIYGK	HAEVGSG	IFISDL	REGS	
Consensus	dgdklvmitsrrkpndegmcvkpikkfptasdetkfidqfppkartvqvrkegflgimviygkhaevgsgifisdlregs							
	401	411	421	431	441	451	461	471
INAD-P-N	NAELAGVKVGDMLLAVNQDVTLESNYDDATGLLKRAEGVVTMILL	TLKSEEAIKAEKAAE	KKKEEAKKEE	KKPQEP	PATA			
INAD-P-V	NAELAGVKVGDMLLAVNQDVTLESNYDDATGLLKRAEGVVTMILL	TLKSEEAIKAEKAAE	KKKEEAKKEE	KKPQEP	PATA			
INAD-P-S	NAELAGVKVGDMLLAVNQDVTLESNYDDATGLLKRAEGVVTMILL	TLKSEEAIKAEKAAE	KKKEEAKKEE	KKPQEP	PATA			
Consensus	naelagkvvgdmlLavnqdvTlesnyddatgllkraegvvtmilltlkseeaikaekaaeekkkeeakkeekpqepata							
	481	491	501	511	521	531	541	551
INAD-P-N	EIKPNKKILIELKVEKKPMGVI	CGGKNNHVT	TGCVITHVY	PEGQVAAD	KRLKIFD	HICDINGT	PIHVGS	MTLKVHQLF
INAD-P-V	EIKPNKKILIELKVEKKPMGVI	CGGKNNHVT	TGCVITHVY	PEGQVAAD	KRLKIFD	HICDINGT	PIHVGS	MTLKVHQLF
INAD-P-S	EIKPNKKILIELKVEKKPMGVI	CGGKNNHVT	TGCVITHVY	PEGQVAAD	KRLKIFD	HICDINGT	PIHVGS	MTLKVHQLF
Consensus	eikpnkkilielkvekkpmgvi	cggknnhvttgcvithvypegqvaadkrlkifdhicdingtpihvgsmttlkvhqlf						
	561	571	581	591	601	611	621	631
INAD-P-N	HTTYEKAVTLTVFRADPPELEKFNVDLMKKAGKELGLSL	SPNEIGCTIADLI	QGQYPEIDSKL	QRGDIIT	KFN	GDAL	LEGL	
INAD-P-V	HTTYEKAVTLTVFRADPPELEKFNVDLMKKAGKELGLSL	SPNEIGCTIADLI	QGQYPEIDSKL	QRGDIIT	KFN	GDAL	LEGL	
INAD-P-S	HTTYEKAVTLTVFRADPPELEKFNVDLMKKAGKELGLSL	SPNEIGCTIADLI	QGQYPEIDSKL	QRGDIIT	KFN	GDAL	LEGL	
Consensus	httyekavtltvfradppeleknvdlmkkagkelgslspneigctiadliqqgypeidsklqrgdiitkfnngdalegl							
	641	651	661	671	681	691	701	711
INAD-P-N	PFQVCYALFKGANGKVSMEVTRPKPTLRTEAPKA							
INAD-P-V	PFQVCYALFKGANGKVSMEVTRPKPTLRTEAPKA							
INAD-P-S	PFQVCYALFKGANGKVSMEVTRPKPTLRTEAPKA							
Consensus	pfqvcyalfkgangkvsmevtrpkptlrteapka							

Abbildung A.12: Alignment von publizierten INAD-Sequenzen: Proteinprimärstruktur

Alignment INAD DNA-Sequenz:

N: Sequenz aus dem NCBI Annotation Project (NCBI Accession: XM080984, mRNA)
 S: Sequenz publiziert von Shieh und Niemeyer, Neuron 14 (1), 201-210 (1995),
 NCBI Accession: U15803
 V: Sequenz aus der Celera-Sequenzierung des Drosophila-Genoms
 (NCBI Accession: AE003458, mRNA Flybase-Annotation: CG3504)

	1	11	21	31	41	51	61	71
INAD-N	----GCACTTTTCAATGGACTCAAATCGGGCGCAGCCAACGCGGAATATTCACAAATAATAATTAAGTGAAAACCCATAA							
INAD-V	AGGCGCACTTTCAATGGACTCAAATCGGGCGCAGCCAACGCGGAATATTCACAAATAATAATTAAGTGAAAACCCATAA							
INAD-S	AGGCGCACTTTCAATGGACTCAAATCGGGCGCAGCCAACGCGGAATATTCACAAATAATAATTAAGTGAAAACCCATAA							
Consensus	aggcgcacttttcaatggactcaaatcgggcgagccaacgcggaatattcacaataataaattaagtgaaccataa							
	81	91	101	111	121	131	141	151
INAD-N	CAATAAATATTCGATATTACATTTGAGCTTAATTC-GGTGCGCTTAATGTCCGGTCAGTGAGTCGCGAGTTTTTGGCTAG							
INAD-V	CAATAAATATTCGATATTACATTTGAGCTTAATTC-GGTGCGCTTAATGTCCGGTCAGTGAGTCGCGAGTTTTTGGCTAG							
INAD-S	CAATAAATATTCGATAATACATTTGAGCTTAATTCGGTGCCTTAATGTCCGGTCAGTGAGTCGCGAGTTTTTGGCTAG							
Consensus	caataaatattcgata tacatthgagcttaattc ggtgcgcttaatgtccggtcagtgagtcgagttttggctag							
	161	171	181	191	201	211	221	231
INAD-N	GATTACGGAGCAGTCGATCTCAAGCAGCGAGGATGGTTTCAGTTCTCTGGGCAAACAGGGCACCGCGGGTGAGTCTATTCAC							
INAD-V	GATTACGGAGCAGTCGATCTCAAGCAGCGAGGATGGTTTCAGTTCTCTGGGCAAACAGGGCACCGCGGGTGAGTCTATTCAC							
INAD-S	GATTACGGAGCAGTCGATCTCAAGCAGCGAGGATGGTTTCAGTTCTCTGGGCAAACAGGGCACCGCGGGTGAGTCTATTCAC							
Consensus	gattacggagcagtcgatctcaagcagcgaggatggtttcagttctctgggcaaacagggcacccgcggtgagctcattcac							
	241	251	261	271	281	291	301	311
INAD-N	ATGGTGACCTGGACAAGACGGGCAAGAAGTCTTCGGCATCTGCATAGTGC GCGCGAGGTGAAGGATTCGCCAACAC							
INAD-V	ATGGTGACCTGGACAAGACGGGCAAGAAGTCTTCGGCATCTGCATAGTGC GCGCGAGGTGAAGGATTCGCCAACAC							
INAD-S	ATGGTGACCTGGACAAGACGGGCAAGAAGTCTTCGGCATCTGCATAGTGC GCGCGAGGTGAAGGATTCGCCAACAC							
Consensus	atggtgacctggacaagacgggcaagaagtcttcggcatctgcatagtgcgcgaggtgaaggattcgcccaaac							
	321	331	341	351	361	371	381	391
INAD-N	CAAGACCACCGGCATCTTCATCAAGGGCATTGTGCCGACAGTCCC GCGCATCTGTGTGGTTCGCCTAAAGGTTGGCGATC							
INAD-V	CAAGACCACCGGCATCTTCATCAAGGGCATTGTGCCGACAGTCCC GCGCATCTGTGTGGTTCGCCTAAAGGTTGGCGATC							
INAD-S	CAAGACAACCGGCATCTTCATCAAGGGCATTGTGCCGACAGTCCC GCGCATCTGTGTGGTTCGCCTAAAGGTTGGCGATC							
Consensus	caagac accgcatcttcatcaaggcattgtgcccagcagtcgcatctgtgtggtcgccctaaaggttggcgatc							
	401	411	421	431	441	451	461	471
INAD-N	GGATCCTCTCGCTCAACGGAAAGGATGTGCGCAACTCCACCGAACAGGCGGTCATCGATCTCATCAAGGAGGCGGACTTC							
INAD-V	GGATCCTCTCGCTCAACGGAAAGGATGTGCGCAACTCCACCGAACAGGCGGTCATCGATCTCATCAAGGAGGCGGACTTC							
INAD-S	GGATCCTCTCGCTCAACGGAAAGGATGTGCGCAACTCCACCGAACAGGCGGTCATCGATCTCATCAAGGAGGCGGACTTC							
Consensus	ggatcctctcgctcaacggaaaggatgtgcgcaactccaccgaacagggcggtcatcgatctcatcaaggaggcggaattc							
	481	491	501	511	521	531	541	551
INAD-N	AAGATCGAAGCTGGAGATTCAGACCTTCGACAAGAGCGATGAGCAGCAGGCCAAGTCAGATCCGCGGAGCAATGGCTACAT							
INAD-V	AAGATCGAAGCTGGAGATTCAGACCTTCGACAAGAGCGATGAGCAGCAGGCCAAGTCAGATCCGCGGAGCAATGGCTACAT							
INAD-S	AAGATCGAGCTGGAGATTCAGACCTTCGACAAGAGCGATGAGCAGCAGGCCAAGTCAGATCCGCGGAGCAATGGCTACAT							
Consensus	aagatcga agctggagattcagaccttcgacaagagcgatgagcagcagggccaagtcagatccgcgagcaatggctacat							
	561	571	581	591	601	611	621	631
INAD-N	GCAGGCCAAGAACAAGTTCAAC CAGGAGCAGACCACCAACAACAATGCGTCCGGAGGTCAGGGAATGGGGCAAGGTCAGG							
INAD-V	GCAGGCCAAGAACAAGTTCAAC CAGGAGCAGACCACCAACAACAATGCGTCCGGAGGTCAGGGAATGGGGCAAGGTCAGG							
INAD-S	GCAGGCCAAGAACAAGTTCAAC CAGGAGCAGACCACCAACAACAATGCGTCCGGAGGTCAGGGAATGGGGCAAGGTCAGG							
Consensus	gcaggccaagaacaagttcaa caggagcagaccaccaacaacaatgcgctccggaggtcagggaaatggggcaaggtcagg							
	641	651	661	671	681	691	701	711
INAD-N	GTCAGGGTCAGGGAATGGCTGGCATGAACCGGCAGCAATCGATGCAGAAGCGGAATACCACATTCACGGCTCGATGCGT							
INAD-V	GTCAGGGTCAGGGAATGGCTGGCATGAACCGGCAGCAATCGATGCAGAAGCGGAATACCACATTCACGGCTCGATGCGT							
INAD-S	GTCAGGGTCAGGGAATGGCTGGCATGAACCGGCAGCAATCGATGCAGAAGCGGAATACCACATTCACGGCTCGATGCGT							
Consensus	gtcagggtcagggaaatggctggcatgaaccggcagcaatcgatgcagaagcggaataccacattcacggctcgatgcggt							
	721	731	741	751	761	771	781	791
INAD-N	CAGAAGCATAGTAAC TACGCCGACGAGGATGACGAGGACACCCGGGACATGACCGGTCGCATTTCGCACGGAGGCGGGTTA							
INAD-V	CAGAAGCATAGTAAC TACGCCGACGAGGATGACGAGGACACCCGGGACATGACCGGTCGCATTTCGCACGGAGGCGGGTTA							
INAD-S	CAGAAGCATAGTAAC TACGCCGACGAGGATGACGAGGACACCCGGGACATGACCGGTCGCATTTCGCACGGAGGCGGGTTA							
Consensus	cagaagcatagtaactacgccgacgaggtgacgaggacacccgggacatgaccggtcgcatttcgcacggaggcgggtta							
	801	811	821	831	841	851	861	871
INAD-N	TGAGATCGATCGAGCTCCGCCGGTAATTGCAAAC TCAAGCAGGAAAAGGATCGCGACAAGGAGCAGGAAGATGAAT							
INAD-V	TGAGATCGATCGAGCTCCGCCGGTAATTGCAAAC TCAAGCAGGAAAAGGATCGCGACAAGGAGCAGGAAGATGAAT							
INAD-S	TGAGATCGATCGAGCTCCGCCGGTAATTGCAAAC TCAAGCAGGAAAAGGATCGCGACAAGGAGCAGGAAGATGAAT							
Consensus	tgagatcgatcgagctccgccggtaattgcaaactcaagcaggaaaaggatcgcgacaaggagcaggaagatgaat							

	881	891	901	911	921	931	941	951
INAD-N	TTGGCTACACGATGGCTAAGATCAACAAGCGGTACAACATGATGAAGGATCTGCGCAGGATCGAGGTCCAGAGGGACGCC							
INAD-V	TTGGCTACACGATGGCTAAGATCAACAAGCGGTACAACATGATGAAGGATCTGCGCAGGATCGAGGTCCAGAGGGACGCC							
INAD-S	TTGGCTACACGATGGCTAAGATCAACAAGCGGTACAACATGATGAAGGATCTGCGCAGGATCGAGGTCCAGAGGGACGCC							
Consensus	ttggctacacgatggctaagatcaacaagcgggtacaacatgatgaaggatctgcgcaggatcgaggtccagagggacgcc							
	961	971	981	991	1001	1011	1021	1031
INAD-N	AGCAAGCCACTGGGACTCGCACTCGCTGGCCACAAGGACC GCCAGAAGATGGCCTGCTTTTGTTCGCCGGTGTGGATCCCAA							
INAD-V	AGCAAGCCACTGGGACTCGCACTCGCTGGCCACAAGGACC GCCAGAAGATGGCCTGCTTTTGTTCGCCGGTGTGGATCCCAA							
INAD-S	AGCAAGCCACTGGGACTCGCACTCGCTGGCCACAAGGACC GCCAGAAGATGGCCTGCTTTTGTTCGCCGGTGTGGATCCCAA							
Consensus	agcaagccactgggactcgcactcgtggccacaaggaccgccagaagatggcctgcttttgttgcgggtgtggatcccaa							
	1041	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111
INAD-N	CGGAGCATTGGGTAGCGTGGACATCAAACCGGGCGACGAGATCGTCGAGGTCAACGGCAATGTGCTGAAGAATCGCTGCC							
INAD-V	CGGAGCATTGGGTAGCGTGGACATCAAACCGGGCGACGAGATCGTCGAGGTCAACGGCAATGTGCTGAAGAATCGCTGCC							
INAD-S	CGGAGCATTGGGTAGCGTGGACATCAAACCGGGCGACGAGATCGTCGAGGTCAACGGCAATGTGCTGAAGAATCGCTGCC							
Consensus	cggagcattgggtagcgtggacataaaacgggcgacgagatcgtcgaggtcaacggcaatgtgctgaagaatcgctgcc							
	1121	1131	1141	1151	1161	1171	1181	1191
INAD-N	ACTTGAACGCTTCCGCCGTGTTCAAGAACGTTGGATGGGGATAAGCTCGTGATGATCACCTCGCGACGCAAGCCCAACGAT							
INAD-V	ACTTGAACGCTTCCGCCGTGTTCAAGAACGTTGGATGGGGATAAGCTCGTGATGATCACCTCGCGACGCAAGCCCAACGAT							
INAD-S	ACTTGAACGCTTCCGCCGTGTTCAAGAACGTTGGATGGGGATAAGCTCGTGATGATCACCTCGCGACGCAAGCCCAACGAT							
Consensus	acttgaacgctccgccggttcaagaacgctggatggggataagctcgtgatgatacctcgcgacgcaagcccaacgat							
	1201	1211	1221	1231	1241	1251	1261	1271
INAD-N	GAGGGCATGTGCGTCAAGCCCATCAAAGTTCACCCACCGCGTCTGATGAGACTAAGTTTATCTTCGACCAAGTTTCCCAA							
INAD-V	GAGGGCATGTGCGTCAAGCCCATCAAAGTTCACCCACCGCGTCTGATGAGACTAAGTTTATCTTCGACCAAGTTTCCCAA							
INAD-S	GAGGGCATGTGCGTCAAGCCCATCAAAGTTCACCCACCGCGTCTGATGAGACTAAGTTTATCTTCGACCAAGTTTCCCAA							
Consensus	gagggcatgtgcgctcaagcccatcaaagttccccaccgctctgatgagactaagtttatcttcgaccagtttcccaa							
	1281	1291	1301	1311	1321	1331	1341	1351
INAD-N	GGCGCGCACGGTGCAGGTGCGCAAGGAGGGTTTCTGGGCATCATGGTCACTATGGCAAGCACGCTGAGGTGGGAAGTG							
INAD-V	GGCGCGCACGGTGCAGGTGCGCAAGGAGGGTTTCTGGGCATCATGGTCACTATGGCAAGCACGCTGAGGTGGGAAGTG							
INAD-S	GGCGCGCACGGTGCAGGTGCGCAAGGAGGGTTTCTGGGCATCATGGTCACTATGGCAAGCACGCTGAGGTGGGAAGTG							
Consensus	ggcgcgcacggtgcaggtgcgcaaggagggtttctgggcatcatggctactatggcaagcacgctgaggtgggaagtg							
	1361	1371	1381	1391	1401	1411	1421	1431
INAD-N	GCATTTTCACTCTCGGATCTGAGAGAGGGATCGAATGCCAGTTGGCGGCGTGAAAGTGGCGCACATGCTGCTGGCCGTT							
INAD-V	GCATTTTCACTCTCGGATCTGAGAGAGGGATCGAATGCCAGTTGGCGGCGTGAAAGTGGCGCACATGCTGCTGGCCGTT							
INAD-S	GCATTTTCACTCTCGGATCTGAGAGAGGGATCGAATGCCAGTTGGCGGCGTGAAAGTGGCGCACATGCTGCTGGCCGTT							
Consensus	gcattttcactctcggatctgagagagggatcgaatgccagttggcgggctgaaagtggcgacatgctgctggccggtt							
	1441	1451	1461	1471	1481	1491	1501	1511
INAD-N	AATCAGGATGTAACACTGGAATCCAACACTACGATGATGCTACTGGACTGCTTAAACGTGCCGAGGGCGTAGTGACCATGAT							
INAD-V	AATCAGGATGTAACACTGGAATCCAACACTACGATGATGCTACTGGACTGCTTAAACGTGCCGAGGGCGTAGTGACCATGAT							
INAD-S	AATCAGGATGTAACACTGGAATCCAACACTACGATGATGCTACTGGACTGCTTAAACGTGCCGAGGGCGTAGTGACCATGAT							
Consensus	aatcaggatgtaaacactggaatccaactacgatgatgctactggactgcttaaactgcccagggcgtagtgaccatgat							
	1521	1531	1541	1551	1561	1571	1581	1591
INAD-N	TCTATTGACTCTCAAGAGCGAGGAGGCGATAAAGGCTGAGAAGGCCGCGGAAGAGAAAAAGAAGGAGGAGGCCAAGAAAAG							
INAD-V	TCTATTGACTCTCAAGAGCGAGGAGGCGATAAAGGCTGAGAAGGCCGCGGAAGAGAAAAAGAAGGAGGAGGCCAAGAAAAG							
INAD-S	TCTATTGACTCTCAAGAGCGAGGAGGCGATAAAGGCTGAGAAGGCCGCGGAAGAGAAAAAGAAGGAGGAGGCCAAGAAAAG							
Consensus	tctattgactctcaagagcggagggcgataaaggctgagaaggcgcgggaagagaaaaagaaggaggaggccaagaaaag							
	1601	1611	1621	1631	1641	1651	1661	1671
INAD-N	AGGAGGAAAAGCCACAGGAACCCGCCACAGCCGAGATCAAGCCGAACAAAAGATACTCATTTGAGTTGAAGGTGGAAAAG							
INAD-V	AGGAGGAAAAGCCACAGGAACCCGCCACAGCCGAGATCAAGCCGAACAAAAGATACTCATTTGAGTTGAAGGTGGAAAAG							
INAD-S	AGGAGGAAAAGCCACAGGAACCCGCCACAGCCGAGATCAAGCCGAACAAAAGATACTCATTTGAGTTGAAGGTGGAAAAG							
Consensus	aggaggaagccacaggaacccgccacagccgagatcaagccgaacaaaagatactcattgagttgaaggtggaaggaag							
	1681	1691	1701	1711	1721	1731	1741	1751
INAD-N	AAGCCAATGGGCGTTCATCGTCTGCGGCGGCAAGAACAACCATGTACGACTGGCTGTGTAATCACCACGTTTATCCGGA							
INAD-V	AAGCCAATGGGCGTTCATCGTCTGCGGCGGCAAGAACAACCATGTACGACTGGCTGTGTAATCACCACGTTTATCCGGA							
INAD-S	AAGCCAATGGGCGTTCATCGTCTGCGGCGGCAAGAACAACCATGTACGACTGGCTGTGTAATCACCACGTTTATCCGGA							
Consensus	aagccaatggcggtcatcgtctgcgggcgcaagaacaaccatgtacgactggctgtgtaatcaccacgtttatccgga							
	1761	1771	1781	1791	1801	1811	1821	1831
INAD-N	GGGACAAGTGGCAGCCGACAGCGCCTCAAGATCTTTGACCACATTTGCGATATAAATGGTACGCCAATCCACGTGGGAT							
INAD-V	GGGACAAGTGGCAGCCGACAGCGCCTCAAGATCTTTGACCACATTTGCGATATAAATGGTACGCCAATCCACGTGGGAT							
INAD-S	GGGACAAGTGGCAGCCGACAGCGCCTCAAGATCTTTGACCACATTTGCGATATAAATGGTACGCCAATCCACGTGGGAT							
Consensus	gggacaagtggcagccgacagcgctcaagatctttgaccacatTTGCGATATAAATGGTACGCCAATCCACGTGGGAT							
	1841	1851	1861	1871	1881	1891	1901	1911
INAD-N	CCATGACGACACTGAAGGTCCATCAGTTATTCCACACCACATACGAGAAAGCGGTCACCCTAACCGTCTCCGCGCTGAT							
INAD-V	CCATGACGACACTGAAGGTCCATCAGTTATTCCACACCACATACGAGAAAGCGGTCACCCTAACCGTCTCCGCGCTGAT							
INAD-S	CCATGACGACACTGAAGGTCCATCAGTTATTCCACACCACATACGAGAAAGCGGTCACCCTAACCGTCTCCGCGCTGAT							
Consensus	ccatgacgacactgaaggtccatcagttattccacaccacatACGAGAAAGCGGTCACCCTAACCGTCTCCGCGCTGAT							

	1921	1931	1941	1951	1961	1971	1981	1991
INAD-N	CCTCCGGAGCTGGAAAAGTTAACGTTGACCTTATGAAAAAAGCAGGCAAGGAGCTGGGCCTGTGCTTTCTCCCAACGA							
INAD-V	CCTCCGGAGCTGGAAAAGTTAACGTTGACCTTATGAAAAAAGCAGGCAAGGAGCTGGGCCTGTGCTTTCTCCCAACGA							
INAD-S	CCTCCGGAACTGGAAAAGTTAACGTTGACCTTATGAAAAAAGCAGGCAAGGAGCTGGGCCTGTGCTTTCTCCCAACGA							
Consensus	cctccgga ctgaaaaagtttaacgttgaccttatgaaaaaagcaggcaaggagctgggcctgtgct tctcccaacga							
	2001	2011	2021	2031	2041	2051	2061	2071
INAD-N	AATTGGATGTACCATCGCGGACTTGATTCAAGGACAATACCCGGAGATGACAGCAAACCTGCAGCGCGGCATATTATCA							
INAD-V	AATTGGATGTACCATCGCGGACTTGATTCAAGGACAATACCCGGAGATGACAGCAAACCTGCAGCGCGGCATATTATCA							
INAD-S	AATTGGATGCACCATCGCGGACTTGATTCAAGGACAATACCCGGAGATTGACAGCAAACCTGCAGCGCGGCATATTATCA							
Consensus	aattggatg accatcgcgga cttgattcaaggacaatacccgagat gacagcaaactgcagcgcggcgatattatca							
	2081	2091	2101	2111	2121	2131	2141	2151
INAD-N	CCAAATTCAATGGCGATGCCTTGGAGGGTCTCCGTTCCAGGTGTGCTACGCCTTGTTCAAGGGAGCCAACGGCAAGGTA							
INAD-V	CCAAATTCAATGGCGATGCCTTGGAGGGTCTCCGTTCCAGGTGTGCTACGCCTTGTTCAAGGGAGCCAACGGCAAGGTA							
INAD-S	CCAAATTCAATGGCGATGCCTTGGAGGGTCTCCGTTCCAGGTGTGCTACGCCTTGTTCAAGGGAGCCAACGGCAAGGTA							
Consensus	ccaaattcaatggcgatgccttggagggtctccgttccaggtgtgctacgccttgttcaagggagccaacggcaaggta							
	2161	2171	2181	2191	2201	2211	2221	2231
INAD-N	TCGATGGAAGTGACACGACCCAAGCCACTCTACGTACGGAGGCACCCAAGGCCTAGAGACGATCCTCATTCTCCTCCTC							
INAD-V	TCGATGGAAGTGACACGACCCAAGCCACTCTACGTACGGAGGCACCCAAGGCCTAGAGACGATCCTCATTCTCCTCCTC							
INAD-S	TCGATGGAAGTGACACGACCCAAGCCACTCTACGTACGGAGGCACCCAAGGCCTAGAGACGATCCTCATTCTCCTCCTC							
Consensus	tcgatggaagt gacacgacccaagccactctacgtacggaggc acccaaggcctagagacgatcctcattctcctcctc							
	2241	2251	2261	2271	2281			
INAD-N	CGGTAGCGAAGCAGTGCAGCAATTCAATAAAAGAACCAACAATT							
INAD-V	CGGTAGCGAAGCAGTGCAGCAATTCAATAAAAGAACCAACAATT							
INAD-S	CGGTAGCGAAGCAGTGCAGCAATTCAATAAAAGAACCAACAATT							
Consensus	cggtagcgaagcagtg cagcaattcaataaaagaaccaacaatt							

Abbildung A.13: Alignment von publizierten INAD-Nukleinsäuresequenzen (CDS)

Kennzeichnung von Start und Stop des ORF (*open reading frame*) in rot

Unterlegung von Basenpaaraustauschen mit grauen Boxen

A.7 Charakterisierung extrazellulärer WGA-Markierung von S2-DmTRPL-EGFP-Zellen

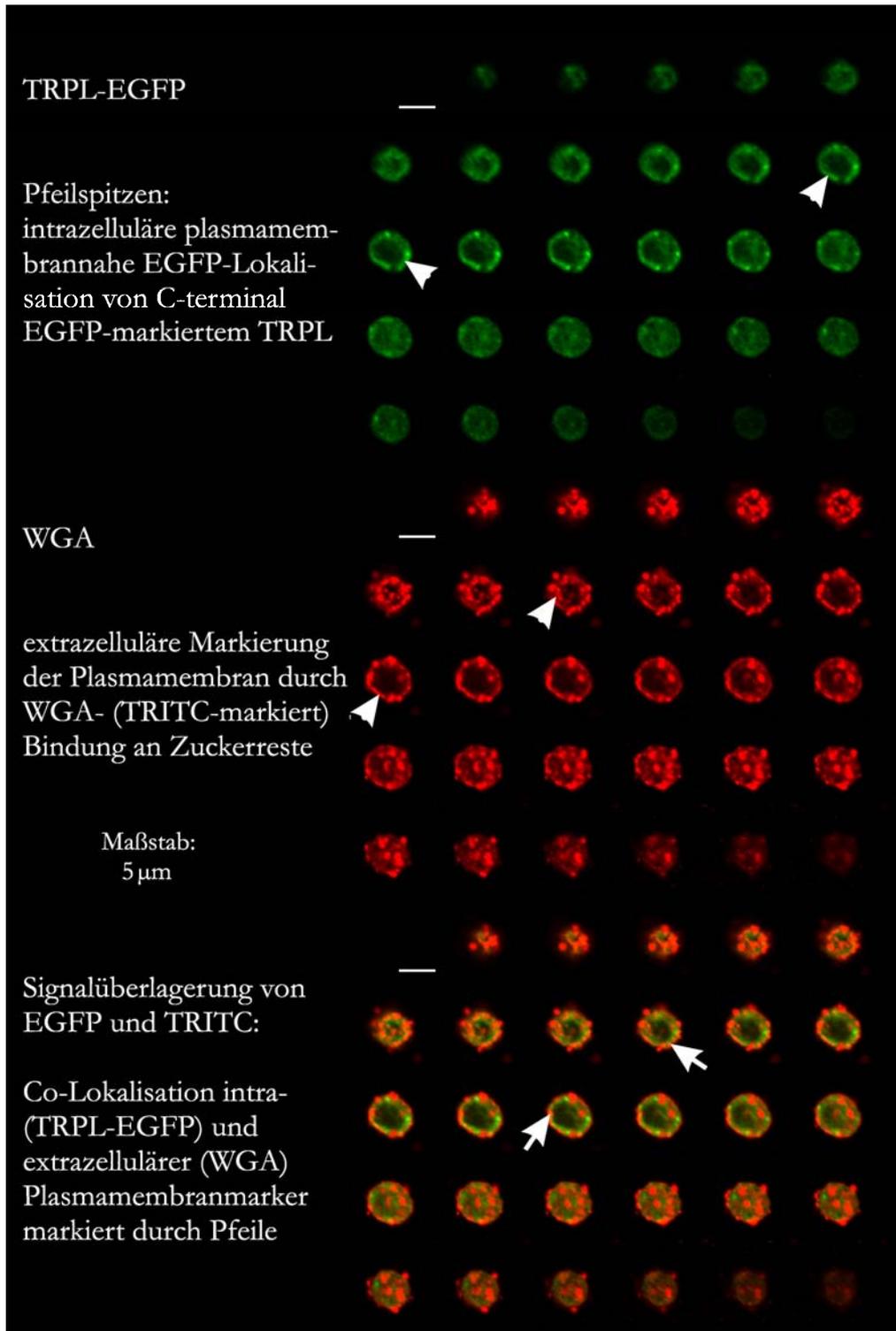


Abbildung A.14: Markierung DmTRPL-EGFP-exprimierender S2-Zellen mit TRITC-WGA – extrazelluläre Markierung der Plasmamembran

Zellen der Linie S2-DmTRPL-EGFP wurden nach Expressionsinduktion unpermeabilisiert mit WGA (TRITC-gekoppelt) inkubiert. Die Abbildung zeigt eine Serie von 30 aufeinanderfolgenden optischen Schnitten durch eine Zelle mit Detektion von DmTRPL-EGFP und WGA (TRITC). Die Aggregationen der WGA-Markierung verhindern die eindeutige Co-Lokalisation der extrazellulären WGA-Markierung mit der intrazellulären DmTRPL-EGFP-vermittelten (EGFP intrazellulär) Markierung der Plasmamembran durch eine vielfache Signalstärke.

A.8 Rekombinante S2-Expression: Abhängigkeit von Wachstumszustand und Induktionsstärke

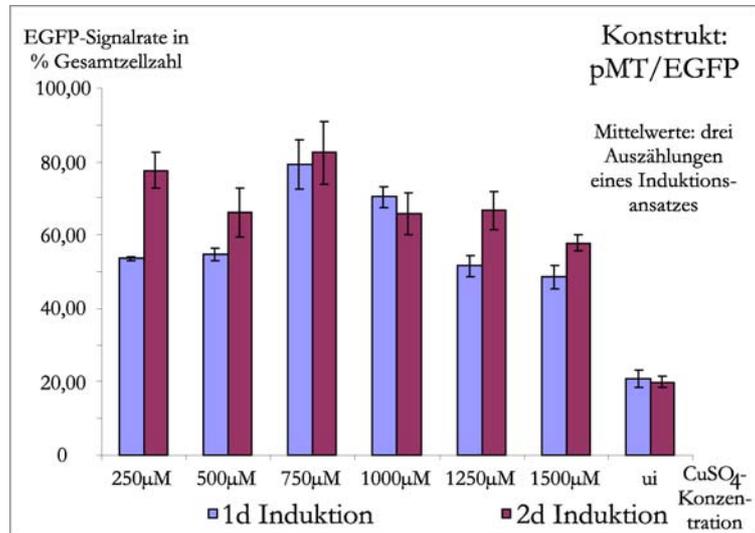


Abbildung A.15: Zusammenhang zwischen rekombinanter Expressionsrate und Induktionsstärke (angegeben als CuSO₄-Konzentration)

Die Analyse der rekombinanten Expression in S2-EGFP durch fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Rate EGFP-exprimierender Zellen zeigt ein Maximum nach zwei Tagen Induktion mit 750 µM CuSO₄. Ui kennzeichnet die basale rekombinante Expression in uninduzierten Zellen.

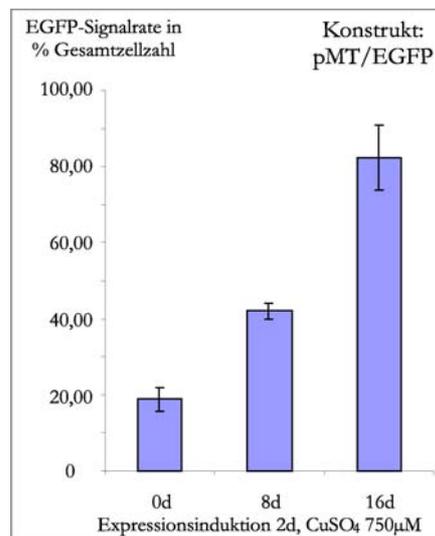


Abbildung A.16: Einfluss des Wachstumszustandes auf die Expressionsrate

Die Kultivierung von S2-EGFP vor der Expressionsinduktion zur Bestimmung der Expressionsrate erfolgte unter optimalen Bedingungen für 0, 8 und 16 d. Die Abbildung gibt Mittelwerte errechnet aus drei Auszählungen eines Ansatzes wieder.

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Name	Claudia Franz
	Geboren am	12.08.1975 in Leipzig
	Familienstand	ledig
Schulbildung	09/1982 – 07/1990	Polytechnische Oberschulen (POS), Leipzig
	09/1990 – 07/1992	Leistungsklasse, Fritz-Selbmann-Schule, Leipzig Abschluß: Mittlere Reife
	08/1992 – 06/1994	Georg-Christoph-Lichtenberg-Schule, Gymnasium, Leipzig Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,2
Studium	10/1994 – 10/1999	Studiengang Biologie, Freie Universität Berlin Biologisches Hauptfach: Genetik 1. Biologisches Nebenfach: Zoologie 2. Biologisches Nebenfach: Pflanzenphysiologie Nichtbiologisches Nebenfach: Biochemie
	02/1999 – 10/1999	Diplomarbeit, FU Berlin Institut für Genetik: „Funktionelle Analyse der Glutamin:Fructose-6- Phosphat-Aminotransferase aus <i>Drosophila virilis</i> in GFAT-gene-disruption-Mutanten von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ Abschluß: Diplom-Biologin, Gesamtnote: 1,0 (sehr gut)
	seit 01/2000	Durchführung einer Promotionsarbeit an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH) am Institut für Zoologie I, Zell- und Neurobiologie
Beruflicher Werdegang	01/2000 – 12/2002	Stipendiatin der German Israeli Foundation for Scientific Research and Development (GIF)
	seit 01/2003	Stipendiatin nach dem LGFG Baden-Württemberg
