

**Funktionsanalyse der lichtaktivierten Phosphorylierung  
des Rhodopsins (Rh1) von *Drosophila melanogaster*  
mittels gerichteter Mutagenese und  
Keimbahntransformation**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Georgia Wessels

aus Wiesbaden

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2002

Referent: Prof. Dr. R. Paulsen

Korreferent: Prof. Dr. J. Rétey



Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde an folgenden Stellen veröffentlicht:

**Artikel:**

NEU, G., BENTROP, J., SCHWAB, K., AND PAULSEN, R. (2001). Site directed mutagenesis of phosphorylation sites in the C-terminal region of *Drosophila* Rh1 opsin. *Biophysics* 11, 101–106.

**Kongressbeiträge:**

NEU, G., SCHILLO, M., SCHWAB, K., PAULSEN, R. AND BENTROP, J. (2001). Functional analysis of phosphorylation sites in the C-terminal region of *Drosophila* Rh1 opsin. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2001 (N.Elsner and W. Kreutzberg, eds), Thieme Stuttgart New York, Volume II, 504.

NEU, G., SCHILLO, M., BENTROP, J. AND PAULSEN, R. (2000). *Drosophila* Rh1 opsin: site directed mutagenesis of phosphorylation sites in the C-terminal region. *Eur. J. Cell Biol.* 79, Suppl. 50, 189.

SCHILLO, M., NEU, G., PAULSEN, R. AND BENTROP, J. (2000). The role of C-terminal rhodopsin phosphorylation in receptor desensitization. *Eur. J. Cell Biol.* 79, Suppl. 50, 188.



Ich danke

Herrn Prof. Dr. R. Paulsen für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft;

Herrn Prof. Dr. J. Rétey für die Übernahme des Korreferates;

Joachim Bentrop für seine ausdauernde Unterstützung und grenzenlose Hilfsbereitschaft während aller Phasen der Arbeit;

Gregor Belusic (Universität Ljubljana, Slowenien) für die Messungen der Elektroretinogramme;

Karin Schwab für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen;

Herrn Prof. Dr. E. Hafen (Universität Zürich, Schweiz) für die Überlassung von cDNA-Klonen;

Claudia, Kai, Kristina und Nina für das Korrekturlesen dieser Arbeit;

meinen ehemaligen Kollegen Simone und Markus für ihre Aufmunterungen und Unterstützung per Email und Telefon;

allen Institutsmitgliedern für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung im Labor und während des Zusammenschreibens.



*Für Lars*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	G-Protein gekoppelte Signaltransduktionskaskaden . . . . .	4
2.1.1	Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren . . . . .	5
2.1.2	Deaktivierung des Rezeptors durch Arrestin . . . . .	6
2.2	Das Komplexauge von <i>Drosophila</i> . . . . .	6
2.3	Der Sehfärbstoff Rhodopsin . . . . .	8
2.4	Aktivierung der Signaltransduktionskaskade . . . . .	11
2.5	Deaktivierung der Signaltransduktionskaskade . . . . .	12
2.6	Ziel der Arbeit . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>16</b>
3.1	Material . . . . .	16
3.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Kits . . . . .	16
3.1.2	Kulturmedien . . . . .	17
3.1.3	Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen . . . . .	17
3.1.4	Bakterienstämme und Vektoren . . . . .	18
3.1.5	Fliegenstämme . . . . .	18
3.1.6	Antiseren . . . . .	19

3.1.7	Zusammensetzung der Konstrukte . . . . .	20
3.1.8	Software . . . . .	20
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	21
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	21
3.2.2	Verdau von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsenzyme .	21
3.2.3	Reinigung und Fällung von DNA nach Restriktionsverdau . .	21
3.2.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	22
3.2.5	Isolierung von RNA . . . . .	22
3.2.6	Herstellung der Digoxigenin-gekoppelten cRNA-Sonde . . . . .	22
3.2.7	Northern Blot . . . . .	23
3.3	Herstellung transgener Fliegen . . . . .	25
3.3.1	Herstellung der Injektionslösung . . . . .	26
3.3.2	Injektion des Konstruktes in <i>Drosophila</i> -Embryonen . . . . .	26
3.4	Präparation biologischen Materials . . . . .	28
3.4.1	Präparation von Membranextrakten aus Köpfen von <i>Drosophila</i> . . . . .	28
3.4.2	Herstellung von Augen-Kappen-Präparaten sowie Präparation der entsprechenden Membranextrakte . . . . .	29
3.5	Zytologische und morphologische Methoden . . . . .	29
3.5.1	Nachweis der Pseudopupille durch Rettung der Rh1-Null-Mutante vor der retinalen Degeneration . . . . .	29
3.5.2	Ultrastrukturelle Lokalisation des Rh1 Rhodopsins . . . . .	29
3.6	Biochemische, elektrophysiologische und spektralphotometrische Methoden . . . . .	30

3.6.1	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	30
3.6.2	Western Blot . . . . .	31
3.6.3	Färbung von PVDF-Membranen mit Amidoschwarz . . . . .	32
3.6.4	Proteinphosphorylierung in Augenhomogenaten zum Nachweis der Rh1-Opsin-Phosphorylierung . . . . .	33
3.6.5	Proteinphosphorylierung in Augenhomogenaten zum Nachweis der Rh2-Rh6-Opsin-Phosphorylierung . . . . .	34
3.6.6	Lichtabhängige Bindung von Arrestin2 in Kopfhomogenaten .	35
3.6.7	Bestimmung des Proteingehaltes . . . . .	35
3.6.8	Spektralphotometrische Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration . . . . .	36
3.6.9	Messung von Elektroretinogrammen . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Licht-aktivierte Phosphorylierung des Opsins im Wildtyp und in der rdgC-Mutante von <i>Drosophila</i> . . . . .	39
4.2	Phosphorylierung der <i>Drosophila</i> -Rhodopsine Rh1–Rh6 . . . . .	40
4.3	Herstellung und Charakterisierung von Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	43
4.3.1	Herstellung von sechs Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	44
4.3.2	Nachweis der Expression der mutierten Rhodopsine auf der Transkriptionsebene . . . . .	45
4.3.3	Expression der mutierten Rhodopsine in den Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	47
4.3.4	Lichtaktivierte Arrestin2-Bindung in den Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	57

4.3.5	Metarhodopsinphosphorylierung in den Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	59
4.4	Einfluss der Mutationen von Phosphorylierungsstellen des Rh1-Rhodopsins auf die Physiologie des Photorezeptors . . . . .	63
4.4.1	Die elektrische Antwort (Elektroretinogramm) in den Phosphorylierungs-Mutanten . . . . .	63
4.4.2	Effekte der Mutationen potenzieller Phosphorylierungsstellen des Rh1-Opsins auf die Degradation des Rhodopsins . . . . .	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
5.1	Redundanz der Phototransduktionskaskaden . . . . .	71
5.2	Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Expression und Lokalisation des Rh1-Opsins . . . . .	73
5.3	Regulation der Arrestin-Bindung . . . . .	74
5.4	Charakterisierung der potenziellen Phosphorylierungsstellen . . . . .	75
5.5	Einfluss der Phosphorylierung auf die Deaktivierung der Reizantwort	79
5.6	Metarhodopsinphosphorylierung als Signal für Internalisierung . . . . .	81
<b>A</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>B</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>C</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>107</b>

# 1. Zusammenfassung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) regulieren eine Vielzahl physiologischer Funktionen in Organismen von der Hefe bis zum Menschen. Soweit bekannt besitzen alle GPCRs im C-terminalen Bereich des Rezeptorproteins potenzielle Phosphorylierungsstellen. Die Funktion der Phosphorylierungsstellen liegt häufig in der Deaktivierung des Rezeptors. Für das Rh1-Rhodopsin von *Drosophila*, einem Lichtrezeptor, der ein prototypisches Modellsystem für GPCRs darstellt, war diese Funktion der Phosphorylierung fraglich.

Zur Aufklärung der Funktion der im C-terminalen Bereich des Rh1-Rhodopsins vorkommenden Phosphorylierungsstellen (fünf Serine und ein Threonin) wurden durch Keimbahn-Transformation transgene Fliegenstämme erzeugt, die Rh1-Rhodopsine exprimieren, bei denen jeweils ein Serin oder Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht ist. Für alle Mutanten konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass das mutierte Rhodopsin korrekt transkribiert, translatiert und in die rhabdomerische Photorezeptormembran eingebaut wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Regulatorproteins Arrestin2 an den lichtaktivierten Rezeptor weder vom Phosphorylierungsgrad des Rezeptors noch vom Vorhandensein der phosphorylierbaren Aminosäuren abhängig ist. Die weitere Charakterisierung der potenziellen Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von Phosphorylierungsexperimenten ergab, dass vier der sechs untersuchten Stellen eine bedeutende Funktion bei der Phosphorylierung des Rezeptors ausüben. An den Ergebnissen wurde ein Modell für die sequenzielle Phosphorylierung des Rh1-Rhodopsins aufgestellt, ähnlich wie für Wirbeltierrhodopsin beschrieben. Physiologische Untersuchungen der Phosphorylierungs-

Mutanten anhand von Elektroretinogrammen ergaben, dass die einzelnen Phosphorylierungsstellen und der Phosphorylierungszustand des Rh1-Rhodopsins (im Gegensatz zu den Vertebraten), keinen Einfluss auf das An- und Abschalten der Sehkaskade ausüben. Eine Rolle bei der Aktivierung oder Deaktivierung des Rezeptors ist folglich auszuschließen. Stattdessen zeigen Experimente zur belichtungsabhängigen Konzentrationsänderung des Rh1-Rhodopsins in der Photorezeptorzelle, dass die Phosphorylierung Auslöser eines Degradationsprozesses für Metarhodopsin ist. Dieser Mechanismus wird bei circa halbmaximaler Phosphorylierung aktiviert. Er verläuft parallel zu einem Arrestin-abhängigen, vermutlich langsameren, Metarhodopsin-Abbauweg.

## 2. Einleitung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren gehören zu einer Proteinfamilie, die hunderte von funktionell unterschiedlich spezialisierten Proteinen beinhaltet. Mitglieder dieser Proteinfamilie haben Rezeptorfunktionen unter anderem bei der synaptischen Neurotransmission und der Wahrnehmung von Geschmack, Geruch und Licht. Die Eigenschaften dieser Rezeptoren sind beachtenswert konserviert, obwohl sie die verschiedensten Signale vermitteln. Über seine Hauptaufgabe hinaus, die durch ein Signal vermittelte Interaktion mit einem G-Protein, übt nahezu jeder GPCR weitere Funktionen aus. So beinhaltet er strukturelle Informationen für seine Prozessierung und den Transport zum Zielorganell. Daher rührt das Interesse, Funktionen einzelner Bereiche des Rezeptormoleküls aufzuklären. Wie wichtig kleinste Domänen eines GPCRs sein können, zeigt die Tatsache, dass bereits der Austausch einzelner Aminosäuren zu einem Verlust der Proteinfunktion führen. Welche Auswirkungen das zur Folge haben kann, wird an dem Sehpigment Rhodopsin deutlich. Hier ist mehrfach publiziert worden, dass Mutationen im Rhodopsin und Defekte in der Rhodopsinregulation zu degenerativen Erkrankungen der Netzhaut und damit zur Blindheit führen. Obwohl das Gebiet der GPCR ein sehr intensiv bearbeitetes Forschungsfeld ist, sind zahlreiche Faktoren der Regulation des Rhodopsins unbekannt oder nur unzureichend charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb der Einfluss potenzieller Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Rhodopsins auf die Deaktivierung der Photorezeptorzelle und eine mögliche Internalisierung und Degradation des Rezeptors untersucht. Als Modellsystem dient die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*.

### 2.1 G-Protein gekoppelte Signaltransduktionskaskaden

Alleine bei den Mammaliern sind fast 1000 verschiedene GPCRs bekannt (WESS *et al.*, 1998). Die Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* hat gezeigt, dass das Genom der Tauffliege circa 200 Gene enthält, die für GPCRs codieren (ADAMS *et al.*, 2000). Die Aktivierung derartiger GPCRs erfolgt durch die Ligandenbindung oder die Aktivierung eines bereits gebundenen Liganden. Ein GPCR im aktivierten Zustand interagiert mit einem G-Protein, das aus drei Untereinheiten, der  $G\alpha$ -,  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheit besteht. Der Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit löst eine Dissoziation des Komplexes in die Untereinheiten  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  aus. Es sind unterschiedliche  $G\alpha$ -Klassen bekannt, die verschiedene Targetenzyme aktivieren oder auch inaktivieren können (z.B.:  $G_{\alpha t}$  aktiviert die cGMP-Phosphodiesterase,  $G_{\alpha q}$  aktiviert die Phospholipase  $C\beta$ ,  $G_{\alpha s}$  aktiviert die Adenylatzyklase,  $G_{\alpha i}$  hemmt die Adenylatzyklase). Durch die Aktivierung der Targetenzyme kommt es zur Freisetzung von „second messenger“, wodurch es dann beispielsweise zur Phosphorylierung von Proteinen, zur Genaktivierung oder zur Öffnung von Ionenkanälen kommen kann. Auch der  $G\beta\gamma$ -Komplex kann Funktionen in der Signaltransduktion ausüben.

Nach Aktivierung einer Transduktionskaskade muss diese inaktiviert werden, um erneut die durch eine weitere Ligandenbindung an den Rezeptor aktivierte Transduktionskaskade auslösen zu können. Derartige Inaktivierungsmechanismen greifen auf jeder Stufe der Transduktionskaskade ein. Das Hauptaugenmerk wird in der vorliegenden Arbeit auf die Inaktivierung des GPCRs selbst gerichtet. In einem ersten Schritt wird der aktivierte, das heißt mit einem Liganden besetzte Rezeptor durch eine G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase (GRK) phosphoryliert. Diese Kinasen, bei denen es sich um Serin/Threonin modifizierende Proteinkinasen handelt, phosphorylieren typischerweise Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des GPCRs (Übersichtsartikel: LEVINE (1999)). Im Anschluß daran bindet Arrestin,

ein Regulatorprotein bzw. Adapterprotein, an den Rezeptor, wodurch eine weitere Aktivierung von G-Proteinmolekülen gehemmt wird.

### 2.1.1 Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Für entsprechend untersuchte GPCRs ist die Phosphorylierung des Rezeptors im C-terminalen Bereich der erste Schritt zur Deaktivierung des Rezeptors. So findet man beispielsweise im C-Terminus des Rhodopsins der Vertebraten und Invertebraten, sowie anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor, eine Gruppe Serin- und Threoninreste, die nach der Stimulierung des Rezeptors phosphoryliert werden (Vertebraten: WILDEN & KÜHN (1982); THOMPSON & FINDLAY (1989), Invertebraten: VINÓS *et al.* (1997),  $\beta$ -adrenerger Rezeptor: SIBLEY *et al.* (1986); PALCZEWSKI *et al.* (1991)). Für diese Phosphorylierung der GPCRs spielen die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) eine bedeutende Rolle. Sieben zur Familie der GRK gehörende Proteinkinasen wurden bisher identifiziert (GRK1-GRK6: PITCHER *et al.* (1998), GRK7: CHEN *et al.* (2001)). Diese Kinasen werden zum einem gewebespezifisch exprimiert wie GRK1, die fast ausschließlich in der Wirbeltier-Retina gefunden wird (LORENZ *et al.*, 1991) und die Phosphorylierung des gebleichten Rhodopsins der Wirbeltiere katalysiert (SHICHI & SOMERS, 1978). GRK2 und GRK3 dagegen werden zum Beispiel ubiquitär exprimiert, und sind in der Lage  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren zu phosphorylieren. Bei den Invertebraten konnte die Rhodopsinkinase, die eine relativ hohe Homologie zur GRK2 aufweist, bisher nur beim *Octopus* isoliert werden (KIKKAWA *et al.*, 1998).

GRK1 bindet an die dritte intrazytoplasmatische Schleife des lichtaktivierten Rhodopsins und wird durch diese Bindung allosterisch aktiviert (PALCZEWSKI *et al.*, 1991), worauf sie in der Lage ist, den Rezeptor im C-terminalen Bereich zu phosphorylieren. Die Interaktion der GRK2 mit dem aktivierten Rhodopsin oder dem  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor führt ebenfalls zu einer allosterischen Aktivierung (CHEN *et al.*, 1993). Die Bindungsstelle mit der die GRK an den Rezeptor binden, befindet sich im N-terminalen Bereich der Kinase, der sich zwischen einzelnen Kinasen

sehr stark unterscheiden kann. Daran schließt sich in C-terminaler Richtung die katalytische Region an, die zwischen verschiedenen Kinasen eine höhere Ähnlichkeit besitzt. Der C-terminale Bereich der Kinase weist wiederum keine signifikante Ähnlichkeit bei einem Vergleich verschiedener Kinasen untereinander auf (LORENZ *et al.*, 1991). Der C-Terminus enthält posttranslationale Modifikationsstellen, die G $\beta\gamma$ -Bindungsdomäne und Phospholipidbindungsstellen, die die Translokation zu und eine Assoziation mit der Plasmamembran regulieren (PITCHER *et al.*, 1998).

### 2.1.2 Deaktivierung des Rezeptors durch Arrestin

Arrestine bewirken die vollständige Desensibilisierung des GPCRs, die mit der Phosphorylierung des Rezeptors eingeleitet wird. Sie gehören zu einer Proteinfamilie, die für viele Arten aus unterschiedlichen Gruppen des Tierreichs beschrieben wurden. Zur Familie der Arrestine gehört unter anderem das visuelle Arrestin der Stäbchen-Photorezeptoren, das Arrestin, welches in den Zapfen zu finden ist (CRAFT *et al.*, 1993) und  $\beta$ -Arrestin1 bzw.  $\beta$ -Arrestin2 (LOHSE *et al.*, 1990; ATTRAMADAL *et al.*, 1992). Während das Vorkommen der im visuellen System identifizierten Arrestine auf photorezeptorische Zellen begrenzt ist, findet man die beiden  $\beta$ -Arrestine ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert. In der Vertebratenphotorezeption bindet das Arrestin (S-Antigen, Rind: WISTOW *et al.* (1986), Mensch: YAMAKI *et al.* (1988)) im Anschluss an die Metarhodopsinphosphorylierung an den aktivierten Rezeptor (SCHLEICHER *et al.*, 1989). Durch die Bindung des Arrestins wird die weitere Aktivierung von G-Proteinmolekülen gehemmt (GUREVICH *et al.*, 1993; GIBSON *et al.*, 2000).

## 2.2 Das Komplexauge von *Drosophila*

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist die Phosphorylierung eines Rhodopsins im Komplexauge der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dieses Auge ist ein hervorragendes Modellsystem zur Klärung solcher Fragestellungen, da es zum einen bereits biochemisch, elektrophysiologisch und entwicklungsbiologisch untersucht ist,

zum anderen ideale Möglichkeiten zur molekularbiologisch-genetischen Manipulation bietet. So können beispielsweise *in vitro* mutierte Gene sehr zuverlässig transgen in dem physiologischen Zellhintergrund exprimiert werden.

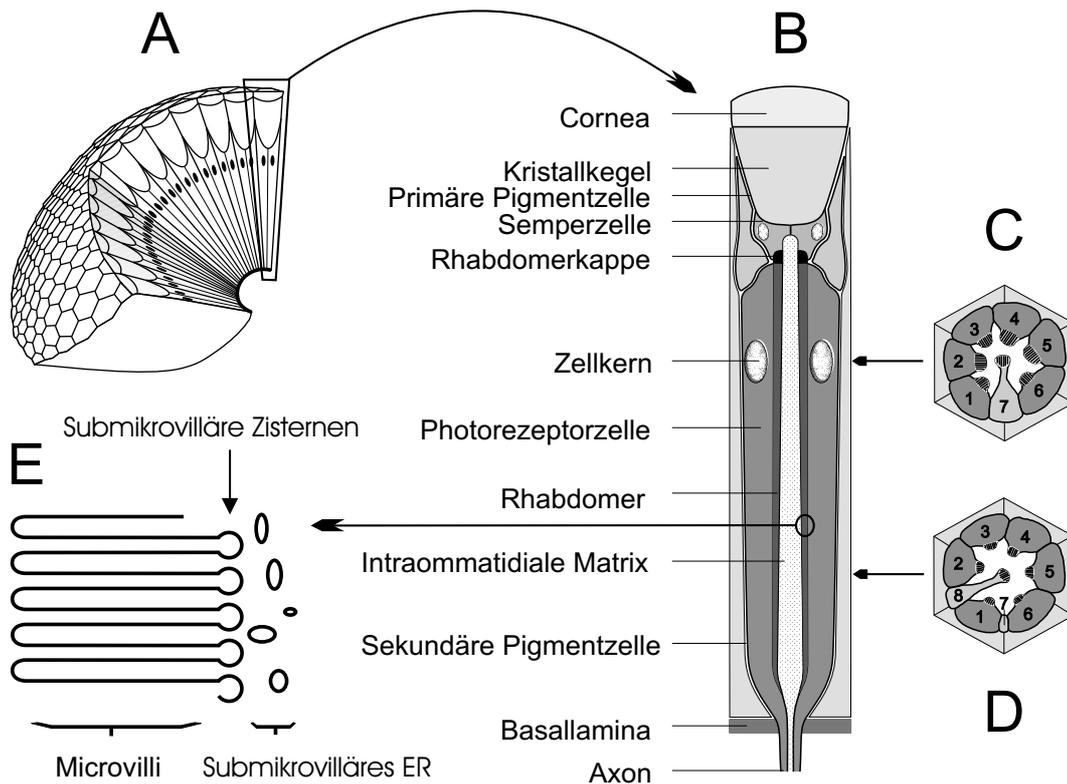


Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung eines Komplexauges und eines Ommatidiums von *Drosophila*.** **A** Übersicht über den Aufbau eines Komplexauges, **B** Längsschnitt durch ein einzelnes Ommatidium, **C** Querschnitt durch ein Ommatidium auf Höhe der R7-Photorezeptorzelle, **D** Querschnitt durch ein Ommatidium auf Höhe der R8-Photorezeptorzelle, **E** Detail aus der Organisationsstruktur der Mikrovillusmembran.

Das Auge von *Drosophila* bezeichnet man als Komplexauge, da es sich aus vielen Einzelaugen (Ommatidien) zusammensetzt (Übersichtsartikel: HARDIE *et al.* (1985)). Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besteht aus circa 750 Einzelaugen, die alle den gleichen Grundaufbau aufweisen (Abb. 2.1) und hexagonal zueinander angeordnet sind. Jedes Ommatidium besitzt zur Augenoberfläche hin einen dioptrischen Apparat, der sich aus der Cornealinse und dem Kristallkegel zusammensetzt. Proximal dazu befinden sich die primären Pigmentzellen und die Semperzellen, an

die sich acht Retinulazellen anschliessen, die auch als Photorezeptorzellen oder einfach als Photorezeptoren bezeichnet werden. Die Abschirmung der Photorezeptorzellen von einfallendem Licht aus benachbarten Ommatidien erfolgt durch sekundäre Pigmentzellen. Durch die Basalmembran wird das Auge proximal von den optischen Ganglien, der Medulla und der Lobula abgegrenzt. Die Photorezeptorzellen sind im Zentrum des Ommatidiums gelegen und bilden lateral, zur Mitte des Ommatidiums hin, spezialisierte Mikrovillissäume aus, die sogenannten Rhabdomere. Ein Rhabdomer hat einen Durchmesser von 50 nm und eine Länge von 80–90  $\mu\text{m}$ . In die mikrovilläre Membran ist der Sehfärbstoff, das Rhodopsin eingelagert (LANGER *et al.*, 1966). Die Rhabdomere der acht Photorezeptorzellen sind in einem charakteristischen trapezförmigen Muster angeordnet. Nach ihrer Position im Ommatidium unterscheidet man die Außenzellen R1–6 von dem zentralen Paar R7/R8.

### 2.3 Der Sehfärbstoff Rhodopsin

Rhodopsin, wie auch andere zur Familie der GPCRs gehörende Proteine, zeichnen sich durch ein gemeinsames strukturelles Motiv aus: Sie besitzen sieben die Membran durchspannende  $\alpha$ -Helices, die extrazellulär und intrazellulär durch jeweils drei überwiegend hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind. Ein stark konservierter Bereich findet sich in der ersten intrazellulären Schleife (i1), der bei allen Invertebraten auftritt. Es wird angenommen, dass dieser beim Transport des Rhodopsins, seiner Faltung und der Verankerung in der Membran eine grosse Rolle spielt (GÄRTNER & TOWNER, 1995; GÄRTNER *et al.*, 2000). Die zweite und dritte Schleife sowie der C-terminale Bereich weisen Bindungsstellen für das G-Protein auf (KÖNIG *et al.*, 1989). Beim Rinderopsin findet man eine vierte intrazelluläre Schleife, die durch eine Palmitoylierung von 1–2 Cystein-Resten im C-terminalen Bereich zustande kommt. Dabei sind Fettsäureketten in die Membran eingelagert, die die Verankerung des C-Terminus in der Membran ermöglichen (OVCHINNIKOV *et al.*, 1988). Solche Cysteine sind beispielsweise auch bei dem Rh1-Rhodopsin von *Drosophila* zu finden, die entsprechende Mutation dieser Stellen lässt jedoch vermuten,

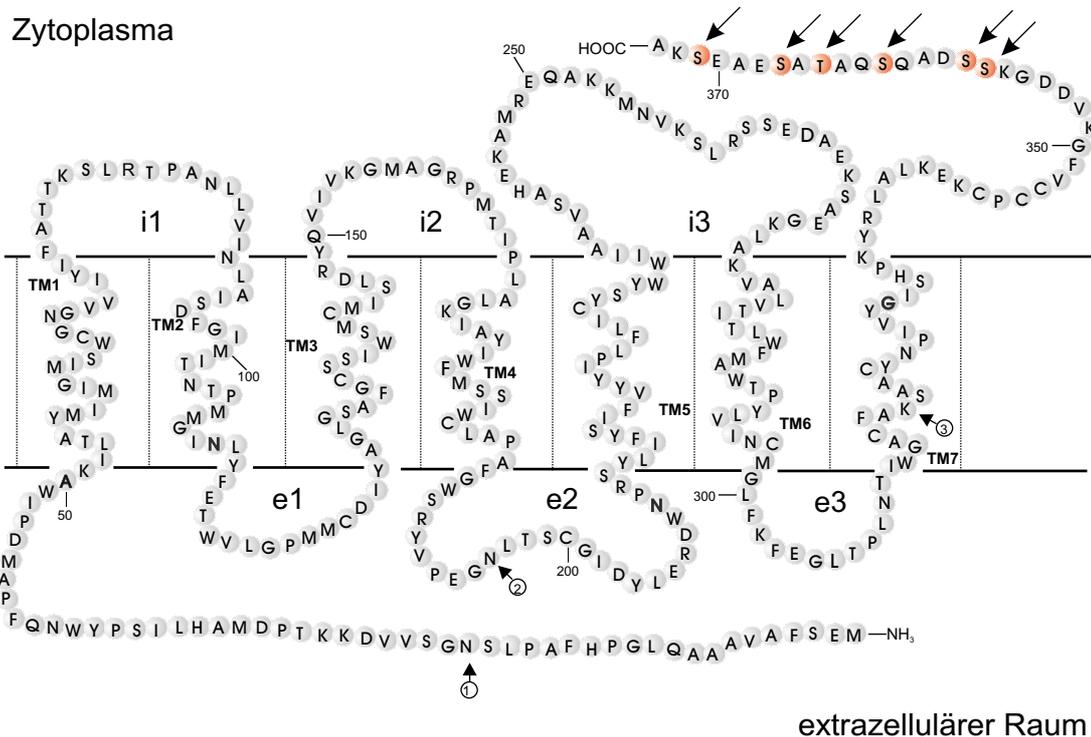


Abbildung 2.2: **Struktur des Opsins Rh1 von *Drosophila melanogaster***. Bei den durch Pfeile gekennzeichneten Aminosäuren S357, S358, S362, T365, S367 und S371 handelt es sich um potenzielle Phosphorylierungsstellen. Die Pfeile 1 und 2 kennzeichnen die möglichen Glykosylierungsstellen N20 und N196. Der Pfeil 3 markiert die Aminosäure K319, an die der Chromophor gebunden ist. Die Kennzeichnung TM1–TM7 bezeichnet die transmembranären Regionen des Opsins. Die Bezeichnung i1–i3 markiert die intrazellulären Schleifen und e1–e3 kennzeichnet die extrazellulären Schleifen.

dass die Palmitylierung mit anschließender Ausbildung einer vierten zytoplasmatischen Schleife keine Rolle spielt (BENTROP *et al.*, 1997). Im C-terminalen Bereich befinden sich potenzielle Phosphorylierungsstellen (ZUKER *et al.*, 1985; O'TOUSA *et al.*, 1985), die in dem topologischen Modell der Abb. 2.2 gekennzeichnet sind.

Der N-Terminus setzt sich, ausgehend von der Transmembrandomäne e1, in den extrazellulären Raum fort. Hier befindet sich eine Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung (O'TOUSA *et al.*, 1985; KATANOSAKA *et al.*, 1998). An die Opsin-Komponente, deren Struktur und Besonderheiten zuvor beschrieben wurden, ist kovalent ein Chromophor gebunden. Bei den Vertebraten findet man 11-cis-Retinal und im Dipterenauge (*Drosophila*, *Calliphora*) handelt es sich um 11-cis-3-Hydroxyretinal (VOGT, 1983; VOGT & KIRSCHFELD, 1984; O'TOUSA *et al.*, 1985). Der Chromo-

phor ist an ein Lysinrest in der siebten Transmembranhelix gebunden und parallel zur Membran angeordnet (Übersichtsartikel: OVCHINNIKOV *et al.* (1982); HARGRAVE *et al.* (1983); APPELBURRY *et al.* (1986)). Durch Belichtung kommt es zur Isomerisierung des Chromophors. Dabei wird das 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal (im Vertebratenauge) beziehungsweise 11-cis-3-Hydroxyretinal zu all-trans-3-Hydroxyretinal (im Dipterenauge) umgewandelt. Im Gegensatz zu den Vertebraten, bei denen das Rhodopsin in seine beiden Untereinheiten Opsin und Chromophor zerfällt, kann im Dipterenauge eine direkte Regeneration des aktivierten Rhodopsins (Metarhodopsin) durch erneute Belichtung erfolgen (HAMDORF *et al.*, 1979; PAULSEN, 1984; BLUMENFELD *et al.*, 1985).

Es wurden bisher sechs verschiedene Rhodopsine (Rh1-Rh6) isoliert und näher charakterisiert. Das Rh1-Rhodopsin wird in den Photorezeptorzellen R1–R6 (SCARVADA *et al.*, 1983; O'TOUSA *et al.*, 1985; ZUKER *et al.*, 1985; DE COUET *et al.*, 1987) und das Rh2 in den Ocelli exprimiert (POLLOCK & BENZER, 1988). Zwei weitere Rhodopsine, das Rh3 und das Rh4, sind in verschiedenen Subtypen der R7-Photorezeptorzellen nachgewiesen worden (FRYXELL *et al.*, 1987; MONTELL *et al.*, 1987; ZUKER *et al.*, 1987). Rh5 und Rh6 werden in verschiedenen Untergruppen der R8-Photorezeptorzelle exprimiert (HUBER *et al.*, 1997; CHOU *et al.*, 1996). Dabei wird die Expression des Rh5-Rhodopsins induziert, wenn in der R7-Zelle Rh3 exprimiert wird. Befindet sich hingegen Rh7 in den R7-Zellen, so wird in der R8-Zelle das Rh6-Gen exprimiert.

Ein weiteres Homolog zu den sechs bekannten und näher charakterisierten Rhodopsinen wurde durch die Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms entdeckt (RUBIN *et al.*, 2000) und als Rh7 bezeichnet. Über seine Funktion und den Ort seiner Expression ist bisher noch nichts Genaueres bekannt.

Die Rhodopsine Rh1–Rh6 weisen potenzielle Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich auf (Abb. 2.3). Bei Rh1 von *Drosophila melanogaster* findet man sechs potenzielle Aminosäuren, ein Threonin (Position 365) und fünf Serine (Position 357,

C-terminaler Bereich		
Rh1	HPKYRLALKEKCPCCVFGKVDDGKSSDAQSQA-TASEAESKA-----	373
Rh2	HPKYRIVLKEKCPMCVFGNTDEPKPDAPASDTEETTSEADSKA-----	349
Rh3	HPRYRMELQKRCPWLALNEKAPESSAVASTSTTQEPQQTAA-----	383
Rh4	HPRYRLELQKRCPWLGVNEKSGEISSAQST-TTQEQQQTAA-----	378
Rh5	HPKYRLELERRLPWLGIRESKHATSGTSGGQESVASVSGDTLALSVQN	381
Rh6	HPKYKQVLREKMPCLACGKDDLTSDSRTQATAEI---SESQA-----	369
	**.* * ...* . . . . *	

Abbildung 2.3: **C-terminaler Bereiche der *Drosophila*-Rhodopsine Rh1–Rh6.** Sterne (\*) kennzeichnen die Aminosäuren, die bei allen Opsinen konserviert sind, Punkte (.) kennzeichnen Aminosäuren, die bei mindestens drei der sieben Fliegen-Opsine konserviert sind. Unterstrichene Aminosäuren kennzeichnen die Phosphorylierungsstellen.

358, 362 und 371), die als Kandidaten für die Phosphatbindung bei der lichtabhängigen Phosphorylierung des Sehfärbstoffes in Frage kommen. Bei den fünf übrigen *Drosophila melanogaster*-Rhodopsinen findet man ebenfalls potenzielle Phosphorylierungsstellen, deren Anzahl zwischen sechs und neun schwankt. So findet man bei Rh2 vier Threonine (Position 327, 339, 341 und 342) und drei Serine (Position 337, 343, 347). Im C-terminalen Bereich des Rh3 sind fünf Threonine (Position 371, 373, 374, 380 und 381) und vier Serine (Position 365, 366, 370 und 372) lokalisiert. Bei Rh4 findet man fünf Threonine (Position 367, 368, 369, 375 und 376) und vier Serine (Position 358, 362, 363 und 366). Bei Rh5 gibt es drei Threonine (Position 357, 360, 374) und sechs Serine (Position 358, 361, 366, 369, 371 und 378). Im Rh6 sind drei Threonine (Position 353, 358 und 361) und vier Serine (Position 354, 356, 365 und 367) im C-terminalen Bereich lokalisiert. Die Anzahl der potenziellen Phosphorylierungsstellen bei den verschiedenen *Drosophila*-Rhodopsinen liegt demnach nicht konserviert vor.

## 2.4 Aktivierung der Signaltransduktionskaskade

Die Phototransduktionskaskade von *Drosophila* ist ein prototypisches Beispiel für einen G-Protein gekoppelten, PLC-vermittelten Signalweg (ZUKER *et al.*, 1996; MONTELL, 1999; PAULSEN *et al.*, 2001a,b). Das durch die Absorption eines Licht-

quanten aktivierte Rhodopsin (Metarhodopsin) koppelt an ein trimeres G-Protein vom  $G_q$ -Typ (BLUMENFELD *et al.*, 1985; BENTROP & PAULSEN, 1986; DEVARY *et al.*, 1987), welches dadurch aktiviert wird. Die  $G_\alpha$ -Untereinheit aktiviert daraufhin eine Phospholipase  $C\beta$  (PLC) (BLOOMQUIST *et al.*, 1988; BÄHNER *et al.*, 2000). Die PLC hydrolysiert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in die beiden Stoffe Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) (DEVARY *et al.*, 1987). Es ist postuliert worden, dass  $IP_3$  Calcium aus internen Speichern freisetzt (COOK & MINKE, 1999), während DAG ein Aktivator einer augen-spezifischen Proteinkinase C ist (HUBER *et al.*, 1998) und des weiteren langkettige ungesättigte Fettsäuren generiert (CHYB *et al.*, 1999). Die Aktivierung der PLC führt zur Öffnung zweier Kation-selektiver Kanäle (TRP und TRPL). Die resultierende Ladungsverschiebung führt letztendlich zu einem depolarisierenden Rezeptorpotential.

### 2.5 Deaktivierung der Signaltransduktionskaskade

Wenn die Photorezeptorzelle auf wiederholte Reize erneut mit der Änderung des Rezeptorpotentials antworten soll, muss eine schnelle Abschaltung (Deaktivierung) der Transduktionskaskade gewährleistet sein. Hier soll näher auf die Inaktivierung des mit dem  $G_\alpha$ -Protein interagierenden aktiven Zustandes des Rhodopsins, dem Metarhodopsin, eingegangen werden. Auf die Belichtung von Rhodopsin und dessen Umwandlung in den aktiven Metarhodopsinzustand erfolgt die Bindung von Arrestin2 an das Opsinmolekül (BENTROP *et al.*, 1993). Arrestin2 bildet mit dem Opsinmolekül einen stabilisierenden Komplex (KISELEV *et al.*, 1994, 1997). Durch diese Komplexbildung hemmt das Arrestin2 die Aktivierung der Transduktionskaskade (RANGANATHAN & STEVENS, 1995). Die Umwandlung von Rhodopsin zu Metarhodopsin löst außerdem eine reversible Phosphorylierung des Sehfärbstoffes aus (BENTROP *et al.*, 1993; PAULSEN & BENTROP, 1984; PLANGGER *et al.*, 1994; VINÓS *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den im Vertebratenrezeptor beschriebenen Mechanismen ist die Bindung von Arrestin2 an das Metarhodopsin nach bisherigen, aus *in vitro*-Experimenten resultierenden, Erkenntnissen für die Meta-

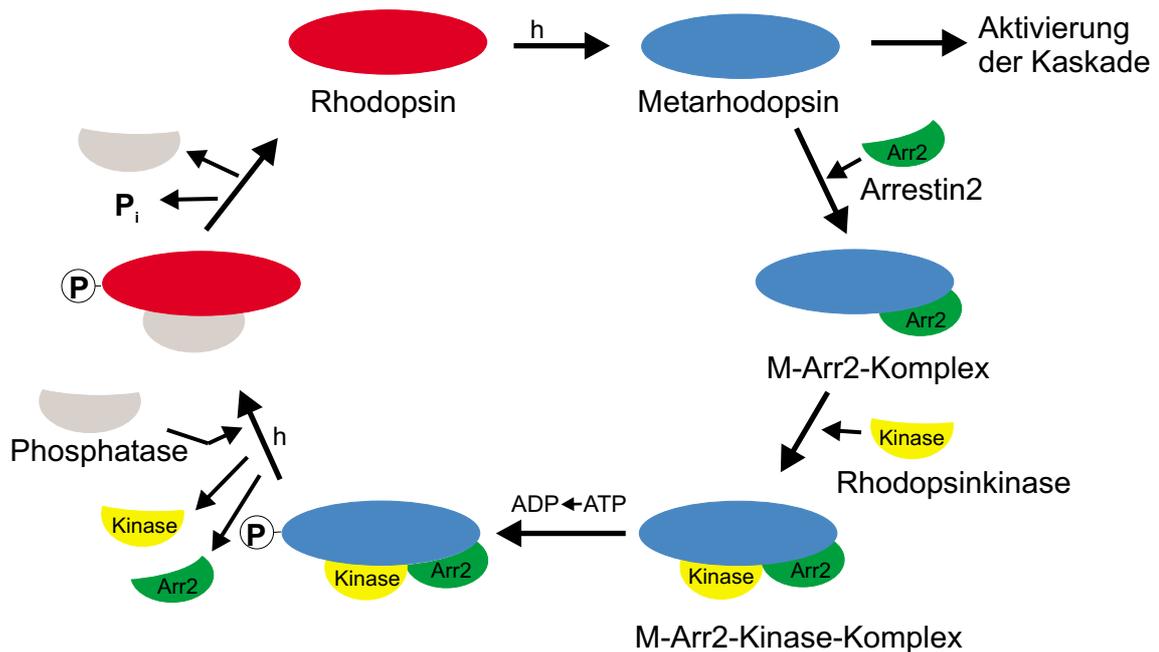


Abbildung 2.4: **Deaktivierung und Regeneration von Rhodopsin innerhalb der Inositoltriphosphat-gesteuerten Sehkaskade.** Einzelne Schritte des Kreislaufes sind im Text erklärt.

rhodopsinphosphorylierung nicht notwendig. Die Phosphorylierung erfolgt durch eine noch nicht näher charakterisierte Rhodopsinkinase (BENTROP *et al.*, 1993).

Das nach der Belichtung an das Metarhodopsin gebundene Arrestin2 wird durch eine Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II phosphoryliert (MATSUMOTO *et al.*, 1994; CALMAN *et al.*, 1996). Das Metarhodopsin wird durch das Auftreten eines Photons auf den Metarhodopsin-Arrestin-Komplex wieder in Rhodopsin überführt, und das Arrestin wird freigesetzt. Das Rhodopsin kann nun durch eine Phosphatase dephosphoryliert werden. Für *Drosophila* wird das Produkt des *rdgC*-Gens als mögliche Rhodopsinphosphatase postuliert (STEELE *et al.*, 1992; VINÓS *et al.*, 1997). Damit steht das regenerierte Rhodopsin erneut der Phototransduktionskaskade zur Verfügung.

### 2.6 Ziel der Arbeit

Für die Funktion der Phosphorylierung im C-terminalen Bereich des *Drosophila*-Rhodopsins gibt es bisher erst einzelne Hinweise. So konnte gezeigt werden, dass ein Rh1-Rhodopsin bei dem ein großer Teil des C-Terminus deletiert ist keinen Defekt in der Antwort auf einen Reiz aufweist (VINÓS *et al.*, 1997). Bei einer Mutante hingegen bei der alle potenziellen Serin- und Threoninreste durch Einführung von Punktmutationen durch ein Alanin ersetzt wurden, konnte ein Deaktivierungseffekt nachgewiesen werden (SCHILLO, 2001). Demnach muss den C-terminalen Phosphorylierungsstellen eine größere Rolle zukommen, als ursprünglich gedacht. Aus Studien an Wirbeltier-Rhodopsin und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist bekannt, dass einzelne Phosphorylierungsstellen unterschiedliche Funktionen haben. Deshalb ist es von größter Wichtigkeit, die bei dem *Drosophila*-Rh1-Rhodopsin bisher erfolgten Untersuchungen der potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus zu präzisieren, indem jeweils nur einzelne Serin- oder Threoninreste durch ein Alanin ersetzt werden. Mit Hilfe transformanter *Drosophila* sollen deshalb in dieser Arbeit folgende Fragestellungen näher untersucht werden:

- Hat die Einführung von Mutationen im C-terminalen Bereich des Rh1 Auswirkungen auf Stabilität, Prozessierung und Transport von Rhodopsin?
- Welche der potenziellen Phosphorylierungsstellen werden phosphoryliert? Gibt es Hinweise auf eine multiple Phosphorylierung?
- Welchen Einfluss hat die Phosphorylierung des aktivierten Rhodopsins auf die Deaktivierung der Phototransduktionskaskade?
- Spielen die potenziellen Phosphorylierungsstellen eine Rolle bei der Interaktion des Rhodopsins mit Arrestin?
- Welche Bedeutung haben die potenziellen Phosphorylierungsstellen bei Internalisierung/Degradation des Rezeptors?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollen gentechnische und biochemische Methoden eingesetzt werden. Zunächst sollen mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation verschiedene mutagene Fliegenstämme hergestellt werden, bei denen jeweils eine der im C-terminalen Bereich des Rhodopsins vorkommenden Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ersetzt wird. Mit Hilfe biochemischer Methoden soll dann ein möglicher Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Expression und die Lokalisation des Rhodopsins untersucht werden. Da für die Phosphorylierung des Rhodopsins Rh1 der Taufliege *Drosophila melanogaster* eine vorausgehende Interaktion mit Arrestin notwendig ist, sollen Bindungsstudien durchgeführt werden. Des Weiteren soll mit Hilfe elektrophysiologischer Analysen dieser Mutanten der Einfluss einzelner Phosphorylierungsstellen auf die Signaltransduktion *in vivo* untersucht werden.

## 3. Material und Methode

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Kits

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster erhaltlicher Reinheit und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen. Weitere Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham	$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, Hybond-N +-Membranen RNAguard
J.T.Baker	Glukose
Biorad	PVDF-Membranen
Difco	Hefeextrakt, Bacto Trypton, Bacto Agar, Skim Milk
Fluka	Natriumacetat, Natriumhypochlorid-Lösung, Diethylpyrocarbonat (DEPC)
Gibco-Invitrogen	Low melting Agarose, 1kb DNA-Leiter, Restriktionspuffer, Restriktionsenzyme, 10 kDa Protein-Leiter
Kodak	Röntgenfilm (X-OMAT-AR)
Promega	CDP-Star
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit
Renner	Einweg-Sterilfilter (0,2 $\mu\text{m}$ , 0,45 $\mu\text{m}$ )

Roche Molecular Biochemicals	Alkalische Phosphatase
Schleicher & Schuell	Membranfilter (0,6 $\mu$ m, Durchmesser 47 mm)
Serva	Acrylamid, Ammoniumpersulfat (APS) $\beta$ -Mercaptoethanol 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Stratagene	RNA Transcription Kit
World Precision Instruments Inc.	Glaskapillaren aus Borosilikat (Durchmesser 1,0 mm)

#### 3.1.2 Kulturmedien

LB-Medium	NaCl 5 g/l Bacto Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l pH 7, eingestellt mit NaOH
-----------	--

#### 3.1.3 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA
10x TBE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,4
Ladepuffer für Agarose-Gele	0,1 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin in TE-Puffer
Puffer für 1 kb DNA-Leiter	1 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 M EDTA pH 8, 50 % Glycerin
1 kb DNA-Leiter	10 % 1kb Leiter-Stammlösung (1 $\mu$ g/ $\mu$ l), 40 % Puffer, 50 % <i>A. bidest</i>



*w; pRh1-Rh2; ninaE*-Mutante:

Die Expression des Rh2-Rhodopsins erfolgt unter dem Rh1-Promotor in der *ninaE*-Mutante. Dies führt zu einer ektopischen Expression des Rh2-Rhodopsins in den R1-R6 Zellen des Ommatidiums.

*w; pRh1-Rh3; ninaE*-Mutante:

Das Rh3-Rhodopsin wird unter dem Rh1-Promotor exprimiert.

*w; pRh1-Rh4; ninaE*-Mutante:

Die Expression des Rh4-Rhodopsins erfolgt unter dem Rh1-Promotor.

*w; pRh1-Rh5; ninaE*-Mutante:

Das Rh5-Rhodopsin wird unter dem Rh5-Promotor exprimiert.

*w; pRh1-Rh6; ninaE*-Mutante:

Das Rh6-Rhodopsin wird unter dem Rh6-Promotor exprimiert.

Alle Fliegen wurden auf einem carotinoidhaltigen Maismehlmedium gezogen und in einem 12-Stunden-hell-12-Stunden-dunkel-Rhythmus bei 24 °C gehalten. Die Präparation, der für die Experimente verwendeten Fliegen, erfolgte zwischen einem Tag und zwei Wochen nach dem Schlüpfen. Bei einzelnen Versuchen wurde von dieser Haltung der Fliegen abgewichen, worauf an entsprechender Stelle im Ergebnisteil hingewiesen wird. Die Grünlichtexposition der Fliegen in einem Kasten aus Filterglas (maximale Transmission bei 500 nm, Transmission bei 460 nm 0 %, Fa. Schott) wurde in einem Abstand von 70 cm unter einer Leuchtstoffröhre (TDL 36W-1/25, Fa. Philips) durchgeführt.

#### **3.1.6 Antiseren**

Für Immunoblot-Analysen wurden folgende Antiseren in der angegebenen Verdünnung verwendet:

Antikörper	Antigen	Antikörper erzeugt in	Verdünnung	Quelle
anti-Arr2	Arrestin2 von <i>Calliphora</i>	Kaninchen	1:1500	Schillo M.
anti-Rh1(1.2.2)	Peptid Ile237-Ser367 des <i>Drosophila</i> Rh1-Opsin	Kaninchen	1:500	Eurogentec Seraing, Belgien

Tabelle 3.1: Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### 3.1.7 Zusammensetzung der Konstrukte

Die zu injizierenden Konstrukte wurden im Rahmen der Diplomarbeit hergestellt (NEU, 1998). Dabei war mit einem genomischen *Rh1*-Klon eine gerichtete Mutagenese mit dem Quick Change™ Site directed Mutagenesis Kit (Fa. Stratagene) durchgeführt worden. Unter Verwendung verschiedener Primer wurden einzelne Kodons für die Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Proteins so mutiert, dass je eine Stelle für Alanin anstelle des jeweiligen Serins bzw. des Threonins kodiert. Die erhaltene, mutierte *Rh1*-DNA wurde zur Überprüfung der Mutation sequenziert. Die Umklonierung in den YC4-Vektor erfolgte über die Schnittstellen *SacI* und *XbaI* (Abb. des Vektors siehe 4.3).

### 3.1.8 Software

Die Auswertung der Aufnahmen von Protein- und Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems, das mit der Software BioCapt Version 99.02s für Windows 1998 (Fa. LTF Labortechnik) ausgestattet ist. Statistische Auswertungen sowie das Erstellen von Eichkurven wurden mit dem Programm Microsoft Excel 97 durchgeführt. Die meisten Abbildungen wurden mit Hilfe eines Flachbrettscanners (JX 330, Fa. Sharp) digitalisiert und in Corel Photo Paint 9 (Fa. Corel), Photoshop 6 (Fa. Adobe) oder Corel Draw 9 (Fa. Corel) bearbeitet.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden wurden größtenteils entsprechend den Angaben in SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt. Bei Verwendung spezieller Reagenzien wurde gemäß den Angaben des Herstellers von den in SAMBROOK *et al.* (1989) beschriebenen Protokollen abgewichen.

### 3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep-spin-Plasmid-Kit der Firma Qiagen verwendet, wobei die einzelnen Schritte der Isolierung nach den Angaben im Handbuch des Herstellers durchgeführt wurden (QIAprep Miniprep Handbook, Version 98). Als Ausgangsmaterial für die Präparationen dienten Übernachtskulturen von Plasmid-tragenden *E. coli* XL1-Zellen in LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin (5 ml pro Präparation). Die Elution von den Silica-Säulen erfolgte mit je 100 µl TE-Puffer pH 7,4 beziehungsweise mit H<sub>2</sub>O. Zur Ermittlung der Konzentration und der Reinheit der erhaltenen DNA-Lösung wurden photometrisch Meßwerte bei 260 nm und 280 nm genommen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml.

### 3.2.2 Verdau von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsenzyme (Restriktionsverdau)

Der Verdau von Vektoren erfolgte in einem Volumen von 25 µl (Restriktionsenzym in der Konzentration von 1,5 Units/µg DNA, 2,5 µl des entsprechenden Restriktionsenzym-puffers in *A. bidest*). Die Verdaue wurden für 3–4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3 Reinigung und Fällung von DNA nach Restriktionsverdau

Zur Extraktion der Proteine wurden die Reaktionsansätze mit je einem Volumen Phenol (äquilibriert mit TE-Puffer) ausgeschüttelt und zentrifugiert (15800 x g, 5 Minuten). Die wässrige Phase wurde darauf mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen

3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2 Volumen 96 %igem Ethanol für 1 Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde die DNA gefällt und dann abzentrifugiert (15800 x g, 10 Minuten). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer pH 7,4 gelöst.

#### 3.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die verwendeten Gele bestanden aus 0,8% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 7,4), denen jeweils Ethidiumbromid ( $0,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt wurde. Als Gelapparatur wurden Flachbett-Elektrophoresekammern (Fa. Pharmacia) verwendet. Die aufzutragende Probe wurde mit 1/10 Volumen Auftragepuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kb DNA Leiter der Fa. Gibco.

#### 3.2.5 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Fliegenköpfen wurden 100 Fliegenköpfe auf Eis präpariert. Jeweils 50 Fliegenköpfe wurden in  $50\ \mu\text{l}$  TRIZOL gesammelt. Diese Fliegenköpfe wurden mit einem Stempel homogenisiert, worauf die beiden Homogenate vereinigt wurden. Die weiteren Schritte erfolgten nach der Anleitung des Herstellers (Instructions for RNA Isolation with TRIZOL, Fa. Gibco). Die gewonnene RNA wurde in  $50\ \mu\text{l}$  RNase-freiem *A.bidest* resuspendiert.

#### 3.2.6 Herstellung der Digoxigenin-gekoppelten cRNA-Sonde

Zur Herstellung der Digoxigenin-gekoppelten cRNA-Sonde zum Nachweis der Rh1- bzw. Actin-Expression wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Dazu wurden jeweils DNA-Fragmente des *Rh1*-Gens, welches in den pBlueskriptIIKS(+)-Vektor kloniert war und des *Actin*-Gens, das in den pBlueskriptIISK(+) kloniert war, verwendet. Im pBlueskriptSK/KS(+)-Vektor ist es möglich, von einem einklonierten Genfragment den einen DNA-Strang mit T3- den anderen mit T7-Polymerase zu transkribieren. Je nach Klonierung des DNA-Fragments wird „sense“ bzw. „antisense“ cRNA transkribiert. Zur Herstellung der „antisense“ cRNA wurde für das *Rh1*-

Genfragment die T7-Polymerase eingesetzt und für das *Actin*-Genfragment wurde die T3-Polymerase eingesetzt. Vor der Transkription wurde der Vektor linearisiert, damit „run off“-Transkripte entstehen. „Round circle“-Transkripte, die entstehen, wenn der Vektor nicht linearisiert vorliegt, enthalten neben der Sequenz des DNA-Fragments auch die Vektorsequenz. Die Linearisierung wurde mit einem Enzym, das einen 5'-Überhang erzeugt und dem gewünschten Promotor gegenüberliegt, durchgeführt. Die Linearisierung erfolgte für den das *Rh1*-Genfragment enthaltenden Vektor mit Sal-R1 und für den das *Actin*-Genfragment enthaltenden Vektor mit BamHI.

Ein Transkriptionsansatz enthielt jeweils 1  $\mu\text{g}$  linearisierte DNA, 40 mM Tris-HCl pH 8, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM Spermidin, 50 mM NaCl, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0,65 mM TTP, 0,35 mM DIG-11-UTP (Fa. Stratagene), 30 mM DTT, 1,2 U/ $\mu\text{l}$  RNAGuard (Amersham Pharmacia Biotech), 0,4 U/ $\mu\text{l}$  der entsprechenden Polymerase (Fa. Stratagene). Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  0,2 M EDTA und 2,4  $\mu\text{l}$  4 M LiCl wurde die Reaktion beendet, die cRNA gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$  DEPC behandeltem *A. bidest* aufgenommen. Um zu überprüfen, ob die Transkription erfolgreich war, wurden 5  $\mu\text{l}$  cRNA auf ein 1 % Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen.

### 3.2.7 Northern Blot

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA wurde unter Zuhilfenahme von denaturierenden Agarose-Gelen (1 % Agarose, 2 % Formaldehyd in MOPS-Puffer (20 mM MOPS pH 7, 8 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8, DEPC behandelt) nach FOURNEY *et al.* (1989) erreicht. 1-3  $\mu\text{g}$  der isolierten Gesamt-RNA wurden mit 15  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (50 % Formamid, 6 % Formaldehyd, 6 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau in MOPS-Puffer) und 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) versetzt und für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. MOPS-Puffer diente als Elektrodenpuffer für die Elektrophorese. 3  $\mu\text{l}$  einer RNA-Leiter (Fa. Gibco Invitrogen) wurden als Eichmarker eingesetzt, die vor dem Auftrag wie die Proben behandelt wurden. Die Elektrophorese wurde bei konstant 60 Volt durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das

### 3. MATERIAL UND METHODE

---

Gel 2 x 10 Minuten in DEPC behandeltem *A.bidest* gewaschen und anschließend für 2 x 20 Minuten in DEPC behandeltem 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7) gewaschen. Die RNA wurde daraufhin unter Zuhilfenahme einer Druckblot-Apparatur (Posi-Blot, Fa. Stratagene) auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran transferiert. Als Blotpuffer wurde 20x SSC verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Abschließend wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (0,45 J/cm<sup>2</sup>) an die Membran fixiert.

Die Prähybridisierung erfolgte mit 5x SSC, 40 % Formamid, 3,5 % Blockingreagenz (Fa. Roche Molecular Biochemicals), 0,02 % SDS, 0,1 % Na-Laurylsarcosinat (50 ml Lösung/100 cm<sup>2</sup>) für 2,5 Stunden bei 68 °C unter Schütteln. Für die Hybridisierung wurden 3 µl cRNA-Sonde mit 3 ml Prähybridisierungslösung versetzt und 10 Minuten bei 100 °C denaturiert. Die Blot-Membran wurde über Nacht bei 68 °C unter Schütteln in der Hybridisierungslösung inkubiert und anschließend für 2 x 10 Minuten in 2x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und 2 x 20 Minuten in 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 71 °C unter Schütteln gewaschen. Die Detektion hybridisierter, Digoxigenin-markierter cRNA-Sonde erfolgte mit Hilfe Alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpern (Fa. Roche Molecular Biochemicals). Die Membranen wurden dazu für 1–3 Minuten in Maleinsäurepuffer (150 mM NaCl, 100mM Maleinsäure, pH 7,5) äquilibriert und anschließend für 30 Minuten in 1 % Blocking-Lösung (Fa. Roche Molecular Biochemicals) in Maleinsäurepuffer zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die Bindung des anti-Digoxigenin-Antikörper (1 : 20000 in Blockierungspuffer verdünnt) erfolgte für 30 Minuten in 25 ml/100 cm<sup>2</sup> Antikörperlösung. Nach 3 x 10 Minuten Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20, wurde die Membran in 100 mM Tris-HCl pH 9,5 und 100 mM NaCl äquilibriert, bevor sie für weitere 5 Minuten in einem luminiszierenden Phosphatase-Substrat (CDP-Star<sup>TM</sup>, Fa. Promega, 1 : 100 in Äquilibrierungspuffer verdünnt) im Dunkeln inkubiert wurde. Nach Abtupfen der überflüssigen Flüssigkeit wurde die feuchte Membran in Frischhaltefolie eingeschweißt

und in eine Autoradiographiekassette gelegt. Nach 1 Stunde, in der sich die Lumineszenz entwickelt hatte, wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR) aufgelegt. Der Film wurde je nach Stärke des Signals für 10 Sekunden bis 2 Minuten exponiert und anschließend entwickelt.

### 3.3 Herstellung transgener Fliegen

Die Herstellung transgener Fliegen erfolgte mit Hilfe der P-Element vermittelten Keimbahntransformation. Dabei macht man sich das im *Drosophila*-Genom natürlich vorkommende P-Element zunutze. Es setzt sich aus zwei gleichartigen Transposase-Erkennungssequenzen zusammen, die ein *Transposase*-Gen umschließen. Die Transposase, bei der es sich um ein Enzym handelt, ist in der Lage, das P-Element anhand der Erkennungssequenzen zu identifizieren, dieses aus der DNA auszuschneiden und an einer anderen Stelle wieder im Genom zu integrieren. Um das gewünschte Konstrukt über P-Element vermittelte Keimbahntransformation in das Genom einbringen zu können, wird das Konstrukt in einen P-Element-Vektor kloniert. Dieser trägt, flankierend von der Klonierungsstelle, die Transposase-Erkennungssequenz. Zusammen mit diesem P-Element-Vektor wird ein sogenanntes Helfer-Plasmid injiziert, welches das Transposase-Gen enthält. Die Injektion erfolgt in *Drosophila*-Embryonen des präblastodermalen Stadiums, die eine Defizienz des P-Elementes aufweisen. Nach der Injektion wird die Transposase exprimiert, worauf das Konstrukt aus dem P-Element herausgeschnitten wird und an einer beliebigen Stelle in der genomischen DNA integriert wird. Da das Transposase-Gen selber nicht im Genom integriert werden kann, erfolgt nach kurzer Zeit ein Abbau der Helfer-Plasmid-DNA. Das Enzym kann nicht mehr exprimiert werden, und somit wird eine Transposition des integrierten Konstruktes zu einem späteren Zeitpunkt verhindert. Wie zuvor erwähnt, wird das Konstrukt in Embryonen injiziert, die sich im präblastodermalen Stadium befinden. Während dieses Stadiums haben sich im Embryo noch keine Zellgrenzen ausgebildet, aber die DNA für die Zellen wurde repliziert. Die Injektion der DNA erfolgt am posterioren Ende des Embryo, da sich hier die Vorläufer der Keimbahn-

zellen bilden werden. Um überprüfen zu können, ob die Transformation erfolgreich war, wird mit dem Konstrukt zusammen ein Markergen transformiert. Der in dieser Arbeit verwendete P-Element-Vektor (YC4) trägt als Markergen das *yellow*-Gen. Die Expression dieses Gens führt bei Wildtyp-Fliegen zur braunen Körperfarbe. Die Injektion des Konstruktes erfolgte in einen Fliegenstamm, bei dem das *yellow*-Gen endogen deletiert ist. Die Fliegen zeigen daher eine gelbe Körperfarbe. Bei einer erfolgreichen Integration des injizierten Konstruktes in die Keimbahnzellen weist die nachfolgende Fliegengeneration die Wildtyp-Körperfarbe auf, so dass die transgenen Tiere leicht zu identifizieren sind.

#### 3.3.1 Herstellung der Injektionslösung

Für die Herstellung der Injektionslösung wurden 100  $\mu\text{g}$  der DNA des zu injizierenden Konstruktes verwendet. Diese war zuvor mit Hilfe des QIAprep-Spin-Plasmid-Kits (Fa. Qiagen) gewonnen worden. Des Weiteren wurden 30  $\mu\text{g}$  Helfer-Plasmid<sup>1</sup> zugesetzt. Die DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc und 3 Volumen 100 % Ethanol für eine Stunde bei  $-80^\circ\text{C}$  gefällt. Nach einer 10 min Zentrifugation bei 15800 x g bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15800 x g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Abschließend wurde das Pellet für zwei Minuten im Vakuum getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  *A. bidest* gelöst und dann bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Unmittelbar vor der Injektion wurde die DNA-Lösung nochmals zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen, die sonst zu einer schnellen Verstopfung der Injektionsnadel führen.

#### 3.3.2 Injektion des Konstruktes in *Drosophila*-Embryonen

Zur Injektion des Konstruktes in Embryonen wurden die Eier direkt nach der Ablage gesammelt. Hierzu wurden etwa 4000 zwischen 2-8 Tage alte Fliegen 1-2 Tage vor der Injektion in eine Eiablage-Box gesetzt und an einen 12-Stunden-hell-12-Stunden-

---

<sup>1</sup>Das Helfer-Plasmid, ein T2-Helfer, wurde von Prof. Dr. Ernst Hafen von der Universität Zürich (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

dunkel-Rhythmus gewöhnt. Zur Erhöhung der Eierproduktion wurde die Eiablage-Box mit einer mit Frisch-Hefe bestrichenen Apfelsaftagarplatte<sup>2</sup> verschlossen. Am Injektionstag wurde die Apfelsaftagarplatte in einem halbstündigen Rhythmus gewechselt. Die auf der Platte abgelegten Eier wurden mit Natriumhypochloridlösung (6,5% in *A. bidest*, Fa. Fluka) für 30 Sekunden dechorioniert. Darauf wurden die sich in der Lösung befindenden Eier auf eine Membran (Fa. Schleicher & Schuell) abgenutscht und für 30 Sekunden mit Leitungswasser gespült. Die Eier wurden unter dem Binocular mit Hilfe eines feinen Pinsels auf der Membran in einer Linie aufgereiht, so dass die posterioren Enden der Eier in die gleiche Richtung zeigten. Die so aufgereihten Eier wurden mit einem Objektträger aufgenommen, dessen Längsseite zuvor mit einer Klebelösung<sup>3</sup> bestrichen worden war. Die Embryonen wurden in einem konstanten Wärmestrom (30 °C, 6–7 Minuten) mit Hilfe des „Air Therm“ (Fa. World Precision Instrumens) angetrocknet, um eine Injektion von Flüssigkeit in die Embryonen zu ermöglichen, ohne diese zum Platzen zu bringen. Die Embryonen wurden anschließend mit Öl überschichtet (Votalef Oil 10S, Fa. Prolabo), um ein weiteres Austrocknen zu verhindern.

Die Injektion erfolgte mit Hilfe des Mikroinjektors 5242 (Fa. Eppendorf) unter optischer Kontrolle an einem Invert-Mikroskop (Axiovert 35, Fa. Zeiss). Durch einen optimierten Pressdruck wurde die DNA-Lösung aus der verwendeten Nadel (sterile Femtotips II, Fa. Eppendorf) in das posteriore Ende der Embryonen injiziert. Eier, die das präblastodermale Stadium schon überschritten hatten, wurden mittels der Nadel zerstört. Die Objektträger mit den Embryonen wurden bei 18 °C für 48 Stunden in einer feuchten Kammer aufbewahrt, bis alle L1-Larven geschlüpft waren. Die L1-Larven wurden mit einer feinen Nadel in futterhaltige Gefäße übertragen, in

---

<sup>2</sup>Zur Herstellung der Apfelsaftagarplatten werden 3% Agar zusammen mit 0,167% Zucker in *A. bidest* autoklaviert. Nach Abkühlung auf circa 60 °C wird die Lösung mit 1/3 Volumen Apfelsaft und 0,1% Nipagin versetzt und in Petrischalen gegossen.

<sup>3</sup>Eine halbe Rolle Scotch-Klebeband wurde in 50 ml n-Heptan gelöst. Mit der Lösung wurde ein Objektträger beschichtet, der nach Abdampfen des n-Heptans verwendet werden kann.

dem die weitere Aufzucht bei 24 °C erfolgte. Die in diesen Zuchtgefäßen geschlüpften Fliegen wurden als Jungfrauen abgesammelt. Die Fliegen wurden einzeln in ein Zuchtgefäß gesetzt und mit jeweils einer Fliege des Ausgangsstammes verpaart. Die Nachkommen, die das Konstrukt in die DNA ihrer Keimbahnzellen integriert hatten, wiesen eine Änderung ihrer Körperfärbung auf und konnten über diese erkannt und aussortiert werden. Diese als transgen identifizierten Fliegen wurden wiederum mit Fliegen des Ausgangsstammes verpaart, um sie zu vermehren. Da die Nachkommen dieser Fliegen nur ein Allel des Transgens aufweisen, wurden diese homozygot für das Transgen gekreuzt. Hierfür wurde der Stamm *yw;Sp/CyO;MKRS/TM2* verwendet, der ein Markergen für jedes Chromosom trägt.

#### 3.4 Präparation biologischen Materials

Die nachfolgenden beschriebenen Präparationen wurden auf Eis und unter Rotlicht (Kaltlichtquelle KL 1500, Filterglas RG630 (Fa. Schott)) durchgeführt. Die in einigen Versuchen durchgeführte Blaubelichtung erfolgte ebenfalls mit einer Kaltlichtquelle KL 1500 der Fa. Schott mit dem Schott Filterglas BG 12. Durch die Blaubelichtung kommt es zu einer Umwandlung von Rhodopsin in Metarhodopsin bis hin zu einem photostationären Gleichgewicht. Hierbei beträgt der maximale Gehalt an Metarhodopsin 69 % des Gesamtsehfärbstoffes. Zur Vereinfachung werden folgende Abkürzungen verwendet:

P:	Rhodopsin in inaktiver Form
M:	Metarhodopsin, nach Aktivierung des Rhodopsins durch Blaubelichtung
P-Membran:	Rotlicht-adaptierte Membranen, 100 % des Rhodopsins in P-Form
M-Membran:	Blaulicht-adaptierte Membranen, 69 % des Rhodopsins in M-Form

##### 3.4.1 Präparation von Membranextrakten aus Köpfen von *Drosophila*

Die *Drosophila*-Köpfe wurden mittels einer gebogenen Dumont-Pinzette vom Rumpf der Fliege getrennt. Die in PBS pH 6,2 gesammelten Köpfe wurden mit einem

Plastikstempel für 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde darauf bei 15800 x g, für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach einer zweiminütigen Trockenzentrifugation (15800 x g, 4°C) in 1x SDS-Probenpuffer extrahiert (1 µl pro Kopf). Das SDS-Extrakt wurde dann für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Daraufhin wurde es erneut zentrifugiert (15800 x g, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingeforen.

#### **3.4.2 Herstellung von Augen-Kappen-Präparaten sowie Präparation der entsprechenden Membranextrakte**

Für die Herstellung der Augen-Kappen-Präparate wurde der Kopf einer *Drosophila* mit einer gebogenen Dumont-Pinzette vom Rumpf abgetrennt. Die Komplexaugen wurden daraufhin mit einer scharfen Rasierklinge vom Kopf abgeschnitten. Die Augen-Kappen wurden in PBS pH6,2 mit PMSF (10 mM) (2 µl pro Kopf), zur Trennung der zytosolischen Proteine von den Membranproteinen oder in 1x SDS-Probenpuffer (2 µl pro Kopf), zur Isolierung der Gesamtproteine aus Augen gesammelt. Die Isolierung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

### **3.5 Zytologische und morphologische Methoden**

#### **3.5.1 Nachweis der Pseudopupille durch Rettung der Rh1-Null-Mutante vor der retinalen Degeneration**

Die Pseudopupille wurde nachgewiesen, um zu zeigen, dass die Rh1-Null-Mutante durch Integration des *Rh1*-Gens in die genomische DNA vor einer retinalen Degeneration bewahrt werden kann. Hierzu wurden 3 Tage alte *Drosophila*-Fliegen verwendet, die zuvor im Dunkeln aufgezogen und gehalten worden waren. Die Präsenz der Pseudopupille wurde an einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) kontrolliert.

#### **3.5.2 Ultrastrukturelle Lokalisation des Rh1 Rhodopsins**

Die korrekte Lokalisierung des Rh1 Rhodopsins der verschiedenen mutierten Rh1 Phosphorylierungs-Mutanten in den Rhabdomeren wurde durch Immunmarkierung

mit anti-DmRh1-Antikörpern auf elektronenmikroskopischer Ebene nachgewiesen. Die chemische Fixierung der *Drosophila*-Fliegenköpfe erfolgte in 0,1 % Glutaraldehyd, 3 % Paraformaldehyd in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend für 2 Stunden bei 4 °C. Nach einem einmaligen Waschen in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2 wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Danach wurden die Köpfe für jeweils 1 Stunde in 30 %, 50 % und 70 % ethanolischer LR-White-Lösung (Fa. Mikrotechnik EM) infiltriert und über Nacht in 100 % Einbettmedium inkubiert. Die Aushärtung in Gelatine kapseln erfolgte bei 4 °C unter UV-Licht für 2-3 Tage.

Die Immunogoldmarkierung der Ultradünnschnitte erfolgte nach BENTROP *et al.* (1997). Der primäre Antikörper anti-DmRh1 wurde in einer 1 : 20 Verdünnung verwendet. Der sekundäre goldmarkierte Antikörper GAR („Goat Anti Rabbit“, Fa. Nanoprobes) wurde in einer 1 : 150 Verdünnung eingesetzt. Die Silberverstärkung wurde nach (DANSCHER *et al.*, 1981) durchgeführt und die Schnittkontrastierung erfolgte für 5 Minuten in 2 % Uranylacetat. Für die elektronenmikroskopische Auswertung der Präparate wurde ein Elektronenmikroskop der Fa. Zeiss (Leo EM 912Ω) eingesetzt.

## **3.6 Biochemische, elektrophysiologische und spektralphotometrische Methoden**

### **3.6.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinextrakten nach der Größe der Proteine wurde mit Hilfe der SDS-PAGE, einer vertikalen Flachbettgelelektrophorese, durchgeführt. Es wurde ein diskontinuierliches Puffersystem (Sammelgelpuffer pH 6,8, Trenngelpuffer pH 8,8, Laufpuffer pH 8,3) verwendet. Die eingesetzten Gele bestanden aus einem Trenngel mit 12 %iger Acrylamidkonzentration und einem Sammelgel mit 6 %iger Acrylamidkonzentration. Die Trenngele wurden nach dem Gießen mit Ethanol überschichtet und für 15–20 Minuten bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Nach Entfernen des

Ethanol und Einsetzten eines Kammes wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und für ebenfalls 15–20 Minuten auspolymerisiert. Die Mischung der Gele wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

- Trenngel: 12 % Acrylamid, 0,3 % Bisacrylamid, 0,375 M Tris/Cl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,075 % TEMED;
- Sammelgel: 6 % Acrylamid, 0,15 % Bisacrylamid, 0,125 M Tris/Cl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,075 % TEMED

Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm, die Trenndistanz belief sich auf circa 5 cm und die Lauflänge durch das Sammelgel etwa 0,5 cm. Die Elektrophorese wurde mit der Elektrophorese-Einheit der Fa. Pharmacia (2050 Midget) unternommen.

Vor dem Probenauftrag wurde der Proteinextrakt mit 1/5 Volumen 5x Probenpuffer für SDS-PAGE und 1/5 Volumen Ladepuffer für SDS-PAGE versetzt. Nach dem Auftrag der Proben wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA bei Raumtemperatur durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront den untern Rand des Trenngels erreichte.

Danach wurden die Gele der Elektrophoreseapparatur entnommen und für 20–30 Minuten in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Serva Blue R, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Daran schloss sich eine 1–12 stündige Entfärbung in 10 % Methanol und 20 % Essigsäure in *A. bidest* an. Die Gele wurden abschließend mit dem „BioCapt“ Geldokumentationssystem (Fa. LTF Labortechnik) ausgewertet.

#### **3.6.2 Western Blot**

Nach Auftrennung der Proteine mittels der SDS-PAGE wurden diese im elektrischen Feld mit einer Semi-Dry-Blotapparatur (Trans Blot SD Cell, Fa. BioRad) von dem Acrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Fa. BioRad) transferiert. Dazu wurden das Gel und die Membran 5 Minuten in Bolt-puffer (40 mM Tris/Cl pH 8,0, 20 % Methanol, 0,1 % SDS) äquilibriert. Die Membran wurde zuvor mit reinem Methanol benetzt. Der Aufbau des Blotsandwiches wurde

gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Blot wurde für 65 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  durchgeführt. Nach dem Elektrot blot wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (5 % Skim Milk in TBS (50 mM Tris/Cl pH 7,3, 150 mM NaCl)) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte eine Übernacht-Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 ml Blockierungslösung. Die verschiedenen Antikörper wurden hierbei in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, welche in Abschnitt 3.1.6 angegeben sind. Nach dreimaligen Waschen für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml TBS wurde die Membran für 1 Stunde mit Protein A/Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer Verdünnung 1 : 1000 inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran und anschließender Äquilibrierung in 50 ml Äquilibrierungspuffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) erfolgte die Detektion durch Zugabe von NBT und BCIP (0,03 % NBT, 0,15 % BCIP in Äquilibrierungslösung). Die Reaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität durch Waschen des Blotes in *A.bidest* gestoppt.

Zur Detektion geringer Proteinmengen wurde eine empfindlichere Detektionsmethode verwendet. Hierzu wurde nach der Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase und dem dreimaligen Waschen des Blots wie folgt verfahren: Nach der Äquilibrierung des Blots in 50 ml 100 mM Tris pH 9,5/100 mM NaCl für 2 Minuten, wurde der Blot für 5 min mit CDP-Star (1 : 50 verdünnt in Äquilibrierungslösung) inkubiert und anschließend zwischen zwei Filterpapieren kurz getrocknet. Anschließend wurde der Blot in Frischhaltefolie eingeschweißt und für 30–60 Minuten zum Ruhen ins Dunkel gelegt. Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen (X-OMAT AR, Fa. Kodak), welche zwischen 20 Sekunden und 2 Minuten exponiert wurden.

#### **3.6.3 Färbung von PVDF-Membranen mit Amidoschwarz**

Um Proteinmuster auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen, wurden die Membran nach dem Elektrottransfer für 1 Minute in 0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol,

10 % Essigsäure angefärbt. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in 25 % Methanol, 10 % Essigsäure gelegt, um die Hintergrundfärbung zu entfernen.

#### **3.6.4 Proteinphosphorylierung in Augenhomogenaten zum Nachweis der Rh1-Opsin-Phosphorylierung**

Augen-Kappen-Präparate von 50 *Drosophila*-Köpfen wurden im Rot-Licht für 30 Sekunden mit einem Plastik-Stempel in 22  $\mu$ l HBS, pH 6,2 (5 mM Hepes, 115 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) homogenisiert. Nach der Abnahme des Homogenates ohne Chitinteile zu überführen, wurden 22  $\mu$ l Phosphorylierungsmix (0,55  $\mu$ Ci/ $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, >5000 Ci/mmol), 2,5 mM ATP, 1 mM Ouabain, 5  $\mu$ M NaVO<sub>3</sub> in HBS, pH 6,2) zugesetzt, worauf eine Aufteilung in zwei 18  $\mu$ l-Aliquots erfolgte. Ein Aliquot wurde für 4 Minuten rot (P), das andere für 4 Minuten blau (M) belichtet. Beide Proben wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Dunkeldose unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Stopplösung (0,1 M EDTA in HBS) wurden die Proben zentrifugiert (15800 x g, 3 Minuten, 4 °C). Um das jeweilige Pellet zu waschen, wurde es in 1 ml HBS, pH 6,2 resuspendiert und anschließend zentrifugiert (15800 x g, 1 Minute, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Pellets in jeweils 10  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer extrahiert. Die Proben wurden mittels der SDS-PAGE aufgetrennt und die in die Proteine eingebauten Phosphatreste detektiert. Hierzu wurde ein Bio-Imaging Analyzer (BAS1000 MacBAS, Fa. Fuji Photo Film) entsprechend der Anleitung des Herstellers (Operation Manual) verwendet.

Zur Überprüfung der jeweils eingesetzten Phosphatmenge wurden 10  $\mu$ l der Stopplösung abgenommen und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die enthaltene Radioaktivität wurde dann am Szintillator gemessen.

Zum Nachweis der pro Probe eingesetzten Opsinmenge wurde 1  $\mu$ l des SDS-Extraktes abgenommen. Es erfolgte eine Auftrennung durch die SDS-PAGE und ein Transfer auf eine PVDF-Membran. Der Opsingehalt wurde nachfolgend mittels eines anti-DmRh1-Antiserums nachgewiesen.

#### 3.6.5 Proteinphosphorylierung in Augenhomogenaten zum Nachweis der Rh2-Rh6-Opsin-Phosphorylierung

Für den Nachweis der Opsinphosphorylierung der ektopisch exprimierten Opsine Rh2–Rh6 wurde die Vorgehensweise des Abschnittes 3.6.4 angewandt. Einige Änderungen ergaben sich in der Handhabung der Fliegen und der hergestellten Membranextrakte, da sich die Rhodopsine Rh2–Rh6 in ihren Absorptionseigenschaften untereinander und zum Rh1-Rhodopsin unterscheiden. So weisen sie unterschiedliche Absorptionsmaxima auf. Das Rh1-Rhodopsin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 480 nm und das Rh2-Rhodopsin ein Absorptionsmaximum bei 420 nm (HUBER *et al.*, 1997). Das Rh3- und das Rh4-Rhodopsin zeigen ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei Wellenlängen von 331 nm (Rh3) und 355 nm (Rh4), Rh5 und Rh6 absorbieren blaues (442 nm) bzw. grünes (515 nm) Licht maximal. Die Spektren der Metarhodopsine sind gegenüber den Rhodopsinspektren in langwelligere Bereiche verschoben, mit Ausnahme des Rh6, bei dem Metarhodopsin kurzwelliger absorbiert als Rhodopsin. Aufgrund dieser unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der einzelnen Rhodopsine musste für dieses Experiment Licht unterschiedlicher Wellenlänge verwendet werden (siehe Tab. 3.2). Einen Tag vor der Augen-Kappen-Präparation wurden die Fliegenstämme mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge belichtet, um das Gleichgewicht vollständig auf die Seite des Rhodopsins zu verschieben (Tab. 3.2, Spalte: M→P). Die Präparation der Augen-Kappen-Präparate der verschiedenen Transformanten am folgenden Tag wurde im Licht der in der Tabelle 3.2 aufgeführten Wellenlänge (Spalte: Präparation) durchgeführt. Die Homogenate der einzelnen Präparationen wurden zur Umwandlung des Rhodopsins in Metarhodopsin mit unterschiedlichen Wellenlängen belichtet (Tab. 3.2 P→M). Die P-Membranen und die M-Membranen wurden in Licht unterschiedlicher Wellenlänge weiterbearbeitet (Tab. 3.2, Handhabung P, M).

ektopisch exprimierte Rhodopsine	M→P	Präparation	P→M	Handhabung P, M
Rh2	515 nm	515 nm	384 nm	630 nm, 630 nm
Rh3	515 nm	515 nm	344 nm	630 nm, 630 nm
Rh4	515 nm	515 nm	384 nm	630 nm, 630 nm
Rh5	560 nm	630 nm	421 nm	630 nm, 630 nm
Rh6	665 nm	665 nm	540 nm	Dunkelkammerrotlicht

Tabelle 3.2: Für den Nachweis der Rh2-Rh6-Opsin-Phosphorylierung verwendetes Licht bestimmter Wellenlängen. M→P: Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin, Präparation: Die Präparation der Augen-Kappen erfolgte unter Licht bestimmter Wellenlänge, P→M: Die Umwandlung von Rhodopsin nach Metarhodopsin erfolgte mit Licht der Wellenlänge, bei der das Absorptionsmaximum der einzelnen Rhodopsine liegt.

### 3.6.6 Lichtabhängige Bindung von Arrestin2 in Kopfhomogenaten

Die verwendeten Fliegen wurden für den Nachweis der lichtabhängigen Bindung von Arrestin2 im Dunkeln aufgezogen und gehalten. Die Präparation von 100 Köpfen erfolgte in Rot-Licht auf Eis. Die Köpfe wurden in 100  $\mu$ l HBS, pH 6,2 homogenisiert und anschließend in zwei Aliquots à 40  $\mu$ l aufgeteilt. Ein Aliquot wurde für 2 Minuten rot (P) und ein Aliquot für 2 Minuten blau (M) belichtet. Um die nicht-membrangebundenen Proteine von der Membran zu waschen, wurden 2 x 1,3 ml HBS, pH 6,2 zugesetzt und die Proben jeweils zentrifugiert (15800 x g, 10 Minuten, 4°C). Nach einer Trockenzentrifugation des Pellets (15800 x g, 2 Minuten, 4°C) wurde dieses in 50  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer extrahiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Zum Nachweis im Immunoblot wurden von jeder Probe 3  $\mu$ g Protein eingesetzt.

### 3.6.7 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehalts der Proben erfolgte mit der Bicinchoninsäure-Methode (Fa. Sigma). Cu(II)-Ionen werden im alkalischen Milieu durch Peptidbindung zu Cu(I)-Ionen reduziert. Dabei ist die Menge der gebildeten Cu(I)-Ionen

direkt proportional zur Proteinmenge. Die Bicinchoninsäure geht mit Cu(I)-Ionen einen stabilen Komplex ein, der bei einer Wellenlänge von 562 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Aus diesem Grund erfolgt der Nachweis photometrisch. Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden 50  $\mu$ l Ansätze mit je 5  $\mu$ l der Proteinproben in 1x SDS-Probenpuffer hergestellt. Für die Eichkurve wurden sechs verschiedene Ansätze mit steigendem Proteingehalt angefertigt und zusätzlich eine Probe ohne Proteine, der sogenannte Nullwert, angesetzt. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Jedem dieser Ansätze wurde 1 ml Nachweisreagenz (0,08 % CuSO<sub>4</sub> in Bicinchoninsäurelösung) zugesetzt. Danach wurden die Proben geschüttelt und für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach dem anschließenden Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm gegen den Nullwert gemessen. Anhand der erstellten Eichkurve konnte nun der Proteingehalt der zu bestimmenden Proben ermittelt werden.

#### **3.6.8 Spektralphotometrische Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration**

Die Quantität an photoaktiven Rhodopsin in einem Digitonin-Extrakt wurde durch Differenz-Spektralphotometrie ermittelt. Dazu wurden die benötigten Fliegen im Dunkeln aufgezogen. Es wurden 100 *Drosophila*-Köpfe auf Eis in Rot-Licht präpariert und mit einem Plastik-Stempel je 3 x in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit Protease-Inhibitoren homogenisiert. Die Homogenate wurden ohne Chitinfragmente in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (15800 x g, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde mit 1 ml 1x PBS, pH 6,2 gewaschen und anschließend in 40  $\mu$ l Extraktionspuffer (4 % Digitonin in PBS pH 6,2) resuspendiert. Nach 15 Sekunden Belichtung mit rotem Licht wurde der Extrakt für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann abzentrifugiert (15800 x g, 10 Minuten 4 °C). Zur Abtrennung sämtlicher nicht löslicher Partikel wurde der Überstand ultrazentrifugiert (132000 x g, 10 Minuten, 4 °C). Über alle Zentrifugationsschritte wurde eine Digitoninreferenz mitgeführt. Die gewonnenen Extrakte wurden in 30  $\mu$ l-Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) gefüllt und

bei 4°C gegen reinen Extraktionspuffer als Referenzlösung in einem Uvikon Spektralphotometer 930 (Software Version 2.01-9218, Fa. Kontron) gemessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei Wellenlängen zwischen 400 nm und 700 nm. Die Probe wurde für 2 Minuten rot belichtet, worauf das Absolutspektrum des Proteinextraktes gegen die Referenzlösung aufgenommen wurde. Um eine Basislinie zu erhalten, wurde anschließend ein Differenzspektrum des Rotlicht-adaptierten Extraktes im Vergleich zum zuvor aufgenommenen Absolutspektrum gemessen. Nach 2 Minuten Blaubelichtung wurde erneut ein Differenzspektrum des Blaulicht-adaptierten Extraktes im Vergleich zum Absolutspektrum des Rotlicht-adaptierten Extraktes aufgenommen. Danach wurde das Absolutspektrum des blau belichteten Extraktes aufgezeichnet, worauf der Extrakt für 2 Minuten mit rotem Licht beleuchtet wurde. Im Anschluß daran wurde ein Differenzspektrum des blau belichteten Extraktes im Vergleich zum vorher aufgenommenen Blaulicht-adaptierten Extraktes aufgenommen.

Der Rhodopsingehalt eines Extraktes wurde folgendermaßen berechnet:

$$\left( \frac{\text{Absorption bei 580 nm}}{\text{Extinktionskoeffizient (1 cm x 72000 l cm}^{-1}\text{ mol}^{-1})} \right) \times$$
  
Volumen der Probe in  $\mu\text{l}$  / Anteil an Metarhodopsin am Gesamtrhodopsingehalt (0,69)  $\times$  1.000.000 (zur Umrechnung in pmol).

### 3.6.9 Messung von Elektroretinogrammen

Für die Messungen von Elektroretinogrammen wurden die *Drosophila*-Fliegen auf einer Bronzeplatte immobilisiert. Zur Messung des ERGs wurde eine mit Insekten-Ringer pH 7,2 (0,67% NaCl, 0,015% KCl, 0,012% CaCl<sub>2</sub>, 0,015% NaHCO<sub>3</sub>) und mit 2% Agarose gefüllte Glaselektrode unmittelbar unter die Cornea eingestochen. Eine weitere Ag/AgCl-Elektrode wurde als Referenz in den Thorax des Tieres eingesteckt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem „Smart Probe Differential Amplifier“ (AI 401, Fa. Axon Instruments, USA), der mit einem „Signal Conditioner“ CyberAmp 380, Fa. Axon Instruments, USA) verbunden war. Die Digitalisierung wurde mit einem „CED 1401 Plus A/D Converter“ (Fa. Cambridge Electronic Design Ltd.,

### 3. MATERIAL UND METHODE

---

GB) durchgeführt. Die Lichtstimuli von 5 Sekunden Dauer und 10 nm Bandbreite bei der Wellenlänge von 480 nm bzw. 580 nm wurden mittels einer 2000 Watt Xenon Lampe (Fa. Osram) und eines Monochromators (Grating Monochromator 77250-M, Fa. Oriel Instruments, USA) erzeugt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Licht-aktivierte Phosphorylierung des Opsins im Wildtyp und in der *rdgC*-Mutante von *Drosophila*

Voraussetzung für die Analyse der Funktion potenzieller Phosphorylierungsstellen in den Rhodopsinen von *Drosophila* ist der reproduzierbare Nachweis der licht-aktivierten Phosphorylierung des Rhodopsins in seinem lichtaktivierten Metarhodopsin-Zustand. In Abb. 4.1 A sind die Ergebnisse der Phosphorylierung der P-Membranen (Rotlicht exponiert) und der M-Membranen (Blaulichaktivierung) des Wildtyps und der *rdgC*-Mutante in Gegenwart von 2,5 mM  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP dargestellt. Das Proteinnmuster der SDS-PAGE (Abb. 4.1 A) zeigt, dass in allen Spuren die gleiche Menge an Proteinextrakten aufgetragen wurde. Die Autoradiographie in Abb. 4.1 B weist in den P-Membranen (Spur 1: Wildtyp, Spur 3: *rdgC*-Mutante) nur eine schwache Hintergrundphosphorylierung der Opsinbande bei 32 kDa auf. In den M-Membranen (Spur 2: Wildtyp, Spur 4: *rdgC*-Mutante) dagegen erkennt man eine deutliche Phosphorylierung der Opsinbande bei 32 kDa. In der *rdgC*-Mutante, bei der die Rhodopsin-Phosphatase defekt ist (VINÓŠ *et al.*, 1997), tritt eine stärkere Phosphorylierung im Vergleich zu Wildtyp M-Membranen auf. Es kommt also im Vergleich zum Wildtyp zu einer Hyperphosphorylierung des Opsins. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Normalerweise stellt sich bei Blaubelichtung der Membranen ein Gleichgewicht zwischen der Metarhodopsin- und der Rhodopsinform ein. Für das Rh1-Opisin beträgt dieses Gleichgewicht zum Beispiel 70 % Metarhodopsin zu 30 % Rhodopsin. Durch das Fehlen der Phosphatase in der *rdgC*-Mutante liegen jedoch nicht nur die im M-Zustand befindlichen Opsine phosphoryliert vor,

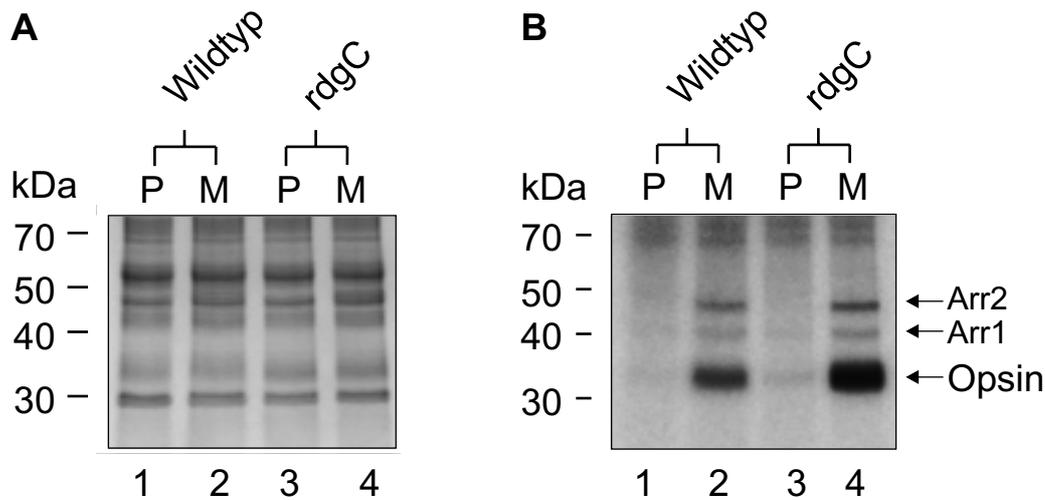


Abbildung 4.1: Lichtaktivierte Phosphorylierung des Rh1-Opsins des Wildtyps und der *rdgC*-Mutante. Je 50 Augen-Kappen wurden homogenisiert und im Standard-Phosphorylierungsansatz mit  $\gamma^{32}$ -ATP inkubiert. Durch die Belichtung mit Blaulicht (M) wurde die Phosphorylierung induziert. Die Kontrolle wurde im Dunklen (P) inkubiert. Danach erfolgte die Sedimentation der Membran, ein einmaliges Waschen und die Extraktion in 1x SDS-Probenpuffer. Die Spuren 1 und 3 in beiden Abbildungen enthalten P-Membranenextrakte. Die Spuren 2 und 4 enthalten M-Membranenextrakte. **A** Die Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Proteinmuster durch Färbung mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. **B** Autoradiographie der in A gezeigten SDS-Page zum Nachweis der lichtaktivierten Phosphorylierung des Rh1-Opsins des Wildtyps und der *rdgC*-Mutante.

sondern auch die Opsinmoleküle, die von M nach P umgewandelt wurden. Die Autoradiographie zeigt außerdem zwei weitere in den M-Membranen auftretende Banden bei 39 kDa und 49 kDa. Hierbei handelt es sich um Arrestin1 und Arrestin2. Beide Proteine werden lichtabhängig phosphoryliert und binden an die lichtaktivierten M-Membranen (Arrestin1 und 2: MATSUMOTO *et al.* (1991); SCHILLO (2001); Arrestin2: MATSUMOTO *et al.* (1994); BYK *et al.* (1993).

## 4.2 Phosphorylierung der *Drosophila*-Rhodopsine Rh1–Rh6

Alle bisherigen Arbeiten zur Rhodopsinphosphorylierung bei *Drosophila* beziehen sich auf das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Rhodopsin Rh1. Es macht ca. 90 % der im Komplexauge vorhandenen Rhodopsinmenge aus. Außer dem Rh1 Opsin, welches in den R1–6 Photorezeptorzellen exprimiert wird, lassen sich noch die Opsine Rh3–Rh6 im Komplexauge finden. Zusammen machen diese circa 10 % des

Gesamt-Rhodopsingehaltes des Komplexauges von *Drosophila* aus. In den Ocellen wird zusätzlich ein Rh2-Opisin exprimiert. Jedes der genannten Rhodopsine ist durch potenzielle Phosphorylierungsstellen, Serin- bzw. Threonin-Reste, gekennzeichnet (siehe Abb. 2.3). Der in Abb. 4.1 nachgewiesene Phosphateinbau sollte demnach die Summe der durch Blaulicht induzierten Phosphorylierung an den M-Zuständen aller Rhodopsine des *Drosophila*-Auges repräsentieren. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Phosphorylierung bei allen Rhodopsinen von *Drosophila* evolutionär konserviert ist, wurde untersucht, ob die Rhodopsine Rh2–Rh6 tatsächlich lichtabhängig phosphoryliert werden. Da wie zuvor beschrieben beim Wildtyp Rh2 nur in den Ocelli und die Rhodopsine Rh2–Rh6 nur in wenigen Zellen des Komplexauges exprimiert werden, wurden diese Experimente an Fliegen durchgeführt, die jeweils eines der Rhodopsine unter dem Rh1-Promotor ektopisch exprimieren. Die ektopisch exprimierten Rhodopsine liegen dann in einer wesentlich größeren Menge vor (bis zu 92,5%), da das jeweilige Rhodopsin in den großen R1–R6 Zellen des Komplexauges exprimiert wird.

Es wurden Phosphorylierungsexperimente nach dem Standardprotokoll durchgeführt (siehe 3.6.4). Da bekannt ist, dass sich die einzelnen Rhodopsine in ihren Absorptionsmaxima unterscheiden, wurden die verschiedenen Fliegentransformanten, die die einzelnen Rhodopsine ektopisch exprimieren, einen Tag vor Beginn des Experimentes mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge belichtet. Dabei wurden Wellenlängen eingesetzt, die gewährleisten, dass das Gleichgewicht komplett auf die Seite des Rhodopsins verschoben wurde. Die Augen-Kappen der einzelnen Transformanten wurden am Tag darauf unter Licht unterschiedlicher Wellenlänge präpariert und die Umwandlung des Rhodopsins in Metarhodopsin mit Licht verschiedener Wellenlänge induziert (siehe 3.6.5).

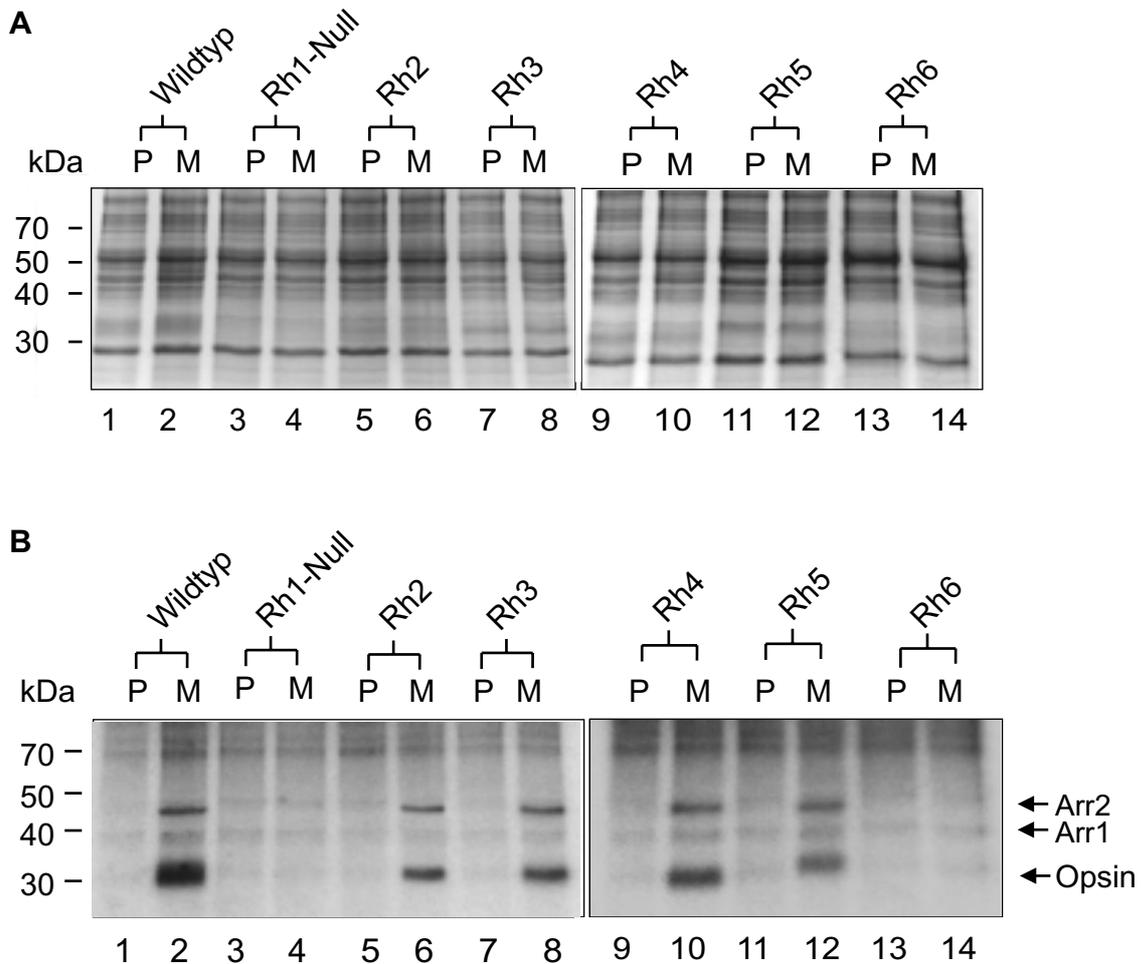


Abbildung 4.2: **Lichtaktivierte Phosphorylierung des Rh1-Opsins und der ektopisch exprimierten Rh2–Rh6-Opsine.** Augen-Kappen-Präparate wurden homogenisiert und mit radioaktiv markiertem ATP angereichert. Nach der Induktion der Phosphorylierung durch Belichtung der Membranen mit Blaulicht (M) oder Inkubation der Kontrolle im Dunkeln (P) wurden die Membranen sedimentiert, gewaschen und in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Aufgetragen wurden Membranextrakte von je 50 Augen. Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 P-Membranen, Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 M-Membranen. **A** Auftrennung von Proteinextrakten aus Augen-Kappen-Präparaten, **B** Autoradiographie der in A gezeigten SDS-Page zum Nachweis der lichtaktivierten Phosphorylierung der Rh1- bis Rh6-Opsine.

Die Phosphorylierung des Opsins in P-Membranen und M-Membranen wurde anhand von Autoradiographien ermittelt. Das Proteinmuster in der Abb. 4.2 A zeigt, dass alle Proben in Bezug auf die Proteinmengen, die aus den rot- und blaubezeichneten Membranen extrahiert wurden, weitgehend gleich waren. In der Abb. 4.2 B (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13) sind die Extrakte der P-Membranen der jeweiligen Fliegenstämme aufgetragen. Nach der Autoradiographie liegt Opsin (32 kDa) in P-Membranen nicht phosphoryliert vor. Dagegen ist in M-Membranen (Abb. 4.2 B, Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14) deutlich eine Phosphorylierung des Opsins bei allen Fliegenstämmen nachweisbar. Der Phosphateinbau ist in den einzelnen Proben etwas unterschiedlich, wobei das Phosphorylierungssignal des Wildtyps am stärksten ist. Die Unterschiede in den Phosphorylierungssignalen können zum einen darauf zurückgeführt werden, dass die Opsinexpression in den einzelnen Mutanten nicht gleich ist, was sich auf die ektopische Expression der verschiedenen Rhodopsine zurückführen lässt. Zum anderen stellen sich bei den einzelnen Rhodopsinen verschiedene Gleichgewichte zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin ein, da sich die Absorptionsspektren des Rhodopsins und des Metarhodopsins unterschiedlich überlappen. Dadurch kann es ebenfalls zu Unterschieden in den Phosphorylierungssignalen kommen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der lichtaktivierten Phosphorylierung der Opsine von *Drosophila*, dass alle sechs Rhodopsine nach der Umwandlung von Rhodopsin zu Metarhodopsin phosphoryliert werden.

### 4.3 Herstellung und Charakterisierung von Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten

G-Protein gekoppelte Rezeptoren, so auch das Rh1 Opsin von *Drosophila*, weisen im C-terminalen Bereich des sieben-transmembranären Proteins potenzielle Phosphorylierungsstellen auf. Im Gegensatz zu dem Vertebraten-Opsin ist vom *Drosophila*-Rh1 weder bekannt, welche der sechs potenziellen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert werden, noch welcher oder welchen der möglichen Phosphorylierungsstellen eine funktionelle Bedeutung zukommt. Um diese Fragen zu klären, wurden sechs Mutan-

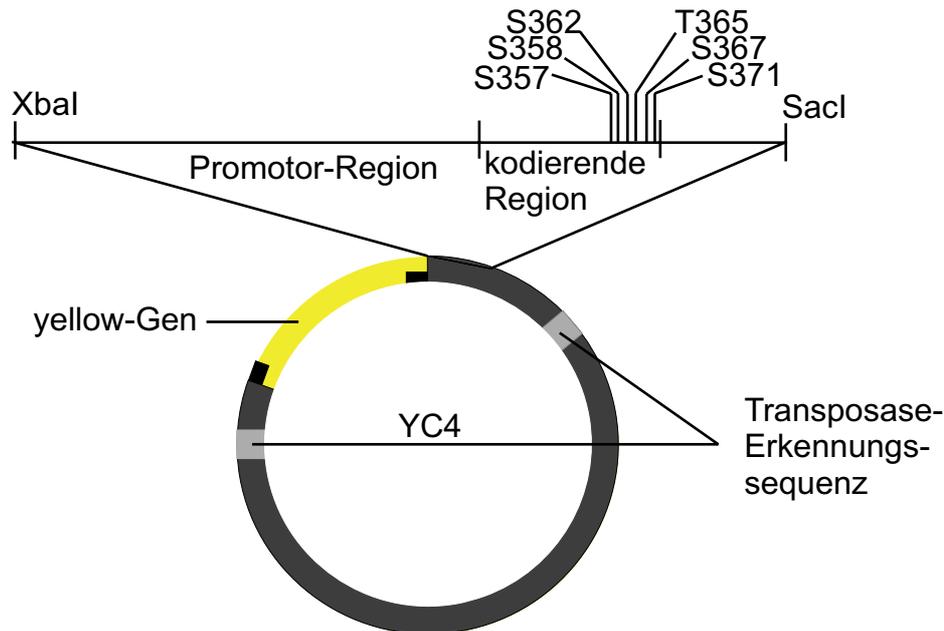


Abbildung 4.3: **Schematische Darstellung des YC4 Vektors mit dem integrierten *Rh1*-Rhodopsin.** Die Positionen der Kodons für die sechs potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Proteins sind farblich herausgehoben. Es wurden Punktmutationen eingeführt mit dem Ziel, dass auf Proteinebene jeweils eine der sechs Stellen gegen ein Alanin ausgetauscht wird: S357→A, S358→A, S362→A, T365→A, S367→A und S371→A.

ten hergestellt, bei denen jeweils eines der fünf Serine bzw. ein Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Die Mutanten wurden biochemisch, spektralphotometrisch, immunocytochemisch und elektrophysiologisch analysiert.

#### 4.3.1 Herstellung von sechs *Rh1*-Phosphorylierungs-Mutanten

Alle transgenen Fliegen wurden durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation hergestellt. Das in die Fliegen-Embryonen injizierte Konstrukt ist schematisch in der Abb. 4.3 dargestellt. Die sechs im C-terminalen Bereich des *Rh1*-Gens vorkommenden potenziellen Phosphorylierungsstellen sind besonders gekennzeichnet. Die durch *in vitro*-Mutagenese veränderte *Rh1*-DNA weist Mutationen in den entsprechenden Kodons auf, um einzelne Mutanten herstellen zu können, bei denen jeweils ein Serin (Position S357, S358, S362, S367 oder S371) oder das Threonin (Position 365) gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht ist. Die verschiedenen Konstrukte wurden in Embryonen der *ninaE*-Mutante injiziert, bei der das endo-

Plasmid-DNA	injizierte Embryonen	geschlüpfte Larven	adulte Fliegen	transgene Linien
YC4Rh1 S357A	409	111 (27,1 %)	32 (28,8 %)	2 (0,49 %)
YC4Rh1 S358A	886	265 (29,4 %)	84 (31,7 %)	6 (0,67 %)
YC4Rh1 S362A	835	185 (22,0 %)	50 (27,0 %)	7 (0,84 %)
YC4Rh1 T365A	731	343 (46,9 %)	136 (39,7 %)	14 (1,9 %)
YC4Rh1 S367A	439	178 (44,5 %)	98 (55,1 %)	12 (2,7 %)
YC4Rh1 S371A	467	250 (53,5 %)	119 (25,5 %)	20 (4,3 %)

Tabelle 4.1: **Anzahl der pro Mutation injizierten Eier und Angaben über die Weiterentwicklung der Eier und über die Zahl der erhaltenen transgenen Linien.** Spalte geschlüpfte Larven: der Wert in Klammern bezieht sich jeweils auf Gesamtzahl der Eier, Spalte adulte Fliegen: der Wert in Klammern bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der Larven, Spalte Transgene Linie: der Wert in Klammern bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der Eier.

gene *Rh1*-Gen durch eine Deletion eliminiert ist. Auf diese Weise wurden durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation für jede Mutation transgene Linien hergestellt (siehe Tab. 4.1).

Für die Konstrukte Rh1 S357A und Rh1 S367A wurde beim ersten Injektionsversuch nur je eine transgene Linie erzeugt, die anschließend homozygot gekreuzt wurde. Für alle anderen Konstrukte wurden mindestens zwei homozygote transgene Linien hergestellt. In weiteren Transformationsexperimenten konnten auch für die Konstrukte Rh1 S357A und Rh1 S367A weitere transgene Linien hergestellt werden. Durch Kreuzung wurden homozygote Linien erzeugt, die weiteren Analysen unterzogen wurden.

#### 4.3.2 Nachweis der Expression der mutierten Rhodopsine auf der Transkriptionsebene

Um die korrekte Transkription des jeweils ins Genom der *ninaE*-Mutante eingebrachten mutierten *Rh1*-Gens nachzuweisen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 4.4). Beim Wildtyp (Spur 1), und den Phosphorylierungs-Mutanten Rh1 S357A (Spur 3), Rh1 S358A (Spur 4), Rh1 S362A (Spur 5), Rh1 T365A

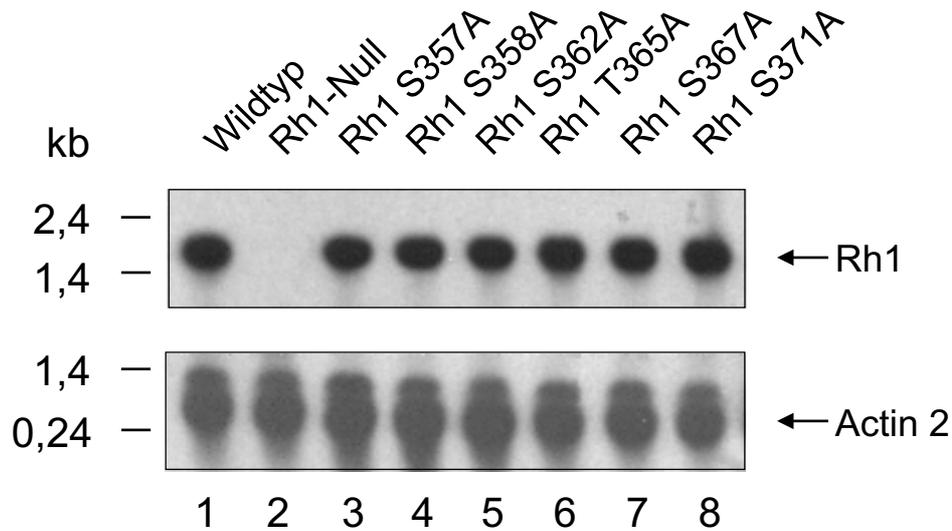


Abbildung 4.4: **Expression von Rh1 mRNA im Wildtyp und in Rh1-Phosphorylierungsmutanten.** Die Gesamt-RNA aus Fliegenköpfen wurde auf einem 1% Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt, die RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde wurde Digoxigenin-markierte „anti-sense“-cRNA verwendet. Pro Spur wurden für den Blot im oberen Teil der Abbildung jeweils  $3\ \mu\text{g}$  RNA aufgetragen. Als Sonde wurde „anti-sense“-Rh1-cRNA verwendet. Für den Blot im unteren Teil der Abbildung wurde jeweils  $1\ \mu\text{g}$  RNA aufgetragen, die auf die Nylonmembran transferierte RNA wurde mit einer „anti-sense“-Actin-cRNA inkubiert. (n=3)

(Spur 6), Rh1 S367A (Spur 7) und Rh1 S371A (Spur 8) konnte jeweils eine 1,5 kb lange mRNA detektiert werden, bei der es sich um die Rh1-mRNA handelt. Aussagen über die quantitative Expression der mRNA einzelner Phosphorylierungs-Mutanten lassen sich auf Basis der gewählten Northern Blot-Analyse nicht treffen, da es sich um eine qualitative Northern Blot-Analyse handelt. Als negative Kontrolle wurde in Spur 2 die aus der *ninaE*-Mutante gewonnene Gesamt-RNA aufgetragen, bei der, wie erwartet, kein Signal zu erkennen ist.

Zur Kontrolle der Menge und der Intaktheit der pro Probe eingesetzten Gesamt-RNA wurden weitere Northern-Blot-Analysen durchgeführt, auf denen ein ubiquitär exprimierendes Gen, das Actin, nachgewiesen wurde. Durch Actin-Blots (Abb. 4.4, unten) konnte gezeigt werden, dass in allen acht Spuren annähernd gleiche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden. Aus den Northern Blot-Analysen lässt sich ableiten, dass die Transkription der Rhodopsingene weder durch die eingeführten

Mutationen noch durch die chromosomale Lokalisation der Transgene beeinflusst wird.

### 4.3.3 Expression der mutierten Rhodopsine in den Phosphorylierungs-Mutanten

Auf Proteinebene wurde die korrekte Expression der durch P-Element vermittelten Keimbahntransformation eingebrachten, mutierten *Rh1*-Gene zunächst mit Hilfe der Western-Blot-Analyse überprüft. Anhand der Ausbildung der „tiefen Pseudopupille“, einer nicht-invasiven Methode, wurde geprüft, ob die mutierten Rhodopsine korrekt in der rhabdomerischen Membran eingebaut werden. Danach wurde die Lokalisation mutierter Rhodopsine an ausgewählten Mutanten auf elektronenmikroskopischer Ebene nachgewiesen. Durch spektralphotometrische Messungen wurde anschließend untersucht, ob die mutierten Rhodopsine auf Belichtung die für Rh1 typische P-M-Umwandlung zeigen. Des Weiteren lässt sich mit dieser Methode nun die Rhodopsinmenge berechnen und es lassen sich auch die spektralen Eigenschaften der mutierten Rhodopsine untersuchen.

#### 4.3.3.1 Nachweis des Opsins auf der Translationsebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass von allen Mutanten die zu erwartenden Transkripte des jeweils mutierten *Rh1*-Gens gebildet wurden, war zu prüfen in wieweit die synthetisierte Opsinmenge in den einzelnen Mutanten mit der im Wildtyp gebildeten Menge übereinstimmt. Zum Nachweis wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 4.5 dargestellt sind. Der Immunoblot zeigt in der Spur 2 die im Wildtyp synthetisierte Opsinmenge und in den Spuren 3 bis 8 die von der jeweiligen Mutante hergestellte Opsinmenge.

Die Molekulargewichte der Mutanten-Opsine entsprechen exakt dem des Wildtyp-Opsins (32 kDa, Spur 2). Die Rh1-Null-Mutante (Spur 1) weist, wie zu erwarten, keine Opsin-Bande auf, da das intragenische *Rh1*-Gen bei dieser Mutante zerstört ist. Obwohl es sich nicht um einen quantitativen Immunoblot handelt, lässt sich dennoch aus der Markierung schließen, dass die Mutanten Rh1 S357A (Spur 3) und Rh1

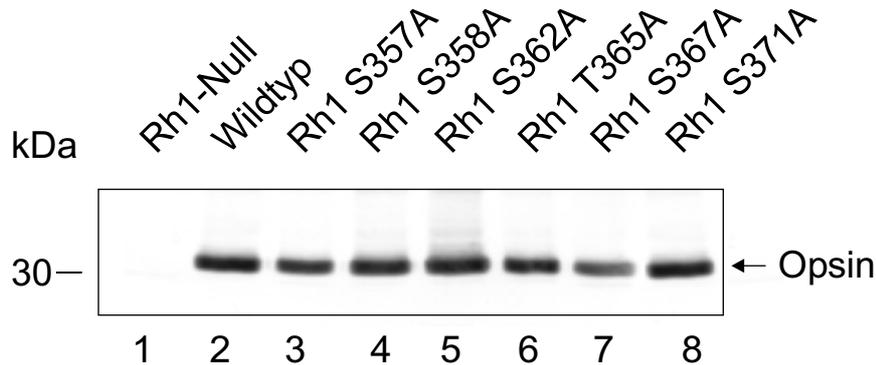


Abbildung 4.5: **Rh1-Opsin-Nachweis in Wildtyp und in Phosphorylierungs-Mutanten mittels eines Immunoblots.** Für den Opsin-Immunoblot wurden pro Spur  $12 \mu\text{g}$  Protein des jeweiligen aus Augen-Kappen hergestellten Proteinextraktes eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem anti-Rh1(1.2.2)-Antikörper.

S367A (Spur 7) eine geringere Menge Opsin synthetisieren als der Wildtyp (Spur 2). Die Rh1 S362A-Mutante (Spur 5) dagegen bildet im Vergleich mit dem Wildtyp eine höhere Opsinmenge. Die Western-Blot-Analyse zeigt zusammenfassend, dass die mutierten Opsine vollständig durch die jeweils eingebrachten Transgene kodiert, transkribiert, und auch translatiert werden.

#### 4.3.3.2 Nachweis der Pseudopupille

Mit Hilfe der „tiefen Pseudopupille“ wurde untersucht, ob die mutierten Rhodopsine in die rhabdomerische Membran integriert werden. Bei der „tiefen Pseudopupille“ handelt es sich um die Überlagerung virtueller Bilder von den distalen Enden der Rhabdomere von ungefähr sieben Ommatidien, die in die optische Achse des Mikroskops blicken. Hierdurch entsteht ein virtuell vergrößertes Bild von der Rhabdomerenanordnung innerhalb eines Ommatidiums (FRANCHESCHINI *et al.*, 1972). Die „tiefe Pseudopupille“ ist nur dann sichtbar, wenn die Rhabdomere korrekt ausgebildet sind, was bei einer durch Rhodopsinmangel verursachten Degeneration nicht der Fall ist. Das Bild der Rhabdomerenanordnung in der Pseudopupille beruht auf der Lichtabsorption des in die rhabdomerischen Membranen eingelagerten Rhodopsins. Je dunkler das Bild der Rhabdomere in der Pseudopupille ist, desto mehr Rhodopsin ist in die rhabdomerische Membran der einzelnen Photorezeptorzellen integriert.

Der Wildtyp in Abb. 4.6 A weist wie alle untersuchten Phosphorylierungsmutanten (B-G) eine tiefe Pseudopupille auf. Bei der Rh1-Null-Mutante (H) lässt sich dagegen keine tiefe Pseudopupille nachweisen, da ihr das Rh1-Opsins fehlt und schon kurze Zeit nach dem Schlüpfen eine retinale Degeneration einsetzt. Das führt zum Abbau der rhabdomerischen Membranen und somit zum Verschwinden der Pseudopupille. Die Degeneration wird vermutlich durch den Ausfall der strukturerhaltenden Eigenschaften des Opsins hervorgerufen (FRANCHESCHINI *et al.*, 1972).

Bei den untersuchten Mutanten fällt auf, dass in der Rh1 S357A-Mutante (B) und in der Rh1 S367A-Mutante (F) die Pseudopupille im Vergleich zu den übrigen Mutanten und dem Wildtyp wesentlich schwächer ausgeprägt ist (A). Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Mutanten einen geringeren Gehalt an Rhodopsin in den Rhabdomeren aufweisen. Die Rh1 S362A-Mutante (D) zeigt dagegen im Vergleich zum Wildtyp eine stärker ausgeprägte Pseudopupille. Der Schluss liegt nahe, dass diese Mutante eine etwas höhere Menge an Rhodopsin exprimiert bzw. in die rhabdomerische Membran integriert hat. Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Transport des Rhodopsins zur Membran und die Lokalisation des Rhodopsins in der Membran korrekt ablaufen. Um nun genauere Aussagen über die zelluläre Verteilung des Rhodopsins treffen zu können, wurden ausgewählte Mutanten auf immuncytochemischer Ebene untersucht.

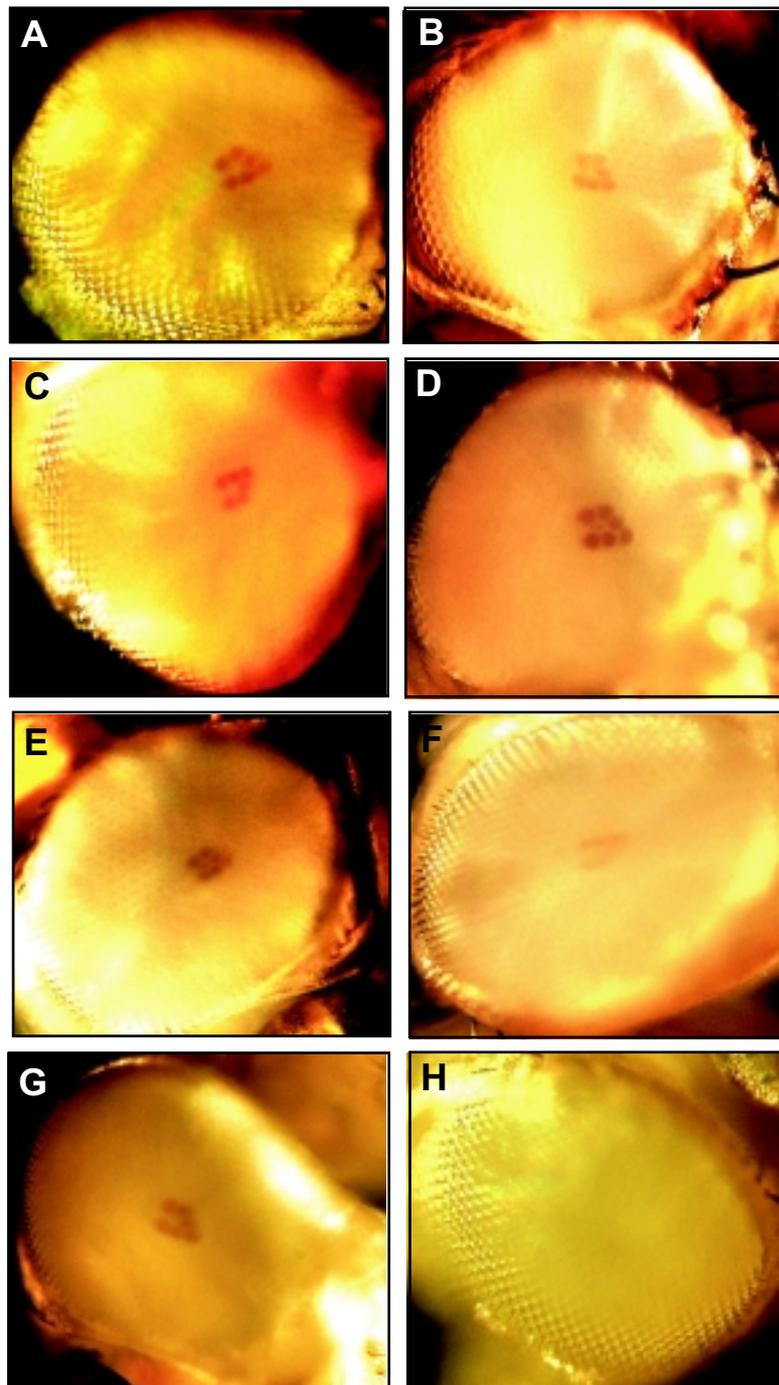


Abbildung 4.6: **Tiefe Pseudopupille von Wildtyp-Fliegen und Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten.** Die tiefe Pseudopupille ist ein Maß für die Intaktheit der Rhabdomere und für die korrekte Expression und Lokalisation von Rhodopsin. Es wurden Fliegen verwendet, die vor dem Betrachten der tiefen Pseudopupille für 3 Tage im Dunkeln gehalten worden waren. **A** Wildtyp, **B** Rh1 S357A-Mutante, **C** Rh1 S358A-Mutante, **D** Rh1 S362A-Mutante, **E** Rh1 T365A-Mutante, **F** Rh1 S367A-Mutante, **G** Rh1 S371A-Mutante, **H** Rh1-Null-Mutante. Abgebildet ist eine repräsentative Aufnahme von je vier untersuchten Tieren pro Mutante.

#### 4.3.3.3 Immuncytochemische Lokalisation der mutierten Rh1-Opsine

Mit dem Ziel das Opsin genauer lokalisieren zu können, wurden die mutierten Rh1-Opsine ausgewählter Mutanten auf immuncytochemischer Ebene untersucht. Dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtyps und der transgenen Phosphorylierungsmutanten Rh1S362A, Rh1 T365A und Rh1 S367A angefertigt. Das Rh1-Opsin wurde durch Immunogold-Markierung visualisiert, wobei die Gold-Markierungen in der Abb. 4.7 durch einen durch Silberverstärkung erzeugten Kontrast erkennbar wird. Die für die Immuncytochemie verwendeten Querschnitte wurden auf der Ebene der R7-Zelle angefertigt.

Wie die Abb. 4.7 zeigt, bleibt die Immunogold-Markierung auf die R1–6-Zellen beschränkt. In der R7-Zelle, in der entweder das Rh3- oder das Rh4-Opsin in der rhabdomerischen Membran integriert vorliegt, ist keine Immunogold-Markierung nachweisbar. Dies zeigt, dass nur in R1-R6 Zellen das Rh1-Opsin transkribiert, translatiert und in die rhabdomerische Membran eingebaut wird. Anhand von Abb. 4.7 lässt sich auch die Aussage treffen, dass das Opsin der jeweils untersuchten Phosphorylierungs-Mutante in den rhabdomerischen Membranen lokalisiert ist. Dabei zeigt die Rh1 S367A-Mutante (Abb. D) eine wesentlich schwächere Markierung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. A). Die Rh1 S362A-Mutante (Abb. B) und die Rh1 T365A-Mutante (Abb. C) weisen eine ähnlich starke Opsin-Markierung wie der Wildtyp (Abb. A) auf. Des weiteren ist nur eine geringe Markierung in den Organellen des Wildtyps (Abb. A) bzw. der Mutanten (Abb. B-D) sichtbar. Dies legt den Schluß nahe, dass die Mutation der C-terminalen Phosphorylierungsstellen des Rh1 keinen Einfluss auf den korrekten Transport des Rhodopsins in die rhabdomerischen Membranen hat.

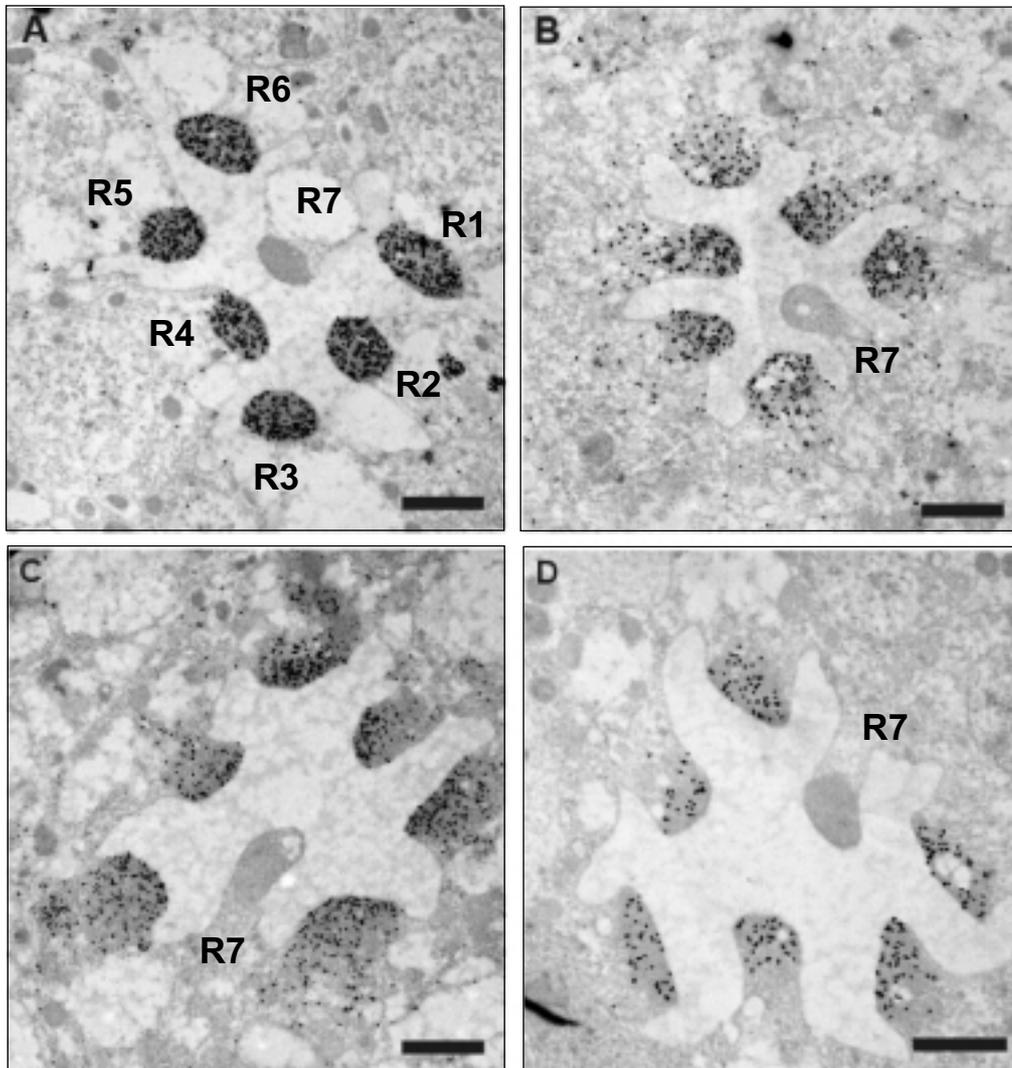


Abbildung 4.7: **Immuncytologische Lokalisation des Rh1-Opsins in Wildtyp und Rh1-Phosphorylierungsmutanten.** Komplexaugen des Wildtyps oder der Rh1-Mutanten wurden einen Tag nach dem Schlüpfen der Fliegen auf der R7-Ebene querschnitten. Die Bindung des gegen Rh1 gerichteten Antikörpers wurde durch Silber-verstärkte Immunogold Markierung nachgewiesen. Die Lokalisation kontrastreicher Partikel, als Ergebnis der verstärkten Immunogold Markierung finden sich insbesondere im Bereich der rhabdomerischen Mikrovilli der R1-Photorezeptoren. Die Expression der mutierten Rhodopsine ist auf die R1- bis R6-Zellen beschränkt. **A** Wildtyp, **B** Rh1 S362A-Mutante, **C** Rh1 T365A-Mutante, **D** Rh1 S367A-Mutante. Der Maßstrich entspricht 2  $\mu\text{m}$ . Die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise von Dr. K. Schwab zur Verfügung gestellt.

#### 4.3.3.4 Spektrale Eigenschaften der mutierten Rhodopsine

Um detailliertere Aussagen über die in den verschiedenen Mutanten enthaltene Rhodopsin-Menge treffen zu können, wurde Rhodopsin aus Augen der erhaltenen mutagenen Linien extrahiert und mittels Differenz-Spektralphotometrie wie von Paulsen (1984) beschrieben analysiert. Die Rhodopsinmenge wurde aus der Absorptionsdifferenz bei der Wellenlänge 565 nm zwischen rot- und blaubelichteten Digitoninextrakten mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die in den C-Terminus eingebrachten Mutationen keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Rhodopsins ausüben, da diese durch Interaktion des Chromophors mit den Transmembran-Helices bestimmt werden. Für die Berechnung der in einem Auge enthaltenen Rhodopsinmenge wurde der molare Extinktionskoeffizient des Metarhodopsins ( $72000 \text{ l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , STAVENGA (1984)) des Rh1 verwendet.

In Abb. 4.8 wird die Rhodopsinkonzentration des Wildtyps und einzelner untersuchter Phosphorylierungs-Mutanten als Balkendiagramm dargestellt. Für ein Wildtyp-Auge wurde eine Rhodopsinkonzentration von 400 fmol berechnet. Die beiden Mutanten Rh1 S357A und Rh1 S367A weisen eine deutlich verringerte Rhodopsinkonzentration im Vergleich zum Wildtyp auf. Beide zeigen einen um etwa 50 % reduzierten Rhodopsingehalt (Rh1 S357A-Mutante: 52 %, Rh1 S367A-Mutante: 48 %). Bei den Mutanten Rh1 S358A und Rh1 T365A wurden ungefähr 85 % der Rhodopsinmenge des Wildtyps im Komplexauge gefunden. Bei der Mutante Rh1 S371A ist die Rhodopsinmenge nahezu identisch zum Wildtyp (Rh1 S371A-Mutante: 95 %). Eine der Mutanten (Rh1 S362A) weist jedoch mit 120 % eine leichte Erhöhung des Rhodopsingehaltes im Vergleich zum Wildtyp auf.

Für die Mutanten Rh1 S357A und Rh1 S367A wurde für je eine zusätzliche Linie der Rhodopsingehalt bestimmt und mit dem vorliegenden Ergebnis verglichen. In Abb. 4.9 ist der absolute Rhodopsingehalt der weiteren untersuchten Linien in einem Diagramm dargestellt. Vergleicht man den Rhodopsingehalt des Wildtyps mit diesen

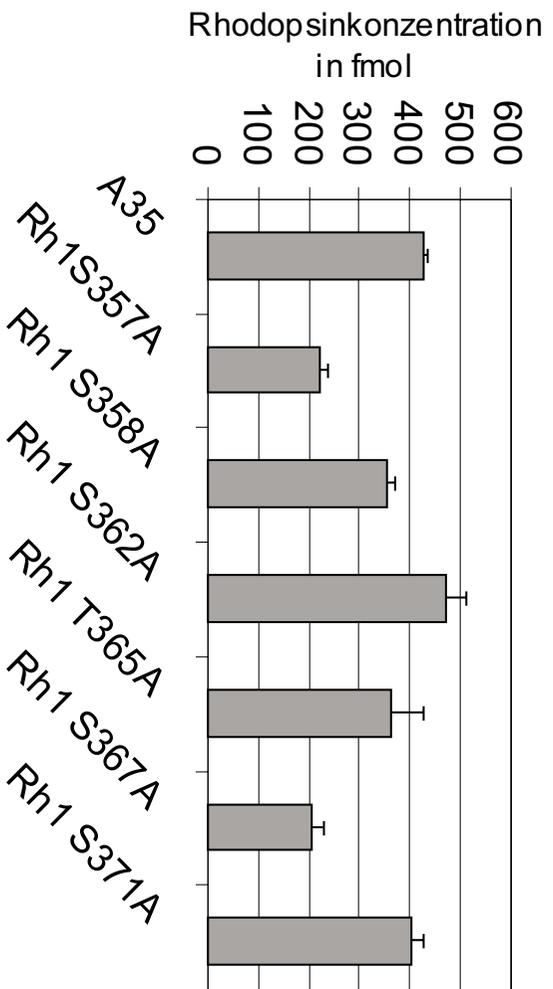


Abbildung 4.8: Absoluter Rh1-Rhodopsingehalt des Wildtyps und der hergestellten Phosphorylierungs-Mutanten. Von je 150 I-3 Tage alten Wildtyp-Fliegen und Phosphorylierungsmutanten wurde die Rhodopsinkonzentration in den Augennembranen bestimmt. Abgebildet ist der absolute Rhodopsingehalt pro Retina. Die Bestimmung der Rhodopsingehalte aus Digitonin-Extrakten von jeweils 150 Fliegenköpfen erfolgte durch Differenzspektralphotometrie. (n=4)

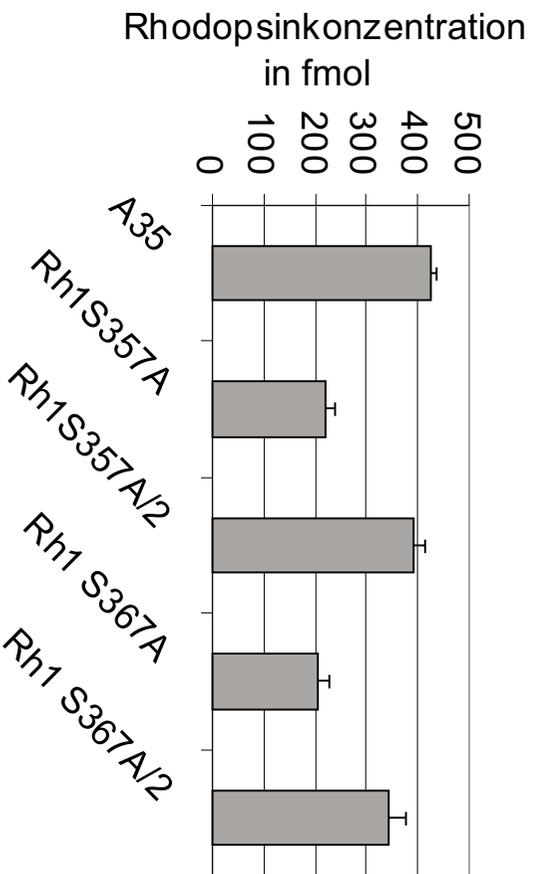


Abbildung 4.9: Absoluter Rh1-Rhodopsingehalt des Wildtyps der Mutanten Rh1 S357A und Rh1 S367A. Von je 150 I-3 Tage alten Wildtyp-Fliegen und Phosphorylierungsmutanten wurde der Rhodopsingehalt in den Augennembranen bestimmt. Abgebildet ist der berechnete absolute Rhodopsingehalt pro Auge. Die Bestimmung der Rhodopsinmenge aus Digitonin-Extrakten von jeweils 150 Fliegenköpfen erfolgte über photometrische Bestimmung der Differenzspektren. Es wurden von der Rh1 S357A-Mutante und der Rh1 S367A-Mutante je zwei Linien untersucht. (n=4)

Linien, so zeigt sich, dass die Rh1 S357A/2-Mutante einen Rhodopsingehalt von 92 % im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Die S367A/2-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen Rhodopsingehalt von 80 %.

Zusätzlich zur Berechnung des absoluten Rhodopsingehaltes über die Differenz-Spektralphotometrie, lässt sich mit dieser Methode Rhodopsin bzw. Metarhodopsin spektralphotometrisch charakterisieren. Des weitern kann die Umwandlung von Rhodopsin in Metarhodopsin und umgekehrt untersucht werden. Abb. 4.10 zeigt einen Vergleich der aufgenommenen Differenzspektren, die jeweils das gemessene Wildtyp-Spektrum mit dem Spektrum einer untersuchten Phosphorylierung-Mutante in einem Graph darstellen. Die Spektren der Mutanten zeigen analog zum Wildtyp-Spektrum nach Blaubelichtung eine Erhöhung der Absorption im langwelligen Bereich (Abb. 4.10, Wildtyp Kurve 1, Mutante Kurve 3). Diese Erhöhung dokumentiert die in allen Extrakten stattfindende Umwandlung von Rhodopsin in Metarhodopsin. Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass nach der Rotbelichtung der Extrakte die Umwandlung des Metarhodopsins in Rhodopsin erfolgt (Abb. 4.10, Wildtyp Kurve 2, Mutante Kurve 4). Die Maxima der Differenzspektren von Rhodopsin (circa 480 nm) sowie der Metarhodopsinabsorption (circa 580 nm) stimmen bei allen untersuchten Opsinen sichtbar überein. Die Analyse der spektralphotometrischen Daten lassen somit den Schluss zu, dass Mutationen im C-terminalen Bereich des *Rh1*-Gens keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Rhodopsins haben. Aufgrund der untersuchten spektralen Eigenschaften kann davon ausgegangen werden, dass die primären photochemischen Reaktionen mit dem des Wildtyps übereinstimmen.

## 4. ERGEBNISSE

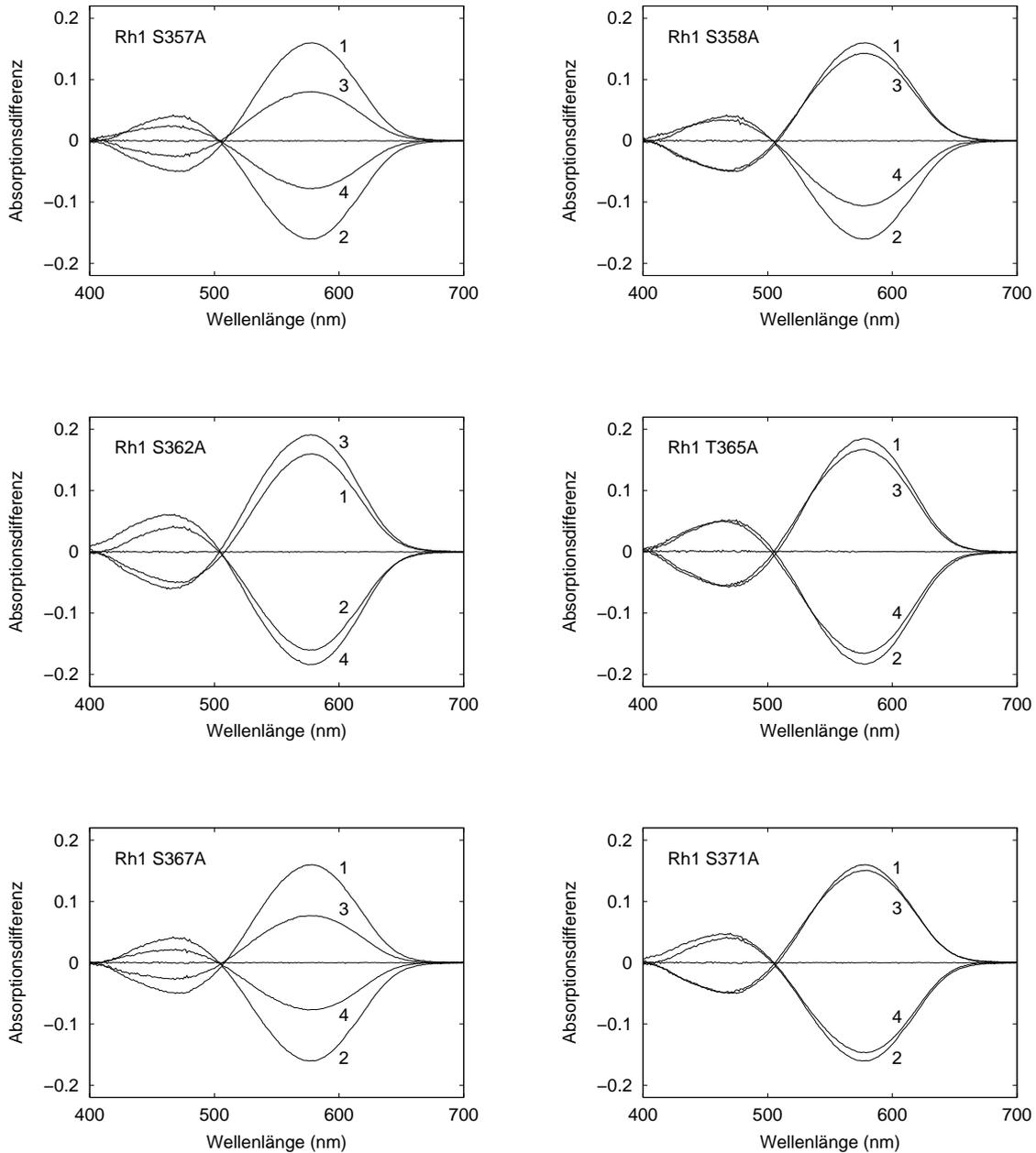


Abbildung 4.10: **Die Opsine der Phosphorylierungs-Mutanten entsprechen in ihren spektralen Eigenschaften dem Wildtyp-Opsin.** Die spektralen Eigenschaften der verschiedenen Opsine wurden mittels Differenzspektren bestimmt. Hierzu wurden Digitoninextrakte aus Augen des Wildtyps (Kurve 1 und 3) bzw. der jeweiligen Mutante (Kurve 2 und 4) verwendet. Kurve 1 und 3: Differenzspektrum nach Umwandlung von Rhodopsin zu Metarhopsin nach zweiminütiger Blaubeleuchtung, Kurven 2 und 4: Umwandlung von Metarhodopsin zu Rhodopsin durch zweiminütige Rotbeleuchtung.

#### 4.3.4 Lichtaktivierte Arrestin2-Bindung in den Phosphorylierungs-Mutanten

Die Phosphorylierung des Metarhodopsinzustandes bei Wirbeltieren und die nachfolgende Bindung von Arrestin sind essentielle Schritte eines Regelkreises der zur Inaktivierung des aktiven Metarhodopsinzustandes führt und damit zum Abschalten der Transduktionskaskade. Zur Beurteilung der funktionellen Bedeutung der Metarhodopsinphosphorylierung von *Drosophila*-Rh1 Opsin war es deshalb wichtig zu untersuchen, ob Wechselwirkungen zwischen Arrestin und Metarhodopsin durch eine der eingeführten Mutationen beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Bindungsexperimente durchgeführt, die die Bindung von Arrestin2, der mengenmäßig am höchsten exprimierten Arrestinform im Photorezeptor von *Drosophila*, an P-Membranen mit der Bindung von Arrestin2 an M-Membranen vergleichen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.11 dargestellt. Die P-Membranen (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15) weisen analog zum Wildtyp eine geringe Arrestin2-Bindung auf, die unter Umständen auf die Bildung von Metarhodopsin in den zentralen Zellen R7 und R8 zurückzuführen ist. In Spur 7, in der Extrakte der P-Membranen der Rh1 S362A-Mutante aufgetragen wurden, ist im Verhältnis zu den anderen Spuren in denen P-Membranen aufgetragen wurden, eine stärkere Bande bei 49 kDa zu erkennen. Dies legt eine höhere Affinität des Arrestins zur Rhodopsinform dieser Mutante nahe. Allerdings konnte diese Vermutung anhand weiterer Blots nicht hinreichend bestätigt werden. Die M-Membranen, (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18) zeigen eine deutlich sichtbare erhöhte Bindung des Arrestin2 an die P-Membranen im Vergleich zu den M-Membranen. Dabei ist, die Spur 12 ausgenommen, kein Unterschied der gebundenen Arrestin-Menge an die P-Membranen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auszumachen. Die an die P-Membranen gebundene Arrestin2-Menge scheint bei der Rh1 S367A-Mutante (Spur 12) etwas niedriger zu sein, was jedoch nach Auswertung weiterer Blots nicht bestätigt werden konnte.

#### 4. ERGEBNISSE

Zusammenfassend ist also nachgewiesen worden, dass alle Phosphorylierungsmutanten einschließlich der Mutante ohne Phosphorylierungsstellen in der Lage sind Arrestin2 zu binden. Die Bindung des Arrestin2 erfolgt somit unabhängig von den potenziellen Phosphorylierungsstellen.

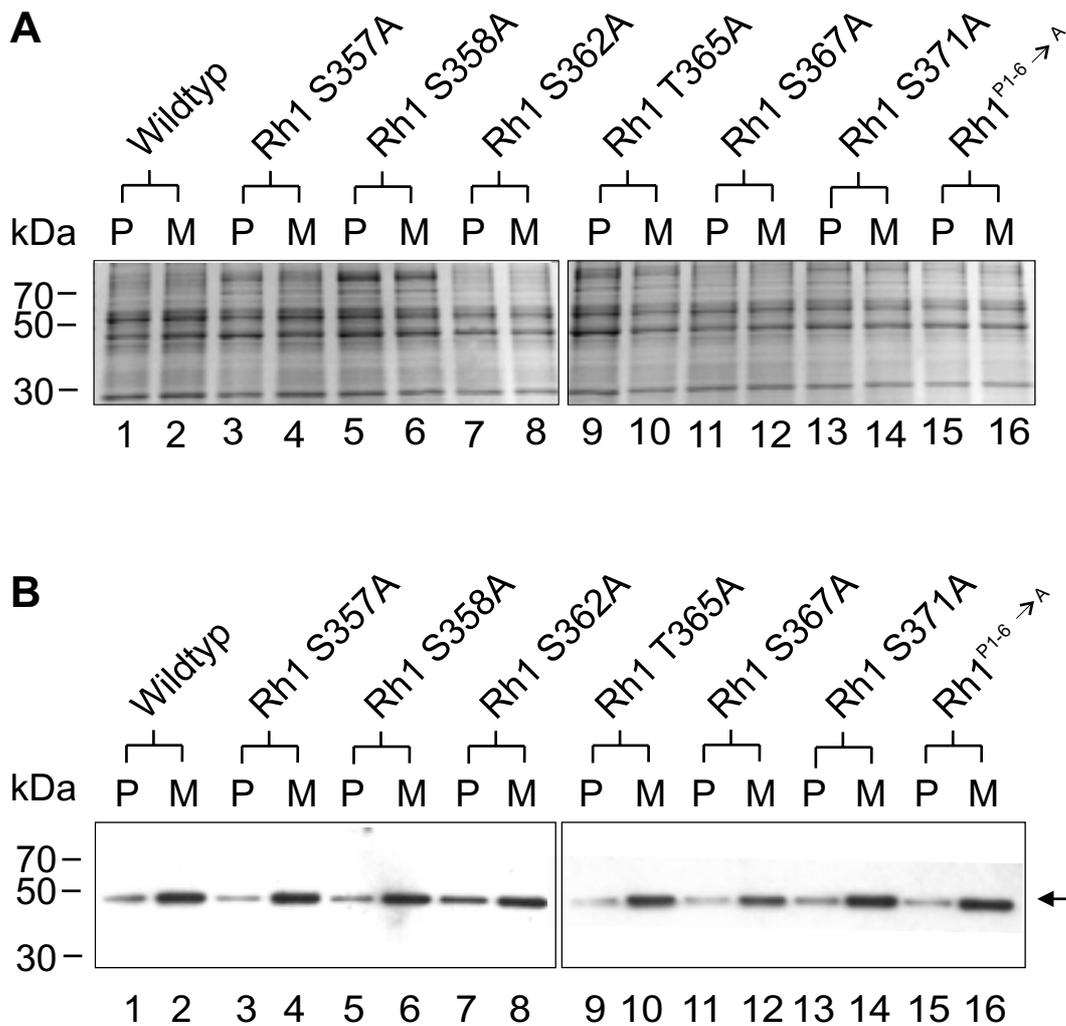


Abbildung 4.11: Lichtinduzierte Bindung von Arrestin2 an die Photorezeptormembran von Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten von *Drosophila*. Jeweils 50 Köpfe von rotlichtadaptierten Fliegen wurden in Puffer homogenisiert. Die Probe wurde entweder im Dunkeln aufbewahrt (P) oder mit Blaulicht (M) belichtet. Die Membranen wurden anschließend sedimentiert, gewaschen und in 1x SDS-Probenpuffer extrahiert. Sowohl für die SDS-PAGE als auch für den Immunoblot wurden von jeder Probe 3  $\mu$ g Protein eingesetzt. **A** Auftrennung der Proteinextrakte mittels SDS-PAGE, **B** anti-Arrestin2-Immunoblot nach Auftrennung der Membranextrakte durch SDS-PAGE, der Pfeil weist auf die Arrestin2-Bande bei 49 kDa.

#### 4.3.5 Metarhodopsinphosphorylierung in den Phosphorylierungs-Mutanten

Zur Quantifizierung der Phosphorylierung des Rh1-Metarhodopsins wurden mit Augenhomogenaten der Phosphorylierungs-Mutanten Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. Nach der Auftrennung der Membranextrakte mittels SDS-PAGE (Abb. 4.12 A) wurde autoradiographisch die Phosphorylierung des Rhodopsins bzw. Metarhodopsins nachgewiesen (Abb. 4.12 B).

Anhand der SDS-PAGE ist deutlich zu erkennen, dass nahezu gleiche Mengen von allen Membranextrakten aufgetragen wurden. Die Autoradiographie der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus P-Membranen zeigt für alle untersuchten Mutanten nur eine schwache Markierung der Opsinbande im Bereich von 32 kDa (Abb. B, Spuren, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17). Dagegen ist eine deutliche Phosphorylierung der Opsin-Bande bei den aufgetrennten Proben aus M-Membranen (Abb. B, Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20) zu beobachten. In allen Spuren außer der Spur 4 und der Spur 18 ist eine deutliche Bande bei 32 kDa zu erkennen. Bei der Rh1-Null-Mutante (Abb. B, Spur 4) ist eine sehr schwache Markierung der Opsin-Bande sichtbar. Diese schwache Phosphorylierung kommt vermutlich durch die anderen in R7- und R8-Photorezeptorzellen exprimierten Rhodopsine zustande. In der Spur 18 wurde der SDS-Extrakt von Membranproteinen aus M-Membranen der Rh1<sup>P1-6→A</sup>-Mutante aufgetragen, bei der alle potenziellen Phosphorylierungsstellen, Serine und Threonine, im C-terminalen Bereich in jeweils ein Alanin mutiert wurden. Hier ist ebenfalls eine äußerst schwache Bande nachweisbar. Die übrigen Mutanten weisen wie zuvor beschrieben eine Phosphorylierung des Opsins auf, die allerdings auch durch unterschiedliche Intensitäten der Banden geprägt ist. So weist zum Beispiel die Rh1 S362A-Mutante (Abb. 4.12 B, Spur 10) eine stärkere Phosphorylierung als der Wildtyp (Abb. 4.12 B, Spur 2) auf. Da es sich bei dieser Autoradiographie jedoch eher um einen qualitativen als um einen quantitativen Nachweis der Opsinphosphorylierung handelt, ist es unmittelbar nicht möglich hinreichende Aussagen über den Phosphorylierungsgrad einzelner Mutanten zu treffen.

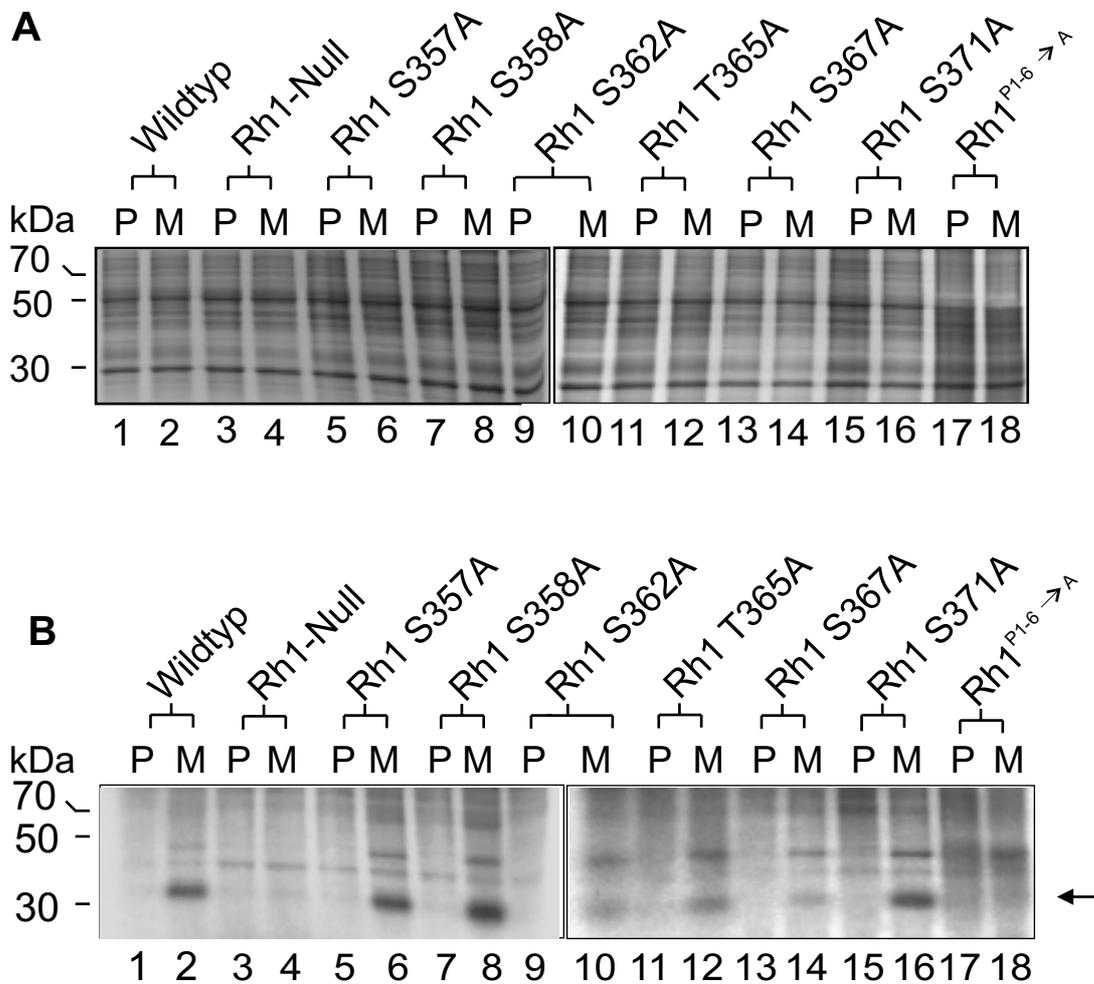


Abbildung 4.12: **Lichtabhängige Protein-Phosphorylierung in einzelnen Phosphorylierungsmutanten von *Drosophila*.** Augen-Kappen-Präparate wurden homogenisiert und im Standard-Phosphorylierungsansatz mit  $\gamma^{32}$ -ATP inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch Belichtung der Membranen mit Blaulicht (M) induziert, während die Kontrolle im Dunklen (P) inkubiert wurde. Die Membranen wurden sedimentiert, gewaschen und anschließend in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Aufgetragen wurden Membranextrakte von je 50 Augen. Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17: P-Membranen. Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: M-Membranen. **A** Proteinmuster der SDS-PAGE, **B** Autoradiographie der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteinextrakte. Der Pfeil weist auf die Opsinbande bei 32 kDa.

Zur quantitativen Auswertung der lichtinduzierten Opsinphosphorylierung in den einzelnen Mutanten wurden die erhaltenen SDS-PAGE-Gele nach dem radioaktiven Phosphorylierungsexperiment an einem Phosphor-Imager ausgewertet. Unter Eimberechnung des Rhodopsingehaltes pro Retina, der spektralphotometrisch für jede Mutante bestimmt worden war, wurden die in Abb. 4.13 dargestellten relativen Mengen an in Opsin inkorporiertem Phosphat berechnet.

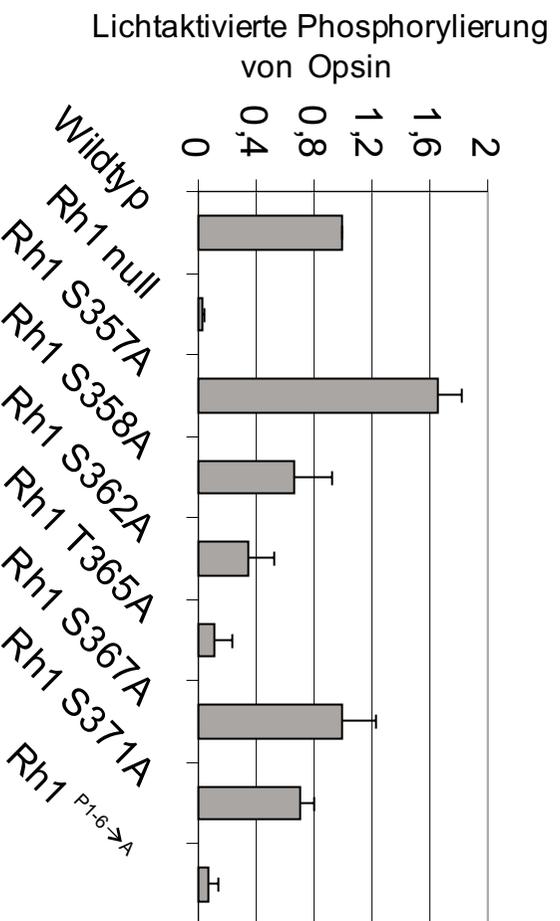


Abbildung 4.13: **Lichtabhängige Opsin-Phosphorylierung von Rh1 in Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten.** Jeweils 50 Augen-Kappen-Homogenate wurden im Standard-Phosphorylierungsansatz mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Membranen wurden nach Inkubation im Dunkeln (P) oder Inkubation nach Blaubelichtung (M) sedimentiert, gewaschen und in 1x SDS-Probenpuffer extrahiert. Die im Diagramm dargestellten Werte für die lichtaktivierte Phosphorylierung des Rh1-Opsins sind relative Werte bezogen auf den Wildtyp.

Das Diagramm zeigt die Phosphorylierung des Metarhodopsins nach Abzug der auftretenden Hintergrundphosphorylierung im Opsinbereich, die bei P-Proben ermittelt wurden. Diese Werte wurden auf die Wildtyp-Phosphorylierung normiert, dessen Wert somit 1 entspricht. Die Mutante Rh1 T365A zeigt eine im Verhältnis zum Wildtyp sehr geringe Phosphorylierung. Sie ist verglichen mit der Phosphorylierung der Rh1<sup>P1-6→A</sup> Mutante und der Rh1-Null-Mutante nur unwesentlich höher. Da die Rh1-Null-Mutante kein Rh1-Opsin exprimiert, kann davon ausgegangen werden, dass die

minimal auftretende Phosphorylierung des Opsins durch andere in den R7- und R8-Zellen exprimierte Opsine zustande kommt. Dieser Effekt ist ebenfalls bei der Rh1 T365A- und der Rh1<sup>P1-6→A</sup>-Mutante zu beobachten. Drei weitere Mutanten (Rh1 S358A, Rh1 S362A und Rh1 S371A) zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Phosphorylierung des Opsins (Rh1 S358A: circa 0,6, Rh1 S362A: circa 0,3 und Rh1 S371A: circa 0,6).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass mehrere der potenziellen Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Rh1-Opsinphosphorylierung des aktivierten Metarhodopsins haben. Weiterführend könnten sie auf eine multiple Phosphorylierung des Rh1-Opsins von *Drosophila melanogaster* hindeuten, sowie auf die Möglichkeit, dass verschiedene Opsin-Moleküle an verschiedenen Serin- oder Threoninresten phosphoryliert werden können. Überraschend ist, dass die Mutante Rh1 S357A eine deutlich stärkere Phosphorylierung des Opsins im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Eine solche Hyperphosphorylierung findet man auch bei der rdgC-Mutante (siehe 4.1). Es ist daher anzunehmen, dass die Dephosphorylierung bei dieser Mutante nicht korrekt abläuft.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass es durch die Mutation potenzieller Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Rh1-Opsins zu keinen Defekten der folgenden Funktionen kommt: der Rhodopsinsynthese, dem Transport zur Membran und der Integration in die Membran. Die eingeführten Mutationen haben außerdem keinen Einfluss auf die Wechselwirkung des Arrestin2 mit dem lichtaktivierten Rezeptor. Es ist offenbar, dass die Phosphorylierung im C-terminalen Bereich des Rhodopsins durch Mutationen an den Positionen S358, S362, T365 und S371 negativ beeinflusst wird.

#### 4.4 Einfluss der Mutationen von Phosphorylierungsstellen des Rh1-Rhodopsins auf die Physiologie des Photorezeptors

Zur Überprüfung der Auswirkung der eingeführten Mutationen bzw. der daraus resultierenden Änderung in der M-Phosphorylierung auf den Phototransduktionsprozess wurden Elektroretinogramm (ERG)-Messungen durchgeführt. Weitere Experimente wurden der Frage gewidmet, ob die Phosphorylierung des Rezeptors den Turnover des Rhodopsins beeinflusst.

##### 4.4.1 Die elektrische Antwort (Elektroretinogramm) in den Phosphorylierungs-Mutanten

Um Aussagen über die Änderungen der Antwort der einzelnen Phosphorylierungsmutanten treffen zu können, wurden zunächst Elektroretinogramme (ERG) der einzelnen Mutanten auf Veränderungen gegenüber der Reiz-Antwort der Wildtyp-Retina untersucht. Zu diesem Zweck wird ein durch den Lichtreiz ausgelöstes Summenpotential aufgezeichnet, das extrazellulär gegen den Thorax gemessen wird. Durch eine kurzfristige Reizung mit Rotlicht (580 nm) kommt es zu einer Depolarisation, die auf eine Aktivierung der Phototransduktionskaskade durch vergleichsweise wenige Rh1-Metarhodopsinmoleküle zurückzuführen ist. Nach Beendigung des Lichtreizes kehrt das Potential auf die Basislinie zurück, da die Transduktionskaskade durch die Deaktivierung des Rezeptors gestoppt wird. Diese Depolarisation mit anschließender Rückkehr zum Ruhepotential auf einen roten Lichtimpuls (580 nm) ist in der Abb. 4.14 zu sehen. Alle Phosphorylierungs-Mutanten antworten dem Wildtyp entsprechend auf diesen roten Lichtreiz.

Anschließend werden die Photorezeptoren mit Blaulicht (480 nm) belichtet, das im Vergleich zu rotem Licht (580 nm) eine wesentlich größere Menge an Rh1-Rhodopsin (d.h. circa 70 % der vorhandenen Rhodopsine werden zu Metarhodopsin umgewandelt) aktiviert. Es erfolgt eine Depolarisation, der sich ein „verlängertes depolarisierendes Nachpotential“ (prolonged depolarizing afterpotential, PDA, (MINKE *et*

*al.*, 1975; HAMDORF *et al.*, 1979)) anschließt. Dieses PDA ist dadurch charakterisiert, dass es nach der Blaubelichtung nicht, wie bei der Rotbelichtung, unmittelbar zu einer Rückkehr zur Basislinie kommt. Als Ursache wird folgender Mechanismus diskutiert (BYK *et al.*, 1993): Nach Absorption eines Lichtquants wird Rhodopsin in Metarhodopsin umgewandelt. Um die Bindung an den lichtaktivierten Metarhodopsinzustand konkurrieren das G-Protein, welches in der Lage ist die nächsten Schritte der Transduktionskaskade zu aktivieren, und Arrestin, ein Regulatorprotein der Sehkaskade. Durch die Bindung des Arrestin2 wird das Metarhodopsin und damit die nachfolgenden Schritte der Transduktionskaskade inaktiviert. Nach der Absorption eines weiteren Lichtquants kommt es zur Reisoomerisierung des Chromophors, d.h. zur Rückumwandlung von Metarhodopsin zu Rhodopsin. Als Ergebnis dieser Konformationsänderung wird Arrestin2 vom Rezeptor freigesetzt. Da durch Blaubelichtung mehr Rhodopsin in Metarhodopsin umgewandelt wird, als durch die Bindung des Arrestin2 wieder inaktiviert werden kann, bleibt ein Überschuss an aktiviertem Metarhodopsin. Diese nicht inaktivierten Moleküle können die Transduktionskaskade durch Interaktion mit dem G-Protein weiterhin stimulieren. Dies bedeutet, dass ein depolarisiertes Potential auch nach Beendigung des Lichtstimulus aufrecht erhalten bleibt. Erst durch Rotbelichtung (580 nm) kommt es zu einer Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin und damit zu einer vollständigen Deaktivierung der Kaskade und zur Rückkehr der Reizantwort auf die Basislinie.

Die in Abb. 4.14 dargestellten ERG wurden an Fliegen durchgeführt, die im Dunklen aufgezogen und gehalten worden waren. Wie zu zuvor beschrieben, bildet sich nach Blaubelichtung beim Wildtyp ein prototypisches PDA aus, während es nach Rotbelichtung zu einer raschen Rückkehr zur Basislinie kommt. Die Mutanten (Rh1 S357A, Rh1 S358A, Rh1 S362A, Rh1 T365A und Rh1 S371A) zeigen ebenfalls einen normalen Eintritt ins PDA nach einem kurzen Blaulichtimpuls. Die Rückkehr zur Basislinie nach Rotbelichtung erfolgt ebenfalls analog zum Wildtyp. Ein abweichendes Verhalten ist bei der Mutante Rh1 S367A zu beobachten: Gegenüber dem Wildtyp und den anderen Mutanten ist kein deutliches PDA auf einen Blaulichtimpuls sicht-

bar. Die Inaktivierung des Rezeptors und damit der gesamten Transduktionskaskade läuft offenbar in diesem Fall effektiver ab. Als mögliche Erklärung lässt sich die mit 50 %, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich geringere Rhodopsinmenge anführen. Als Folge ist das Verhältnis zwischen Metarhodopsin und Arrestin weiter zum Arrestin verschoben, das heißt im Verhältnis können mehr Metarhodopsinmoleküle durch Bindung von Arrestin2 inaktiviert werden als dies beim Wildtyp möglich ist. Zur Stützung dieser Aussage wurden weitere ERG-Messungen an einer zweiten Linie Rh1 S367A/2-Mutante durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 4.15 zeigen, dass diese Linie gegenüber der Rh1 S367A-Mutante einen Wildtyp-ähnlichen Eintritt ins PDA aufweisen.

Bei der Rh1<sup>P1-6→A</sup>-Mutante ist die Rückkehr zur Basislinie nach dem Rotimpuls leicht verlangsamt. Ein Einfluss auf die Erregbarkeit der Zellantwort und die Ausbildung eines verlängerten Nachpotentials ist jedoch in dieser Mutante nicht festzustellen. Das mutierte Opsin ist also in der Lage, die Phototransduktionskaskade zu aktivieren. Allerdings kann sie nicht mehr korrekt deaktiviert werden.

Diese Beobachtungen zeigen, dass Einzelmutationen im C-terminalen Bereich des Rhodopsins offensichtlich zu keinen Defekten in der Deaktivierung nach Photoregeneration führen, während ein Austausch aller potenziellen Phosphorylierungsstellen einen leichten Defekt in der Deaktivierung nach Photoregeneration bewirkt.

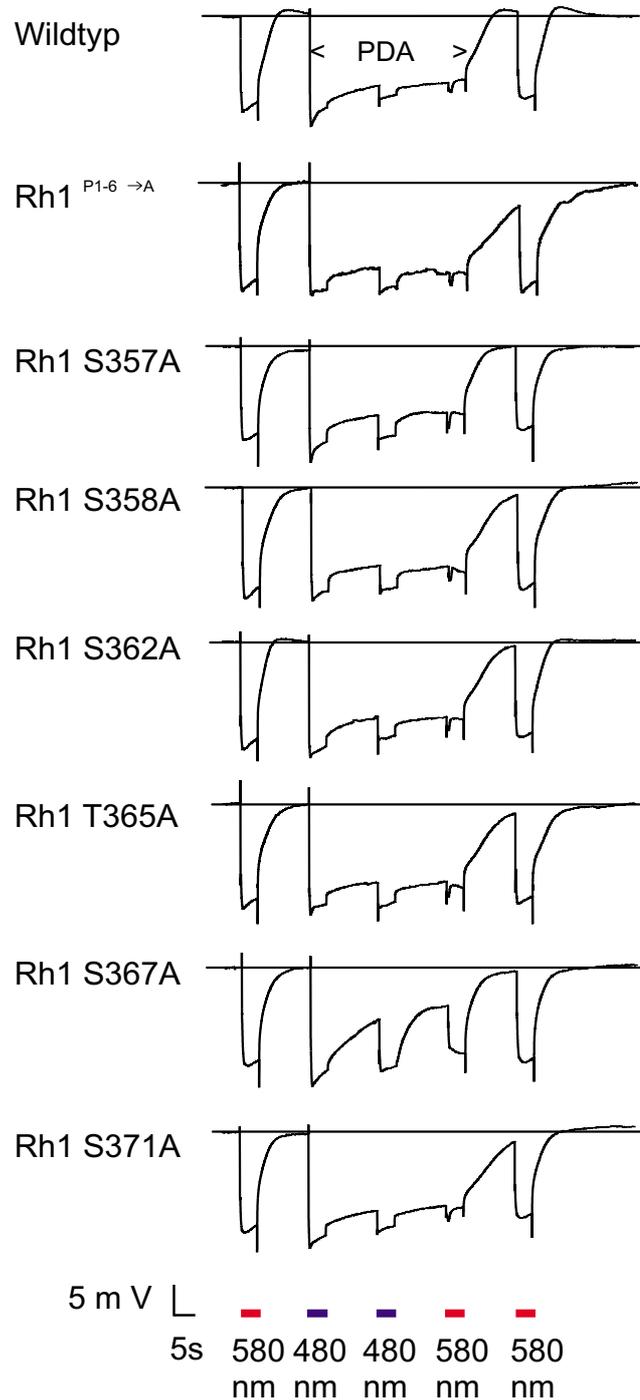


Abbildung 4.14: **Elektroretinogramme von Wildtyp-Fliegen und verschiedenen Rh1-Phosphorylierungs-Mutanten.** Die Fliegen wurden nach Aufzucht in Dunkelheit in der Messapparatur nach folgendem Schema mit monochromatischem Licht gereizt: 5 s rot (580 nm), 15 s dunkel, 5 s blau (480 nm), 15 s dunkel, 5 s blau (480 nm), 15 s dunkel, 5 s rot (580 nm), 15 s dunkel, 5 s rot (580 nm). Die Messungen wurden in Kooperation mit Dipl. Biol. G. Belusic, Universität Ljubljana, angefertigt. n=4

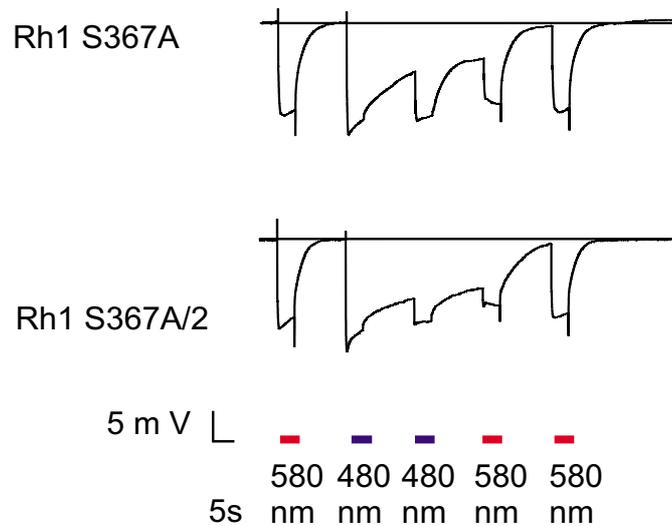


Abbildung 4.15: **Elektroretinogramme der Mutante Rh1 S367A und Rh1 S367A/2** Die Fliegen wurden nach drei Tagen im Dauerlicht in der Messapparatur nach folgendem Schema mit monochromatischem Licht gereizt: 5 s rot (580 nm), 15 s dunkel, 5 s blau (480 nm), 15 s dunkel, 5 s blau (480 nm), 15 s dunkel, 5 s rot (580 nm), 15 s dunkel, 5 s rot (580 nm). Die Messungen wurden in Kooperation mit Dipl. Biol. G. Belusic, Universität Ljubljana, angefertigt. n=4

#### 4.4.2 Effekte der Mutationen potenzieller Phosphorylierungsstellen des Rh1-Opsins auf die Degradation des Rhodopsins

Vom  $\beta$ -adrenergen Rezeptor ist bekannt, dass aktivierte Rezeptoren nach einer Kurzzeitexposition (bis zu einer Stunde) internalisiert werden. Langzeitexpositionen über Stunden oder Tage dagegen führen zu einer Degradation des Rezeptors beziehungsweise zu einer Herunterregulation der Rezeptorgesamtzahl. Dabei wird die Internalisierung/Degradation des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors über die Phosphorylierung C-terminaler Phosphorylierungsstellen und der Bindung von  $\beta$ -Arrestin geregelt. Auch für den Fliegenphotorezeptor gibt es Hinweise darauf, dass Metarhodopsinmoleküle, die nicht in der rhabdomerischen Membran zu Rhodopsin regeneriert werden, einer Degradation unterliegen. Um nähere Aussagen über den Einfluss von Phosphorylierungsstellen und den Phosphorylierungsgrad auf eine Degradation treffen zu können, wurden Fliegen für mehrere Tage im Grünlicht gehalten. Die Grünbelichtung induziert eine Verminderung des Rhodopsingehaltes. Als Ursache für diese Verminderung wird angenommen, dass durch das Grünlicht zwar Rhodopsin in

Metarhodopsin konvertiert werden kann, ohne jedoch eine Photoregeneration des Chromophors auszulösen. Dadurch erhöht sich die Metarhodopsinkonzentration in der Photorezeptorzelle und eine Neusynthese des Rezeptors wird unterbunden. Nach einer Hypothese von SCHWEMER (1984) wird das Metarhodopsin verstärkt aus der Membran ausgebaut, wodurch es zu einer Abnahme des Gesamt-Sehfarbstoffgehaltes kommt. Die Untersuchung zum Einfluss der Phosphorylierung auf die Degradation des Rezeptors wurde mit zwei in ihrem Phosphorylierungsgehalt vom Wildtyp abweichenden Mutanten vorgenommen. Es handelt sich um die Rh1 S358A-Mutante, bei der das Metarhodopsin zu circa 66 % phosphoryliert wird und um die Rh1S362A-Mutante bei der das Metarhodopsin zu circa 34 % phosphoryliert wird. Diese Fliegen-Stämme wurden parallel mit der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle für fünf Tage im Grünlicht gehalten. Die mittels aufgezeichneter Differenzspektren ermittelte Rhodopsinmenge nimmt innerhalb der ersten 24 Stunden der Grünbelichtung beim Wildtyp ab (Abb. 4.16). Der relative Rhodopsingehalt sinkt hierbei von der dunkelexposition-gemessenen Menge an Rh1 (100 % Stunde 0) auf circa 79 % nach 24 Stunden ab. Im Auge der Rh1 S358A-Mutante vermindert sich der Rhodopsingehalt innerhalb der ersten 24 Stunden auf circa 82 %. In Mutante Rh1 S362A dagegen bleibt der Rhodopsingehalt im Vergleich zur Stunde 0 des Wildtyps stabil. Die Abnahme des Rhodopsingehaltes in den einzelnen Fliegenstämmen ist innerhalb der ersten acht Stunden am stärksten. In den folgenden 16 Stunden wurde nur noch eine leichte Veränderung registriert. Der Rhodopsingehalt der Wildtyp-Fliegen und der Rh1 S358A-Mutante hat sich innerhalb von fünf Tagen stärker erniedrigt (Wildtyp: circa 59 %, Rh1 S358A: circa 70 %) als bei der Rh1 S362A-Mutante, deren Rhodopsingehalt in dieser Zeit auf durchschnittlich 85 % abgesunken ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Degradation des Rh1-Rhodopsins bei der Rh1 S362A-Mutante zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt. Da sich die hier untersuchten beiden Mutanten in ihrer in das Opsin inkorporierten Phosphatmenge um 1/3 unterscheiden, könnte die Phosphorylierung eine Rolle bei der Degradation des Rezeptors spielen.

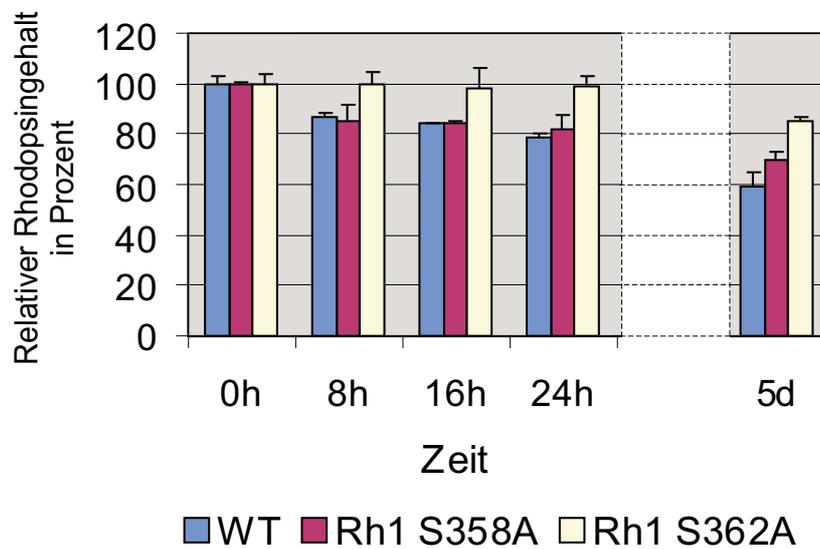


Abbildung 4.16: **Durch Grünlicht induzierte Veränderung des Sfarbstoffgehalts im Wildtyp und in Rh1-Phosphorylierungsmutanten.** Nach Aufzucht in völliger Dunkelheit wurden die verschiedenen Fliegenstämme für 5 Tage grünem Licht ausgesetzt. Es wurden jeweils Fliegen nach 0 h, 8 h, 16 h, 24 h und 5 Tagen Grünbelichtung entnommen. Zu den angegebenen Zeiten nach Belichtungsbeginn wurde der Rhodopsingehalt der Fliegen spektralphotometrisch in Extrakten aus je 100 Köpfen bestimmt hellgrauer Balken Wildtyp, dunkelgrauer Balken Rh1 S358A-Mutante, weißer Balken Rh1 S362A-Mutante. n=3

## 5. Diskussion

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) besitzen potenzielle Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Proteins. Die Funktion der Phosphorylierung ist jedoch bei vielen dieser Rezeptoren noch nicht geklärt. Der im Rahmen dieser Arbeit genauer untersuchte GPCR ist ein Sehfärbstoff, das Rh1-Rhodopsin der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Die molekularen Mechanismen, über die Rh1 die Umwandlung eines Lichtreizes im Fliegenauge in ein elektrisches Signal auslöst, sind gut untersucht, wenn auch noch nicht in allen wichtigen Details geklärt. Zur Funktion der lichtabhängigen Phosphorylierung dieses Rezeptors gab es zu Beginn dieser Arbeit nur erste, zum Teil widersprüchliche Anhaltspunkte. Aus Analysen einer Mutante, bei der der C-terminale Bereich im Rh1 ab der Position 356 deletiert ist, konnte vermutet werden, dass die Phosphorylierung von Rh1 keine essentielle Funktion bei der Ausbildung der elektrischen Reizantwort hat (VINÓS *et al.*, 1997). Ein eindeutiger Schluss konnte aber nicht gezogen werden, da wichtige regulatorische Abschnitte des Rh1 in dieser Mutante fehlen könnten. Die Ergebnisse von Untersuchungen an einer weiteren Mutante, bei der alle Serin- und Threoninreste im C-terminalen Bereich durch Alanin substituiert wurden, legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von Rh1 für die vollständige Deaktivierung des aktiven Metarhodopsinzustandes (M) und dessen Rückführung in den aktivierbaren Rhodopsinzustand (P) notwendig ist (SCHILLO, 2001). Ein prinzipielles Problem bei Untersuchungen eines an multiplen Stellen mutierten Gens ist, dass nicht abschließend beurteilt werden kann, ob im Phänotyp auftretende Eigenschaften auf die Einführung mehrerer Mutationen oder auf das Fehlen von Phosphorylierungsstellen

zurückzuführen ist. Mit Wissen um die Problematik wurden in der vorliegenden Arbeit Transformanten erzeugt, bei denen jeweils eine der potenziellen Phosphorylierungsstellen zu nicht phosphorylierbarem Alanin mutiert wurde. So konnte der Frage nachgegangen werden, welche der sechs potenziellen Phosphorylierungsstellen wirklich phosphoryliert werden. Es wurde zunächst geprüft, ob die Enzymausstattung der Rh1 exprimierenden Photorezeptoren auch die Phosphorylierung ektopisch exprimierter, mit unterschiedlichen Mustern an Phosphorylierungsstellen ausgestatteten, Rhodopsine gewährleistet.

### 5.1 Redundanz der Phototransduktionskaskaden

In den Photorezeptoren von *Drosophila* werden sechs unterschiedliche Rhodopsine exprimiert, wobei Rh2 in den Ocelli und nicht im Komplexauge exprimiert wird. In den Ommatidien des Komplexauges macht das Rh1-Rhodopsin der peripheren Photorezeptorzellen R1-R6 etwa 90 % des im gesamten Komplexauge exprimierten Sehfärbstoffes aus (PAULSEN, 1984; SMITH *et al.*, 1991), während der Anteil der übrigen Rhodopsine, die in den R7-Zellen und R8-Zellen exprimiert werden, nur circa 10 % beträgt. Vor dem Hintergrund, dass unterschiedliche Rezeptorzellen durch die Expression bestimmter Rhodopsine für unterschiedliche Lichtqualitäten optimiert sind, stellt sich nun die Frage, ob sich diese Differenzen auch bei weiteren Komponenten der Signaltransduktionskaskade wiederfinden lassen. In Untersuchungen mit Transformanten, die die Rhodopsine Rh2–Rh6 in den R1-6 Photorezeptorzellen ektopisch exprimieren, hat sich gezeigt, dass die Rh2–Rh6 Rhodopsine nach ihrer Aktivierung in der Lage sind, die Rh1-abhängige Transduktionskaskade auszulösen. Die Frage nach der Identität beziehungsweise der Kompatibilität der Komponenten von Signaltransduktionskaskaden in unterschiedlichen Photorezeptorzellen war, für den Aspekt der Rezeptorphosphorylierung mit Hilfe ektopisch exprimierter Rhodopsine, bisher nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass die Rhodopsine Rh2–Rh5 bei Expression unter Kontrolle des Rh1-Promotors (d.h. in den Photorezeptorzellen R1–R6) nach Lichtaktivierung wie Rh1 phosphory-

liert werden. Die Phosphorylierbarkeit erscheint also als eine evolutionär konservierte Eigenschaft der Sehfärbstoffe bei *Drosophila melanogaster*, auch wenn die exakte Beibehaltung der Position der Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich nicht gegeben ist.

Eine lichtabhängige Phosphorylierung von Rh6 ließ sich allerdings nicht nachweisen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Rh6 nach der lichtinduzierten Umwandlung in Metarhodopsin relativ schnell zerfällt. So konnten SALCEDO *et al.* (1999) mittels Spektralphotometrie von Digitonin-Extrakten der ektopisch Rh6 exprimierenden Mutante zeigen, dass bei Temperaturen von 10 °C keine stabile Metarhodopsinform detektierbar ist. Alternativ hierzu wäre es denkbar, dass die Rhodopsinkonzentration in dieser Mutante zu gering ist (HENRICH, 1998), um eine lichtinduzierte Phosphorylierung zu detektieren. Für die Rhodopsine Rh2–Rh5 lässt sich folgern, dass ihre lichtabhängige Phosphorylierung durch die bisher noch nicht identifizierte Rh1-Rhodopsinkinase der Photorezeptorzellen R1–R6 unabhängig von der im C-Terminus dieser Rhodopsine existierenden unterschiedlichen Positionierung der Phosphorylierungsstellen katalysiert wird.

Für die Photorezeptorzellen R1–6 ist bekannt, dass Arrestin2 lichtabhängig phosphoryliert wird (KOMORI *et al.*, 1994) und an das lichtaktivierte Rh1-Rhodopsin bindet (BENTROP *et al.*, 1993; SCHILLO, 1997). Analog zur Metarhodopsin Interaktion mit der Rezeptorkinase stellt sich die Frage, ob Arrestin2 auch lichtabhängig an die verschiedenen Rhodopsine bindet. Es konnte gezeigt werden, dass das phosphorylierte Arrestin2 ebenso an die lichtaktivierten Rhodopsine Rh2–Rh5 bindet. Eine Bindung des Arrestin2 an das Rh6-Metarhodopsin lässt sich jedoch nicht beobachten, vermutlich aus den bereits genannten Gründen, die auch den Nachweis einer lichtabhängigen Phosphorylierung verhindern. Damit gilt als gesichert, dass auch in den Photorezeptoren R7/R8 die Deaktivierung des jeweiligen Rhodopsins durch Arrestin2 vermittelt wird. Auch von Arrestin1 ist bekannt, dass es an das lichtaktivierte Rh1-Rhodopsin bindet (SCHILLO, 2001). Die Bindungsversuche mit Arrestin1 zeigen, dass Arrestin1 ebenfalls an die Metarhodopsin-Form aller Rho-

dopsine binden kann. Da nach der Entschlüsselung des *Drosophila*-Genoms nur ein weiteres Arrestin identifiziert werden konnte (ROMAN *et al.*, 2000), dieses aber nicht in Photorezeptoren exprimiert wird, dürfte der Bindungsmechanismus für Arrestin2 beziehungsweise Arrestin1 in allen Rhodopsin-exprimierenden Zellen von *Drosophila* konserviert sein.

## 5.2 Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Expression und Lokalisation des Rh1-Opsins

In zahlreichen Fällen ist für die Rhodopsine der Vertebraten und der Invertebraten gezeigt worden, dass Rhodopsin-Mutanten zu Defekten in den Photorezeptormolekülen und daran gekoppelt zur retinalen Degeneration führen (BENTROP, 1998). Für das Vertebraten Rhodopsin (Maus und Schwein) sind zwei C-terminale Mutanten bekannt, deren Mutationen zu spezifischen Defekten im Transport zum Aussensegment führen. Dabei handelt es sich um eine Mutante, bei der die letzten fünf Aminosäuren des C-Terminus deletiert sind und um eine Mutante, bei der Prolin 347 durch ein Lysin substituiert ist. Bei beiden Mutanten kommt es zu keinem korrekten Targeting, das Rhodopsin verbleibt fehllokalisiert im Innensegment des Stäbchens (LI *et al.*, 1998; SUNG *et al.*, 1994). Eine Mutante, bei der die letzten 15 Aminosäuren des Rhodopsins deletiert wurden, zeigt dagegen interessanterweise eine normale Expression des Rhodopsins (CHEN *et al.*, 1995). Bei *Drosophila* ist eine Mutante bekannt, der ein Stück des C-terminalen Bereichs (Rh1 $\Delta$ 356) fehlt. Sie zeigt eine normale Expression des Rhodopsins (VINÓS *et al.*, 1997). Da aber ein Einfluss einzelner mutierter Aminosäuren im C-Terminus des Rh1-Opsins nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Expression des Rhodopsins, die Prozessierung und die Translokation in die rhabdomerische Membran bei den einzelnen in dieser Arbeit hergestellten Mutanten überprüft. Es sind nämlich Punktmutationen bekannt, die zum Beispiel dazu führen, dass die Reifung des Rhodopsins nicht richtig erfolgen kann. So sind Opsinmoleküle, die aufgrund einer Punktmutation nicht glykosyliert werden können, eher instabil und werden rasch degradiert (HUBER *et*

*al.*, 1994; BENTROP *et al.*, 1997). Für die potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von Rh1 wurde hier gezeigt, dass ihre Substitution durch Alanin keinen Einfluss auf Expression, Prozessierung oder Transport des Rhodopsins hat. Zusammen mit Datenbankinformationen über andere Mutationen in diesem Bereich kann daher gefolgert werden, dass der C-Terminus von Rh1 keine Bindungsdomänen für Proteine aufweist, die eine Rolle beim Targeting haben.

### 5.3 Regulation der Arrestin-Bindung

Bei den Vertebraten ist die Phosphorylierung des lichtaktivierten Metarhodopsins Voraussetzung für die Bindung des Arrestins (SCHLEICHER *et al.*, 1989). Die Interaktion des Metarhodopsins mit dem Arrestin führt zu einer Deaktivierung des Rezeptors und damit zur Hemmung der G-Protein Aktivierung (RANGANATHAN & STEVENS, 1995). Die Rezeptorphosphorylierung ist jedoch nicht bei allen GPCR Voraussetzung für die Arrestinbindung. So ist zum Beispiel vom Lutropin/Choriogonadotropin-Rezeptor bekannt, dass die Assoziation mit Arrestin eher von der Aktivierung als von der Rezeptorphosphorylierung abhängt (MIN *et al.*, 2002). Auch bei *Drosophila* ist davon auszugehen, dass Arrestin2 vor der Phosphorylierung des lichtaktivierten Metarhodopsins an dieses bindet, da die Halbwertszeit für die maximale Besetzung von Metarhodopsin mit Arrestin2 nur 30 Sekunden beträgt (PLANGGER *et al.*, 1994), während die Phosphorylierung mit einer Halbwertszeit von circa 7 Minuten abläuft (PAULSEN, 1984). Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.3.4 zeigen, weist Arrestin2 bei allen untersuchten Mutanten eine höhere Affinität zum Metarhodopsin auf. Es macht offensichtlich keinen Unterschied, ob potenzielle Phosphorylierungsstellen, d.h. alle Serin- oder Threoninreste gegen ein Alanin ausgetauscht wurden oder nur singuläre Substitutionen eingeführt wurden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass keine der potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Rh1 Voraussetzung für die lichtabhängige Bindung von Arrestin2 ist. Zusammen mit den Untersuchungen an *Drosophila* Rh1-Mutanten bei denen der C-terminale Bereich des Sehfärbstoffes deletiert ist oder bei denen alle C-terminal lokalisierten

Serine mutiert wurden (KISELEV *et al.*, 2000), zeigen die hier ermittelten Daten, dass im Falle des *Drosophila*-Rhodopsins weder die lichtabhängige Phosphorylierung noch die phosphorylierbaren Aminosäuren per se für die Bindung von Arrestin notwendig sind. Die regulatorische Rolle der Arrestinbindung bei der Metarhodopsin-Deaktivierung ist demzufolge unabhängig von der Rezeptorphosphorylierung.

#### 5.4 Charakterisierung der potenziellen Phosphorylierungsstellen

Die Phosphorylierung des lichtaktivierten Metarhodopsins von *Drosophila* beschränkt sich nach den bisherigen Erkenntnissen auf den C-terminalen Bereich des Rezeptors, was bisher anhand von zwei Mutanten gezeigt werden konnte. Bei einer dieser Mutanten ist der C-Terminus ab der Position 356 deletiert (VINÓS *et al.*, 1997), wodurch auch alle potenziellen Phosphorylierungsstellen entfernt wurden, während bei der anderen Mutante alle Serin- und Threoninreste durch ein Alanin substituiert vorliegen (SCHILLO, 2001). Da anhand dieser Mutanten keine Aussagen über Aufgabe und Funktion der einzelnen Serin- oder Threoninreste getroffen werden kann, wurden in dieser Arbeit Mutanten erzeugt, bei denen jeweils ein Serin- oder Threoninrest durch ein Alanin ersetzt worden ist. Auf diese Weise konnte untersucht werden, welche Bedeutung die einzelnen Stellen für die Phosphorylierung haben, ohne größere strukturelle Veränderungen hervorzurufen, wie das durch Deletion eines großen Genbereichs oder durch Einführung multipler Mutationen erwartet werden könnte.

Zunächst wurde untersucht, welche der potenziellen Phosphorylierungsstellen die Phosphorylierung des Rezeptors beeinflussen. Die Mutantenanalyse zeigt, dass vier der sechs möglichen Stellen eine Rolle bei der Phosphorylierung spielen (S358, S362, T365, S371). Dabei wird das Opsin der Rh1 T365A Mutante nicht phosphoryliert, das heißt aus dieser Mutation resultiert eine Null-Mutante bezüglich der Phosphorylierung. Bei der Rh1 S362A Mutante wird das Opsin zu etwa 34 % phosphoryliert, während die Mutanten Rh1 S358A und Rh1 S371A zu je etwa 66 % beziehungs-

**A: 346-CCVFGKVDDGKSSDAQSQATASEAESKA-373**

**B: 344-CCVFGKVDDGKASDATSQATNNESETKA-371**

Abbildung 5.1: Die bei *Drosophila* phosphorylierten Aminosäuren liegen bei *Calliphora* konserviert vor. Die grauen Kästchen kennzeichnen Aminosäuren, deren Mutation die Rezeptorphosphorylierung des *Drosophila*-Rh1 beeinflusst. **A** C-terminale Bereich des Rh1-Opsins von *Drosophila*, **B** C-terminale Bereich des Rh1-Opsins von *Calliphora*.

weise etwa 69 % phosphoryliert werden. Dies deutet auf eine Phosphorylierung des Rh1-Metarhodopsins an mehreren Positionen hin, übereinstimmend mit Phosphorylierungsexperimenten am hoch homologen *Calliphora* Rh1, bei dem ein Einbau von drei bis vier Phosphatresten pro Opsinmolekül gemessen werden kann (PAULSEN & BENTROP, 1986). Interessanterweise sind die vier Serine beziehungsweise Threonine, deren Mutation die Rezeptorphosphorylierung beeinflusst (S358, S362, T365 und S371), bei *Drosophila melanogaster* und *Calliphora vicina* positionell konserviert (siehe Abb. 5.1). Die zwei übrigen Phosphorylierungsstellen sind dagegen nicht positionell konserviert. Es ist daher zu vermuten, dass nicht nur die Phosphorylierungsstellen, sondern auch die Abfolge mit der sie phosphoryliert werden, bei den Rh1-Homologen übereinstimmt.

Aus diesen Daten lässt sich in Analogie zu den Verhältnissen im Wirbeltier-Photorezeptor ein Modell für die sequenzielle Phosphorylierung des Rh1 Rhodopsins aufstellen. Dabei wird von zwei Annahmen ausgegangen:

1. Im experimentellen Ansatz wird die maximal mögliche Phosphorylierung erreicht. Das ist dadurch sicher gestellt, dass Inkubationszeiten gewählt wurden, die sich im gesättigten Bereich der Phosphorylierungs-Kinetik befinden (PLANGGER *et al.*, 1994).
2. Die Phosphorylierung erfolgt bei allen Metarhodopsinmolekülen in der gleichen Sequenzabfolge. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass sich die Werte für den Phosphateinbau in den unterschiedlichen Mutanten in statistisch abgesicherte Inkremente von 0 %, circa 33 %, circa 66 %, und 100 % bewegen.

Im hier aufgestellten Modell wird von einer Phosphorylierung an drei Stellen ausgegangen. Dieser Wert stimmt in etwa mit dem experimentell ermittelten überein (BENTROP & PAULSEN, 1986), und er kann die Abstufung der in den verschiedenen Mutanten gemessenen Phosphateinbauraten 0 bzw. 1/3 bzw. 2/3 bzw. 3/3 des Wildtyp-Wertes erklären. Der Position T365 wird in diesem Modell ausschließlich eine regulative Funktion zugesprochen, da die Mutation T365A die Phosphorylierung komplett unterdrückt. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bei einer Mutante, der alle C-terminalen Serine nicht aber T365 durch Alanin ersetzt wurden, keine Phosphorylierung des Threonins nachzuweisen ist (KISELEV *et al.*, 2000). S362 stellt die initiale Phosphorylierungsstelle dar. Die Phosphorylierung von S362 fördert die Phosphorylierung der beiden sekundären Phosphatakzeptoren S358 und S371. Ist S362 mutiert, so ist die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren gehemmt, und es wird insgesamt nur ein Phosphatrest, entweder an der Position S358 oder an der Position S371, pro Opsinmolekül eingebaut. Daher reduziert die Mutation Rh1 S362A den Phosphateinbau auf 1/3 des Wildtyp-Wertes. Im Falle der Mutation Rh1 S358A bzw. Rh1 S371A werden S362 und S371 bzw. S362 und S358 phosphoryliert, und es ergibt sich eine Phosphateinbaurate von 2/3 des Wildtyps.

Auch eine andere leicht abgewandelte Modellvariante ist vorstellbar. Geht man davon aus, dass durch den Austausch aller Serine gegen ein Alanin größere strukturelle Veränderungen im C-terminalen Bereich des Rhodopsins eingeführt werden, so kann es möglich sein, dass das Threonin an der Position 365 aufgrund der strukturellen Veränderungen nicht phosphoryliert werden kann. Dies bedeutet aber im Gegensatz zu dem oben entworfenen Modell, dass dem Threonin an der Position 365 nicht nur eine regulatorische Rolle zukommt, sondern dass es selbst auch phosphoryliert werden kann. Demnach ermöglicht erst die Phosphorylierung des Threonins (T365) die Phosphorylierung weiterer potenzieller Phosphorylierungsstellen. S362 stellt die zweite Stelle dar, die phosphoryliert wird. Im Anschluss daran wird entweder die Positionen S358 oder S371 phosphoryliert.

Das hier für die multiple Phosphorylierung des Rh1-Rhodopsins von *Drosophila* aufgestellte Modell entspricht im Wesentlichen den Erkenntnissen, die über die Phosphorylierung des Wirbeltier-Rhodopsins bekannt sind. Die Rhodopsine von Rind und Maus können unter extremen Lichtbedingungen *in vitro* an je bis zu sieben Stellen phosphoryliert werden (WILDEN & KÜHN, 1982; MENDEZ *et al.*, 2000). In der Regel werden *in vitro* jedoch nur Phosphorylierungen von bis zu drei Phosphatgruppen pro Rhodopsin-Molekül gemessen. In einer Reihe von Publikationen wird diskutiert, dass die Rhodopsin-Phosphorylierung sequenziell erfolgt, wobei sich hinsichtlich der Reihenfolge geringfügige Abweichungen ergeben. Massenspektroskopische Untersuchungen an Rhodopsin, das in isolierten Stäbchenaußensegmenten (ROS) der Rinderretina phosphoryliert wurde, ergaben, dass in monophosphoryliertem Rhodopsin vorrangig entweder der Serinrest S338 oder S343 eine Phosphatgruppe trägt (PAPAC *et al.*, 1993; MCDOWELL *et al.*, 1993; OHGURO *et al.*, 1993, 1994, 1996). Welche Form des monophosphorylierten Opsins dabei überwiegt, scheint wiederum von den experimentellen Bedingungen abzuhängen. Im Falle eines multiplen Phosphateinbaus wird zuerst S338 (OHGURO *et al.*, 1993, 1994) oder S343 (PULLEN & AKHTAR, 1994) phosphoryliert, dann das jeweils andere Serin. Der dritte Phosphatrest wird an T336 gekoppelt (PULLEN & AKHTAR, 1994). OHGURO *et al.* (1993) diskutieren, dass die Reihenfolge der Zweit- und Dritt-Phosphorylierung an S343 bzw T336 variabel ist. Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass Wirbeltierrhodopsin vorrangig an drei Aminosäuren, S338, S343 und T336, phosphoryliert wird. Dabei dient eines der beiden Serine als primärer Phosphataktzeptor. In geringem Umfang können jedoch auch S334, T335, T340 und T342 phosphoryliert werden (MCDOWELL *et al.*, 1993; PULLEN & AKHTAR, 1994; MENDEZ *et al.*, 2000). Bei Untersuchungen von *in vivo* phosphoryliertem Opsin, die prinzipiell geeigneter erscheinen, die tatsächliche Abfolge der Phosphorylierungsschritte aufzuzeigen, konnten bis jetzt jedoch ausschließlich monophosphorylierte Rhodopsine nachgewiesen werden (OHGURO *et al.*, 1995, 1996). Vermutlich verhindert die im Photorezeptor vorhandene Rhodopsinphosphatase die Akkumulation höher phos-

phorylierter Rhodopsin-Spezies. Die bevorzugten Phosphorylierungsstellen entsprechend weitgehend den *in vitro* ermittelten: S338, S343 und S344 (OHGURO *et al.*, 1996).

Die Untersuchungen am Wirbeltier-Rhodopsin zeigen zum einen, dass die induzierte Phosphorylierung mit großer Wahrscheinlichkeit sequenziell abläuft, auch wenn es geringfügige Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen einzelner Studien gibt. Zum anderen zeigt sich, dass zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze zur Aufstellung und Absicherung eines Modells für die sequenzielle Phosphorylierung notwendig sind: die Mutantanalyse, die auch die regulativen Funktionen einzelner Aminosäuren aufzeigen kann, und die Massenspektroskopie, die untersucht, welche Aminosäuren tatsächlich phosphoryliert werden. Der letztgenannte Aspekt schließt sich direkt an die hier vorgestellten Untersuchungen an und wird zur Zeit im Rahmen einer fortführenden Doktorarbeit untersucht.

### **5.5 Einfluss der Phosphorylierung auf die Deaktivierung der Reizantwort**

Physiologische Auswirkungen der in das Rhodopsin eingebrachten Mutationen lassen sich anhand von Aufzeichnungen von Elektroretinogrammen (ERG) nachweisen. Das Modellsystem von *Drosophila melanogaster* ist hierzu sehr gut geeignet, da sich bei *Drosophila*, im Vergleich zum Aufwand bei der Herstellung von Mutanten bei Wirbeltieren, in relativ kurzer Zeit und relativ einfach gewünschte Mutanten erzeugen lassen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Substitution einzelner potenziell phosphorylierbarer Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Rh1-Rhodopsins keinen Einfluss auf die Aktivierung der Transduktionskaskade ausüben. Das entspricht den Erwartungen, da die Mutante, bei der alle Serin- und Threoninreste durch ein Alanin ersetzt sind, ebenfalls eine Aktivierung der Transduktionskaskade auslöst (SCHILLO, 2001). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass durch die Substitution einzelner im C-terminalen Bereich vorkommender Serine oder Threonine keine Defekte in der Deaktivierung der Reizantwort

auftreten. Nach Photoregeneration vom Metarhodopsin zum Rhodopsin kommt es bei allen Phosphorylierungsmutanten zu einer dem Wildtyp ähnlichen Repolarisation der Rezeptorzelle aus dem PDA-Zustand. Dies steht im Einklang mit dem ERG der *Drosophila*-Mutante, bei der der alle Phosphorylierungsstellen umfassende C-terminale Bereich deletiert wurde. Auch hier konnten keine Defekte in der Deaktivierung gezeigt werden (VINÓS *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigt die Mutante Rh1<sup>P1-6→A</sup>, bei der alle Serin- bzw. Threoninreste durch ein Alanin ersetzt worden sind, einen leichten Deaktivierungseffekt, der sich in einer leicht verzögerten Rückkehr aus dem PDA zur Basislinie äußert (siehe Abb. 4.14). Es wurde zunächst angenommen, dass dieser Defekt auf die fehlende Phosphorylierung des Rezeptors zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung wurde dabei als Teilschritt intramolekularer Konformationsänderungen angesehen, bei denen das Rhodopsin vollständig durch Lichtreaktionen in seine Ausgangskonformation, den P-Zustand, überführt wird. Da aber bei einer anderen Phosphorylierungs-Mutante (Rh1 T365A) ebenfalls keine Phosphorylierung des Rezeptors gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Phosphorylierung des Rezeptors in keinem direkten Zusammenhang mit der Deaktivierung des Rezeptors steht. Die leicht verlangsamte Rückkehr zum Ruhepotential lässt sich demnach bei der Rh1P<sup>P1-6→A</sup>-Mutante vermutlich auf zu massive, strukturelle Veränderungen durch die sechs im C-terminalen Bereich ausgetauschten Aminosäuren zurückführen.

Alle Phosphorylierungs-Mutanten mit Ausnahme der Rh1 S367A-Mutante zeigen bei Blaubeleuchtung im Vergleich zum Wildtyp einen normalen Eintritt ins PDA. Die bei der Rh1 S367A fehlende deutliche Bildung eines PDA ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den gegenüber dem Wildtyp verminderten Rhodopsingehalt zurückzuführen. So generiert die Blaubeleuchtung zwar dasselbe Verhältnis (P 30 %, M 70 %), absolut gesehen enthält die Photorezeptormembran aufgrund der geringen Gesamt-Menge vom Rhodopsin (48 %) jedoch nur circa 34 % Metarhodopsin anstelle von 70 %. Die Gesamtmenge des gebildeten Metarhodopsins liegt damit in der Nähe der 20 % Grenze, bei der die Bildung eines PDAs durch das vorhandene Arrestin vollständig

blockiert wird. Mit Blick auf Abb. 4.3.4 kann davon ausgegangen werden, dass die an das Metarhodopsin gebundene Arrestin2-Menge in Wildtyp Fliegen und der Rh1 S367A-Mutante gleich ist. Diese These wird zusätzlich dadurch gestützt, dass in einer zweiten Linie dieser Mutante (Rh1 S367A/2), die einen fast doppelt so hohen Rhodopsingehalt (80 %) aufweist, ein deutliches PDA erzeugt wird. Hier wurden im Vergleich zum Wildtyp (70 %) nur 56 % Metarhodopsin gebildet.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass weder die Phosphorylierung einzelner potenzieller Phosphorylierungsstellen noch die Aminosäuren Serin oder Threonin bei der Deaktivierung eine Rolle spielen. Der Phosphorylierung des Rh1-Rhodopsins muss demnach eine andere wichtige Funktion zukommen.

## 5.6 Metarhodopsinphosphorylierung als Signal für Internalisierung

Die Internalisierung und Degradation membranständiger Rezeptorproteine ist ein weit verbreiteter Mechanismus, mit dem Zellen ihre Leistungen an Veränderungen von äusseren Signalen anpassen (KRUPNICK & BENOVIĆ, 1998; FERGUSON, 2001). Bei vielen GPCR stellt die reizinduzierte Phosphorylierung einen Regulationsmechanismus für die Internalisierung dar (FERGUSON *et al.*, 1995; NAIK *et al.*, 1997; PALS-RYLAARSDAM & HOSEY *et al.*, 1997). Es gibt jedoch auch GPCRs, die phosphorylierungsunabhängig internalisiert werden (MALECZ *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird nun gezeigt, dass die lichtinduzierte Degradation des Rh1-Rhodopsins von *Drosophila melanogaster* phosphorylierungsabhängig ist. Unter Lichtbedingungen, bei denen ständig Rhodopsin in Metarhodopsin umgewandelt wird, während gleichzeitig die Photoregeneration des Chromophors verhindert ist, nimmt die Gesamtmenge des Sehfärbstoffes im Photorezeptor bei Wildtyp-Fliegen ab. Entsprechendes gilt für Mutante Rh1 S358A, deren lichtinduzierte Opsinphosphorylierung verglichen mit den Wildtyp um 34 % reduziert ist. In der Mutante Rh1 S362A (Reduktion der Metarhodopsinphosphorylierung um 66 %) bleibt die Sehfärbstoffmenge innerhalb der ersten 24 Stunden nach Belichtung konstant. Dieser

Effekt wurde bereits von SCHILLO (2001) für die nicht phosphorylierbare Mutante Rh1<sup>P1-6→A</sup> beschrieben.

Im geschilderten Essay wurde die Gesamtmenge des spektralphotometrisch nachweisbaren Sehfärbstoffes, Rhodopsin und Metarhodopsin, im Fliegenauge bestimmt. Diese Messung erfasst sowohl Sehfärbstoffmoleküle in der rhabdomerischen Mikrovillusbillembran, als auch intakte Moleküle in internalisierten Vesikeln. Eine Abnahme der Sehfärbstoffmenge ist daher gleichbedeutend mit einer Degradation des Sehfärbstoffes, beginnend mit der Aufspaltung in Chromophor und Apoprotein. Die Messergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass die Degradation des Rh1-Rhodopsins unter den geschilderten Belichtungsbedingungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Belichtungsbeginn phosphorylierungsabhängig ist. Näherungsweise konnte in der vorliegenden Arbeit ein Phosphorylierungsschwellenwert von 50 % bestimmt werden. Bei Reduktion der Gesamt-Sehfärbstoff-Phosphorylierung um 1/3 erfolgt eine Degradation wie im Wildtyp, während bei einer Reduktion um 2/3 die Degradation komplett geblockt ist.

Auch für andere GPCRs wird beschrieben, dass die Stimulierung der Internalisierung durch die Rezeptorphosphorylierung nicht nach einem Alles-oder Nichts-Prinzip erfolgt, sondern von der Anzahl der gebundenen Phosphate abhängt. So ist vom Step2, einem Pheromon-Rezeptor von *Saccharomyces cerevisiae*, bekannt, dass er in der Zelle konstitutiv phosphoryliert vorliegt, und nach Aktivierung durch Ligandenbindung hyperphosphoryliert wird. Im Falle von Step2 ist die Hyperphosphorylierung eine der Voraussetzungen für die Internalisierung des Rezeptors (HICKE *et al.*, 1998). Damit ist erstmals eine physiologische Rolle der Metarhodopsin-Phosphorylierung beim Proteinturnover in Photorezeptorzellen beschrieben. KISELEV *et al.* (2000) leiten aus ihren Arbeiten ab, dass phosphoryliertes, internalisiertes Metarhodopsin eine Apoptose der Photorezeptorzelle auslösen kann. Diese Funktion der Metarhodopsin-Phosphorylierung kann jedoch nicht als physiologisch relevant gelten, da die terminal differenzierten Sinneszellen im Auge der Fliege unter normalen Umweltbedingungen keine Apoptose durchlaufen.

Zusätzlich zu der oben diskutierten, phosphorylierungs-abhängigen Degradation des Rh1-Opsins ist ein weiterer Abbauweg anzunehmen. Nach einer längeren konstanten Belichtung (fünf Tage) ist zu beobachten, dass in allen drei untersuchten Stämmen eine ähnliche Abnahme des Rhodopsingehalts erfolgt. Dies weist darauf hin, dass man zwischen einer schnellen phosphorylierungsabhängigen Degradation und einer langsamen phosphorylierungsunabhängigen Degradation des Rezeptors unterscheiden kann. Diese beiden Wege sind unter den Bedingungen des Grünlichtexperimentes deutlich zu erkennen.

Folgendes Modell lässt sich für die beiden Degradationswege des Rh1-Rhodopsins postulieren:

Von den  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist bekannt, dass eine kurze Expositionszeit (bis zu einer Stunde) mit dem Agonisten zu einer Internalisierung des Rezeptors führt. Dieser wird im endozytotischen Kompartiment dephosphoryliert und zur Membran zurücktransportiert. Eine lange Exposition des Rezeptors mit dem Agonisten (Stunden oder Tage) führt zu einer Rezeptor-Degradation (SHENOY *et al.*, 2001). Die Entscheidung für eine Internalisierung oder Degradation des Rezeptors fällt dabei durch das Protein Ubiquitin. Nach Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors bindet  $\beta$ -Arrestin2. Bei einer Kurzzeitexposition kommt es zur Ubiquitinylierung des  $\beta$ -Arrestin2, und der Komplex wird internalisiert. Bei einer Langzeitexposition kommt es dagegen zu einer Ubiquitinylierung des Rezeptors, die letztendlich die Degradation des Rezeptors einleitet.

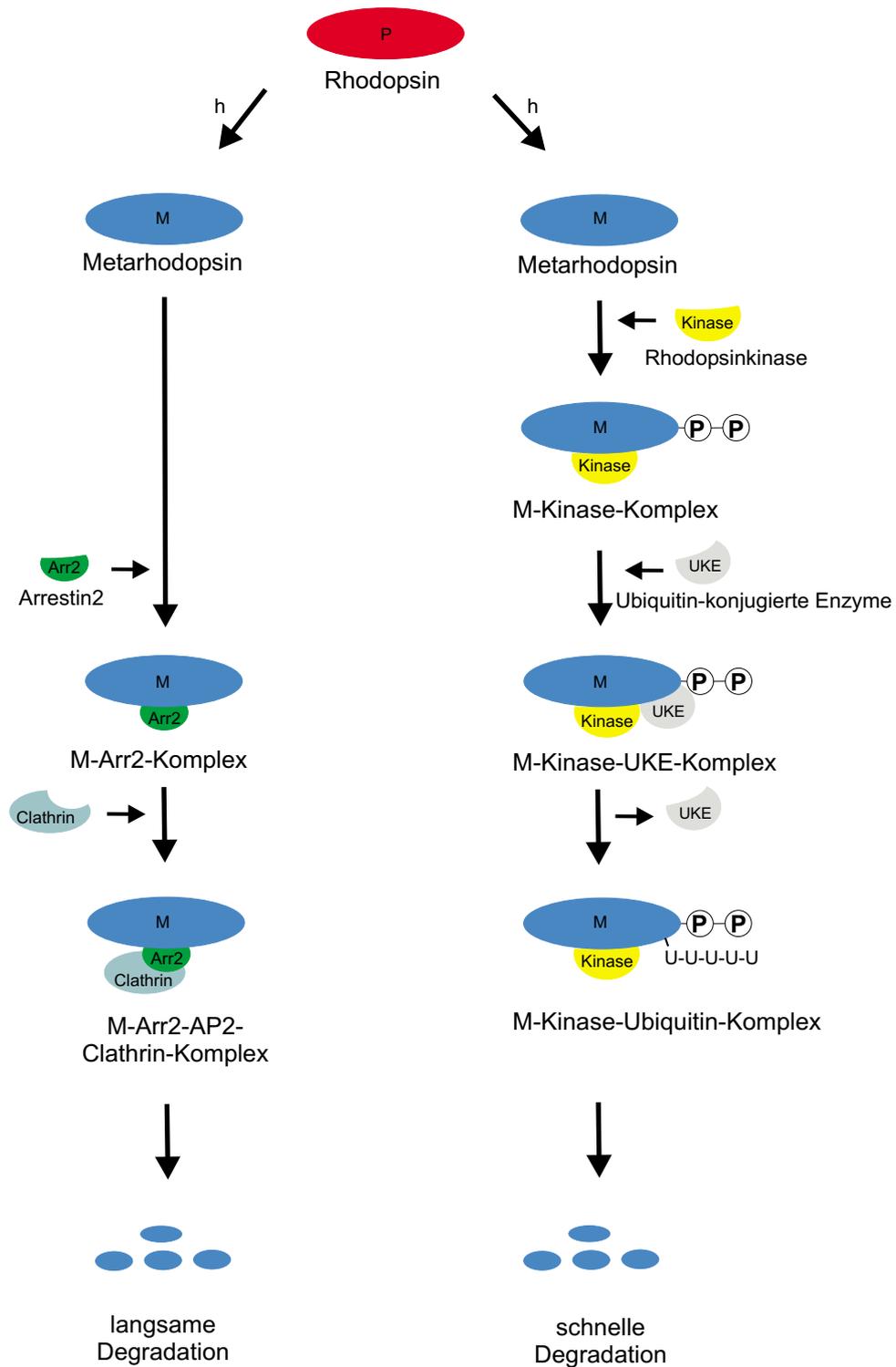


Abbildung 5.2: Hypothetische Mechanismen zur Degradation von Rhodopsin in den Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster*. Einzelne Schritte des Schemas sind im Text beschrieben.

Auch bei Sehfärbstoffen ist davon auszugehen, dass ihre Ubiquitinylierung eine regulatorische Funktion hat. So wurde für Vertebraten-Rhodopsin gezeigt, dass es ubiquitinyliert werden kann (OBIN *et al.*, 1996). Für die Photorezeptorzelle von *Drosophila melanogaster* ist nachgewiesen, dass Opsin mit Ubiquitin in Abbauorganellen der photorezeptiven Membran, Endosomen und cytosolischen Pigmentgranula, koloalisiert ist (SCHWAB, 1998). Die Ubiquitinylierung wird daher als Markierung des Opsins für den lysosomalen Abbau diskutiert.

Der Weg der Opsindegradation, die sich unter Grünlichtbedingungen als „schneller Abbau“ darstellt, würde über eine phosphorylierungsabhängige Ubiquitinylierung des Metarhodopsins ausgelöst (siehe Abb. 5.2 rechts). Er ist vergleichbar der oben beschriebenen Degradation des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors bei langer Agonist-Exposition. Dieser Weg ist Arrestin2-unabhängig, was dadurch Bestätigung findet, dass die Arrestin2-Bindung phosphorylierungsunabhängig ist (siehe 4.3.4).

Der Weg, der unter Grünlichtbedingungen als „langsam“ beschriebenen Opsininternalisierung und -degradation könnte über die Bindung von Arrestin2 und Clathrin ausgelöst werden, wie von ALLOWAY *et al.* (2000) und KISELEV *et al.* (2000) beschrieben wird. (siehe, Abb. 5.2 links).

Unter physiologischen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, dass beide Mechanismen ineinandergreifen und damit eine Feinsteuerung des Sehfärbstoffabbaus bewirken.



## A. Literaturverzeichnis

ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE J. D., AMANATIDES, P. G., SCHERER, S. E., LI, P. W., HOSKINS, R. A., GALLE, R. F. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.

ALLOWAY, P. G., HOWARD, L., AND DOLPH, P. J. (2000). The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. *Neuron* 28, 129–138.

APPELBURRY, M. L. AND HARGRAVE, P. A. (1986). Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res.* 26, 1881–1895.

ATTRAMADAL, H., ARRIZA, J. L., AOKI, C., DAWSON, T. M., CODINA, J., KWATRA, M. M., SNYDER, S. H., CARON, M. G., AND LEFKOWITZ, R. J. (1992).  $\beta$ -Arrestin2, a novel member of the arrestin/ $\beta$ -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 17882–17890.

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  $G\alpha_q$  to phospholipase  $C\beta$ . *J. Biol. Chem.* 275, 2901–2904.

BENTROP, J., AND PAULSEN, R. (1986). Light-modulated ADP-ribosylation, protein phosphorylation and protein binding in isolated fly photoreceptor membranes. *Eur.J. Biochem.* 161, 61–67.

- BENTROP, J. (1998). Rhodopsin Mutations as the cause of retinal degeneration. *Acta Anat.* 162, 85–94.
- BENTROP, J., PLANGGER, A., AND PAULSEN, R. (1993). An arrestin homolog of blowfly photoreceptors stimulates visual-pigment phosphorylation by activating a membrane-associated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 216, 67–72.
- BENTROP, J., SCHWAB, K., PAK, W.L., AND PAULSEN, R. (1997). Site-directed mutagenesis of highly conserved amino acids in the first cytoplasmic loop of *Drosophila* Rh1 opsin blocks rhodopsin synthesis in the nascent state. *EMBO J.* 16, 1600–1609.
- BLOOMQUIST, B.T., SHORTRIDGE, R. D., SCHNEUWLY, S., PEDREW, M., MONTELL, C., STELLER, H., RUBIN, G. M., AND PAK, W. L. (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila norpA* and its role in phototransduction. *Cell* 54, 723–733.
- BLUMENFELD, A., ERUSALIMSKY, J., HEICHAL, O., SLINGER, Z., MINKE, B. (1985). Light activated guanosinetriphosphatase in *Musca* eye membranes resembles the prolonged depolarizing afterpotential in photoreceptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7116–7120.
- BRITT, S. G., FEILER, R., KIRSCHFELD, K. AND ZUKER, C. S. (1993). Spectral tuning of rhodopsin and metarhodopsin *in vivo*. *Neuron* 11, 29–39.
- BYK, T., BAR-YAACOV, M., DOZA, Y. N., MINKE, B., AND SELINGER, Z. (1993). Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the photoreceptor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1907–1911.
- CALMAN, B., ANDREWS, A. W., RISSLER, H. M., EDWARDS, S. C., AND BATTELLE, B. A. (1996). Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II and arrestin phosphorylation in *Limulus* eyes. *J. Photochem. Photobiol. B* 35, 33–44.

- CHEN, C. Y., DION, S. B., KIM, C. M., AND BENOVIC, J. L. (1993). Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J. Biol. Chem.* 268,7825–7831.
- CHEN, J., MAKINO, C. L., PEACHEY, N. S., BAYLOR, D. A., AND SIMON, M. I. (1995) Mechanism of rhodopsin inactivation *in vivo* as revealed by a COOH-terminal truncation mutant . *Science* 267, 374–377.
- CHEN, C. K., ZHANG, K., CHURCH-KOPISH, J., HUANG, W., ZHANG, H., CHEN, Y. J., FREDERICK, J. M. AND BAEHR, W. (2001). Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase. *Mol.Vis.* 7, 305–313.
- CHABRE, M. AND DETERRE, P. (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* 179, 255–266.
- CHOU, W., HALL K. J., WILSON, D. B., WIDEMAN, C. L., TOWNSON, S. M., CHADWELL, L. V., BRITT, S. G. (1996). Identification of a novel *Drosophila* opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells. *Neuron* 17, 1101–1115.
- CHYB, S., RAGHU, P., AND HARDIE, R. C. (1999). Poly-unsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397, 255–259.
- COOK, B., AND MINKE, B. (1999). TRP and calcium stores in *Drosophila* phototransduction. *Cell Calcium* 25, 161–171.
- COWMAN, A. F., ZUKER, C. S., AND RUBIN, G. M. (1986). An opsin gene expressed in only one photoreceptor cell type of the *Drosophila* eye. *Cell* 44, 705–710.
- CRAFT, C. M., WHITMORE, D. H., AND WIECHMANN, A. F. (1993). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* 269, 4613–4619.

- DANSCHER, G. (1981). Localization of gold in biological tissue: a method for light and electron microscopy. *Histochemistry* 71, 81–88.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6939–6943.
- DE COUET, H. G. AND TANIMURA, T. (1987). Monoclonal antibodies provide evidence that rhodopsin in the outer rhabdomeres of *Drosophila melanogaster* is not glycosylated. *Eur. J. Cell Biol.* 44, 50–56.
- 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.
- FERGUSON, S. S. G., MÉNARD, L. S., BARAK, KOCH, W. J., COLAPIETRO, A.-M. AND CARON, M. G. (1995). Role of phosphorylation in agonist-promoted beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor sequestration: rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta-ARK1. *J. Biol. Chem.* 270, 24782–24789.
- FERGUSON, S. S. G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53, 1–24.
- FOURNEY, R. M., MIYAKOSHI, J., DAY, R. S., III, AND PATERSON, M. C. (1989). Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10/1, 5–6.
- FRANCHESCHINI, N. (1972). Pupil and pseudopupil in the compound eye of *Drosophila*. In: *Information processing in the visual system of arthropods* (ed. Wehner, R.), 75–82. Springer, New York.
- FRYXELL, K. J., AND MEYEROWITZ, E. M. (1987). An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila*. *EMBO J.* 6, 443–451.

- GÄRTNER, W., AND TOWNER, P. (1995). Invertebrate visual pigments. *Photochem. Photobiol.* 62, 1–16.
- GÄRTNER, W. (2000). Invertebrate visual pigments. *Handbook of biological Physics* Vol 3, D. G. Stavenga, W. J. DeGrip and E. N. Pugh ed. (Elsevier Science B. V.), 297–388.
- GIBSON, S. K., PARKES, J. H., AND LIEBMANN, P. A. (2000). Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin. *Biochemistry* 39, 5738–5749.
- GUREVICH, V. V., AND BENOVIC, J. L. (1992). Cell-free expression of visual arrestin. *J. Biol. Chem.* 267, 21919–21923.
- GUREVICH, V. V., AND BENOVIC, J. L. (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 268, 11628–11638.
- HAMDORF, K. AND RAZMJOO, S. (1979). Photoconvertible pigment states and excitation in *Calliphora*; the induction and properties of the prolonged depolarizing afterpotential. *Biophys. Struct. Mechanism* 5, 137–161.
- HARDIE, R.C. (1985). Functional organization of the fly retina. *Progress in Sensory Physiology* 5, H. Autrum, D. Ottoson, E.R. Perl, R.F. Schmidt, H. Shimazu, and W.D. Willis, eds. (New York: Springer Verlag), 1–79.
- HARGRAVE, P. A., MCDOWELL, J. H., CURTIS, D. R., WANG, J. K., JUSZCZAK, E., FONG, S. L., RAO, J. K. M., AND ARGOS, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mechanism* 9, 235–244.
- HENRICH, S. (1998). Spektralphotometrische Charakterisierung der Rhodopsine im Komplexauge von *Drosophila melanogaster* nach ektopischer Expression in den Photorezeptorzellen R1-6. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.

- HICKE, L., ZANOLARI, B., AND RIEZMAN, H. (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the  $\alpha$ -factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell. Biol.* 141, 349–358.
- HOFMANN, K. P., PULVERMÜLLER, A., BUCZYLKO, J., HOOSER, P. V., AND PALCZEWSKI, K. (1992). The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 267, 15701–15706.
- HOFMANN, K. P. AND HECK, M. (1996). Light-induced protein-protein interactions on the rod photoreceptor disc membrane. *Biomembranes* 2A, 141–198.
- HUBER, A., WOLFRUM, U., AND PAULSEN, R. (1994). Opsin maturation and targeting to rhabdomeral photoreceptor membranes requires the retinal chromophore. *Eur. J. Cell Biol* 63, 219–229.
- HUBER, A., SCHULZ, S., BENTROP, J., GROELL, C., WOLFRUM, U., PAULSEN, R. (1997). Molecular cloning of *Drosophila* Rh6 rhodopsin: the visual pigment of a subset of R8 photoreceptor cells. *FEBS Lett.* 406, 6–10.
- HUBER, A., SANDER, P., AND PAULSEN, R. (1998). The TRP Ca<sup>2+</sup> 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.
- KATANOSAKA, K., TOKUNAGA, F., KAWAMURA, S., OZAKI, K. (1998). N-linked glycosylation of *Drosophila* rhodopsin occurs exclusively in the amino-terminal domain and functions in rhodopsin maturation. *FEBS Lett.* 424, 149–154.
- KIKKAWA, S., YOSHIDA, N., NAKAGAWA, M., IWASA, T., AND TSUDA, M. (1998). A novel rhodopsin kinase in octopus photoreceptor possesses a pleckstrin homology domain and is activated by G protein betagamma-subunits. *J. Biol. Chem.* 273, 7441–7447.

- KISELEV, A., AND SUBRAMANIAM, S. (1994). Activation and regeneration of rhodopsin in the insect visual cycle. *Science*, 266, 1369–1373.
- KISELEV, A., AND SUBRAMANIAM, S. (1997). Studies of Rh1 metarhodopsin stabilization in wild-type *Drosophila* and in mutants lacking one or both arrestins. *Biochemistry* 36, 2188–2196.
- KISELEV, A., SOCOLICH, M., VINÓS, J., HARDY, R. W., ZUKER, C. S., RANGANATHAN, R. (2000). A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* 28, 139–152.
- KOMORI, N., USUKURA, J., KURIEN, B., SHICHI, H. MATSUMOTO, H. (1994). Phosrestin I, an arrestin homolog that undergoes light-induced phosphorylation in dipterian photoreceptors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 607–617.
- KÖNIG, B., ARENDT, A., J. H., KAHLERT, M., HARGRAVE, P. A., HOFMANN, K. P. (1989). Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6878–6882.
- KRUPNICK & BENOVIĆ (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 289–319.
- LANGER, H., AND THORELL, B. (1966). Microspectrophotometrie of single rhabdomeres in the insect eye. *Exp. Eye Res.* 123–156.
- LEVINE, H. (1999). Structural Features of Heterotrimeric G-Protein-Coupled Receptors and Their Modulatory Proteins. *Mol. Neurobiol.* 19, 111–149.
- LI, Z. Y., WONG, F., CHANG, J. H., POSSIN, D. E., HAO, Y., PETERS, R. M., AND MILAM, A. H. (1998). Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invet. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 808–819.

- LOHSE, M. J., BENOVIĆ, J. L., CODINA, J., CARON, M. G., AND LEFKOWITZ, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550.
- LORENZ, W., INGLESE, J., PALCZEWSKI, K., ONORATO, J. J., CARON, M. G., AND LEFKOWITZ, R. J. (1991). The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8715–8719.
- MALECZ, N., BAMBINO, T., BENCSIK, M., AND NISSENSON R. A. (1998). Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol. Endocrinol.* 12, 1846–1856.
- MATSUMOTO, H., AND YAMADA, T. (1991). Phosrestin I and II: arrestin homologs which undergo differential light-induced phosphorylation in the *Drosophila* photoreceptor *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 1306–1312.
- MATSUMOTO, H., KURIEN, B. T., TAKAGI, Y., KAHN, E. S., KINUMI, T., KOMORI, N., YAMADA, T., HAYASHI, F., ISONO, K., PAK, W. L., JACKSON, K. W., AND TOBIN, S. L. (1994). Phosrestin I undergoes the earliest light-induced phosphorylation by a calcium/calmodulin dependent protein kinase in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 12, 997–1010.
- MCDOWELL, J. H., NAWROCKI, J. P., AND HARGRAVE, . A. (1993). Phosphorylation sites in bovine rhodopsin. *Biochemistry* 32, 4968–4974.
- MILLER, J. A., PAULSEN, R., BOWNS, M.D. (1977). Control of light-activated phosphorylation in frog photoreceptor membranes. *Biochemistry* 16, 2633–9.
- MIN, L., GALET, C., AND ASCOLI, M. (2002). The association of arrestin-3 with the human lutropin/choriogonadotropin receptor depends mostly on receptor activation rather than on receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 702–710.

- MENDEZ, A., BURNS, M. E., ROCA, A., LEM, J., WU, L.-W., SIMON, M. I., BAYLOR, D. A., AND CHEN, J. (2000). Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron* 28, 153–164.
- MINKE, B., WU, C.-F., AND PAK, W.L. (1975). Isolation of light-induced response of central reticular cells from electroretinogramm of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol.* 98, 345–355.
- MONTELL, C., JONES, K., ZUKER, C., AND RUBIN, G. (1987). A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 7, 1558–66.
- MONTELL, C., J. (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 231–268.
- NAIK, N., GIANNINI, E., BROUCHON, L., AND BOULAY, F. (1997). Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J. Cell Sci.* 110, 2381–2390.
- NEU, G. (1998). Gerichtete Mutagenese multipler Phosphorylierungsstellen des Rhodopsins Rh1 von *Drosophila melanogaster*, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- OBIN, M. S., JAHNGEN-HODGE, J., NOWELL, T., AND TAYLOR, A. (1996). Ubiquitinylation and ubiquitin-dependent proteolysis in vertebrate photoreceptors (rod outer segments). Evidence for ubiquitinylation of Gt and rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 271, 14473–14484.
- OHGURO, H., PALCZEWSKI, K., ERICSSON, L. H., WALSH, K. A., JOHNSON, R. S. (1993). Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* 32, 5718–5724.

- OHGURO, H., JOHNSON, R. S., ERICSSON, L. H., WALSH, K. A., AND PALCZEWSKI, K. (1994). Control of rhodopsin multiple phosphorylation. *Biochemistry* 33, 1023–1028.
- OHGURO, H., VAN HOOSER, J. P., MILAM, A. H., AND PALCZEWSKI, K. (1995). Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 14259–14262.
- OHGURO, H., RUDNICKA-NAWROT, M., BUCZYLKO, J., ZHAO, X., TAYLOR, J. A., WALSH, K. A., AND PALCZEWSKI, K. (1996). Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271, 5215–5224.
- ONORATO, J. J., PALCZEWSKI, K., REGAN, J. W., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J., AND BENOVIC, J. L. (1991). Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry* 28, 5118–5225.
- O'TOUSA, J. E., BAEHR, W., MARTIN, R. L., HIRSH, J., PAK, W. L., APPLEBURY, M. L. (1985). The *Drosophila nina E* gene encodes an opsin. *Cell* 40, 839–850.
- OVCHINNIKOV, Y. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Y., ARTAMONOV, I. D., ZOLOTAREV, M. S., KOSTINA, M. B., BOGACHUTE, A. S., MIRISHINIKOV, A., ARTYNOV, V., AND KUDELIN, A. B. (1982). The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. *Bioorg. Khim.* 8, 1011–1014.
- OVCHINNIKOV, Y. A., ABDULAEV, N. G., BOGACHUK, A. S. (1988). Two adjacent cystein residues in the C-terminal cytoplasmatic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett.* 230, 1–5.
- PALCZEWSKI, K., MCDOWELL, J. H., JAKES, S., INGBRITSEN, T. S., AND HARGRAVE, P. A. (1989). Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin. *J. Biol. Chem.* 264, 15770–15773.

- PALCZEWSKI, K., ARENDT, A., MCDOWELL, J. H., AND HARGRAVE, P. A. (1989). Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions, and polycations. *Biochemistry* 31,8764–8770.
- PALCZEWSKI, K., BUCZYLKO, J., KAPLAN, M. W., POLANS, A. S., AND CRABB, J. W. (1991). Mechanism of rhodopsin kinase activation. *J. Biol. Chem.* 266, 12949–12955.
- PALCZEWSKI, K., AND SAARI, J. C. (1997). Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Current Opinion In Neurobiol.* 7, 500–504.
- PALS-RYLAARSDAM & HOSEY (1997). Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 14152–14158.
- PAPAC, D. I., OATIS, J. E., CROUCH R. K., KNAPP, D. R. (1993). Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in bleached bovine rhodopsin. *Biochemistry* 32, 5930–5934.
- PAULSEN, R. (1984). Spectral characteristics of isolated blowfly rhabdoms. *J. Comp. Physiol. A*, 155, 47–55.
- PAULSEN, R. AND BENTROP, J. (1984). Reversible phosphorylation of opsin induced by irradiation of blowfly retinae. *J. Comp. Physiol. A* 155, 39–45.
- PAULSEN, R. AND BENTROP, J. (1986). Light-modulated biochemical events in fly photoreceptors. *Aus: Fortschritte der Zoologie, Band 33*, H. C. Lüttgau, ed. (Stuttgart New York: Gustav Fischer Verlag), 299–319.
- PAULSEN, R. BÄHNER, M., BENTROP, J., SCHILLO, M., SCHULZ, S., AND HUBER, A. (2001). The molecular design of a visual cascade: Assembly of the *Drosophila* phototransduction pathway into a supramolecular signaling complex. In series on biophysics and bioenergetics Vol. 11, C. Musio, ed. (World Scientific Publishing), 60–73.

- PAULSEN, R., BÄHNER, M., HUBER, A., SCHILLO, M., SCHULZ, S., WOTTRICH, R., AND BENTROP, J. (2001). The molecular design of a visual cascade: Molecular stages of phototransduction in *Drosophila*. In series on biophysics and bioenergetics Vol. 11, C. Musio, ed. (World Scientific Publishing), 41–59.
- PITCHER, J. A., FREEDMAN, N. J., AND LEFKOWITZ, R. J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653–692.
- PLANGGER, A., MALICKI, D., WHITNEY, M., AND PAULSEN, R. (1994). Mechanism of arrestin2 function in rhabdomeric photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 269, 26969–26975.
- POLLOCK, J. A., BENZER, S. (1988). Transcript localisation of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. *Nature* 333, 779–782.
- PULLEN, N., AND AKHTAR, M. (1994). Rhodopsin kinase: studies on the sequence of and the recognition motif for multiphosphorylations. *Biochemistry* 33, 14536–14542.
- RANGANATHAN, R. AND STEVENS, C. F. (1995). Arrestin binding determines the rate of inactivation of the G-protein-coupled receptor rhodopsin *in vivo*. *Cell* 81, 841–848.
- ROMAN, G., HE, J., AND DAVIS, R. L. (2000). kurtz, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in *Drosophila*. *Genetics* 155, 1281–1295.
- RUBIN, G. M., YANDELL, M. D., WORTMAN, J. R., GABOR, M. G., NELSON, C. R., HARIHARAN, I. K., FORTINE, M. E., LI, P. W., APWEILER, R., FLEICHMANN, W., CHERRY, J. M., HENIKOFF, S., SKUPSKI, M. P., MISRA, S., ASHBURNER, M., BIRNEY, E., BOGUSKI, M. S., BRODY, T., BROKSTEIN, P., CELNIKER, S. E., CHERVITZ, S. A., COATES, D., CRAVCHIK, A., GABRIELIAN, A., GALLE, R. F., GELBART, W. M., GEORGE, R. A., GOLDSTEIN, L. S., GONG, F., GUAN, P., HARRIS, N. L., HAY, B. A., HOSKINS, R. A.,

- LI, J., LI, Z., HYNES, R. O., JONES, S. J., HUEHL, P. M., LEMAITRE, B., LITTLETON, J. T., MORRISON, D. K., MUNGALL, C., O'FARREL, P. H., PICKERAL, O. K., SHUE, C., VOSSHALL, L. B., ZHANG, J., ZHAO, Q., ZHENG, X. H., ZHONG, F., ZHONG, W., GIBBS, R., VENTER, J. C. ADAMS, M. D., AND LEWIS, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204–2215.
- SALCEDO, E., HUBER, A., HENRICH, S., CHADWELL, L. V., CHOU, W. H., PAULSEN, R., AND BRITT, S. G. (1999). Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J. Neurosci.* 19, 10716–10726.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., AND MANIATIS, T. (1989). *Aus: Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press *second ed.*
- SCARVADA, N. J., O'TOUSA, J. E., AND PAK, W. L. (1983). *Drosophila* locus with gene-dosage effects on rhodopsin. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 80, 4441–4445.
- SCHILLO, M. (1997). Rekombinante Expression und funktionelle Charakterisierung von Arrestin 1 und Arrestin 2 aus *Calliphora erythrocephala*. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- SCHILLO, M. (2001). Deaktivierung und Regeneration des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Rhodopsin im Komplexauge von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- SCHLEICHER, A., KÜHN, H., AND HOFMANN, K. P. (1989). Kinetics, binding constant and activation energy of the 48 kDa protein-rhodopsin complex by extrametarhodopsin II. *Biochemistry* 28, 1770–1775.

- SCHULZ, S., HUBER, A., SCHWAB, K., AND PAULSEN, R. (1999). A novel G $\gamma$  isolated from *Drosophila* constitutes a visual G protein  $\gamma$  subunit of the fly compound eye. *J. Biol. Chem.* 274, 37605–37610.
- SCHWAB, M. (1998). Membranturnover und retinale Degeneration in Rhodopsin-Mutanten von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- SCHWEMER, J. (1984). Renewal of visual pigment in photoreceptors of blowfly. *J. Comp. Physiol.* 154, 535–547.
- SHICHI, H., AND SOMERS, R. L. (1978). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 253, 7040–7046.
- SHENOY, S. K., McDONALD, P. H., KOHOUT, T. A., AND LEFKOWITZ, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated  $\beta_2$ -adrenergic receptor and  $\beta$ -arrestin. *Science* 294, 1307–1313.
- SIBLEY, D. R., STRASSER, R. H., BENOVIC, J. L., DANIEL, K., AND LEFKOWITZ, R. J. (1986). Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9408–9412.
- SMITH, D. P., STAMMNES, M. A., AND ZUKER C. S. (1991). Signal transduktion in the visual system of *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 161–190.
- STAVENGA, D. G. (1984). Visual pigments of invertebrates. Photoreception and vision in invertebrates. In: Ali, M. A. (Ed.) Plenum Press, New York, 11–61.
- STEELE, F., WASHBURN, T., RIEGER, R., AND O'TOUSA, J. E. (1992). *Drosophila* retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69, 669–676.
- STRYER, L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87–119.

- SUNG, C.-H., MAKINO, C., BAYLOR, D., AND NATHANS, J. (1994). A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J. Neurosci.* 14, 5818–5833.
- THOMPSON, P. & FINDLAY, J. B. C. (1984). Phosphorylation of bovine rhodopsin identification of the phosphorylated sites. *Biochemistry* 220, 773–780.
- VINÓS, J., JALINK, K., HARDY, R. W., BRITT, S. G., AND ZUKER, C. S. (1997). A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* 277, 687–690.
- VOGT, K. (1983). Is fly visual pigment a rhodopsin. *Z. Naturforsch.*, 38c, 851–858.
- VOGT, K. AND KIRSCHFELD (1984). Chemical identity of the chromophores of fly visual pigments. *Naturwiss.*, 71, 211–213.
- WESS, J. (1998). Molecular basis of receptor G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.*, 80, 231–264.
- WILDEN, U., AND KÜHN, H. (1982). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21, 3014–3022.
- WISTOW, G. J., KATIAL, A., CRAFT, C., AND SHINOHARA, T. (1986). Sequence analysis of bovine retinal S-antigen: relationships with  $\alpha$ -transducin and G-proteins. *FEBS Lett.* 196, 23–28.
- YAMAKI, K., TSUDA, M., AND SHINOHARA, T. (1988). The sequence of human retinal S-antigen reveals similarities with  $\alpha$ -transducin. *FEBS Lett.* 234, 39–43.
- ZUKER, C. S., COWMAN, A. F., RUBIN, G. M. (1985). Isolation and structure of a rhodopsin gene from *Drosophila melanogaster*. *Cell* 40, 851–858.

ZUKER, C., MONTELL, C., JONES, K., LAVERTY, T., RUBIN, G. (1987). A rhodopsin gene expressed in photoreceptor cell R7 of the *Drosophila* eye: homologies with other signaltransducing molecules. *J.Neurosci.*, 1550–1557.

ZUKER, C. (1996). The biology of vision of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 571–576.

## B. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	zweifach deionisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADP, ATP	Adenosindi-, triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arr1	Arrestin 1
Arr2	Arrestin 2
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indoylphosphat
bzw.	beziehungsweise
CaMPK	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CTP	Cytosintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERG	Elektroretinogramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
GDP	Guanosindiphosphat
GMP, GDP, GTP	Guanosinmono-, di-, triphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
hλ	Belichtung

## B. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
M	Metarhodopsin
M→P	Blaubelichtung von Rhodopsin zur Umwandlung in Metarhodopsin
P→M	Rotbelichtung von Metarhodopsin zur Umwandlung in Rhodopsin
M-Membranen	blau belichtete Membranen
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsalz
OD	optische Dichte
P	Rhodopsin
PDA	„prolonged depolarizing afterpotential“
PDE	cGMP-Phosphodiesterase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
P-Membranen	dunkeladaptierte Membranen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R1–R6	Photorezeptorzellen 1–6 des Dipteren Komplexauges
R7	Photorezeptorzelle 7 des Dipteren Komplexauges
R8	Photorezeptorzelle 8 des Dipteren Komplexauge
<i>rdgC</i>	Gen für die Rhodopsinkinase von <i>Drosophila</i>
Rh1	Opsin der Photorezeptorzellen R1–6
Rh2	Opsin der Ocelli
Rh3	Opsin einer Unterklasse der Photorezeptorzelle 7
Rh4	Opsin einer Unterklasse der Photorezeptorzelle 7
Rh5	Opsin einer Unterklasse der Photorezeptorzelle 8
Rh6	Opsin einer Unterklasse der Photorezeptorzelle 8
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetamethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YC4-Vektor	Yellow-Carnegie 4 Vektor

IUPAC Ein-Buchstabencode für Aminosäuren

Alanin	A
Asparaginsäure	D
Asparagin	N
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Arginin	R
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V



## C. Lebenslauf

### Personenbezogene Angaben

Name	Georgia Wessels (geb. Neu)
Geburtsdatum,-ort	09.03.1969 in Wiesbaden (Hessen)
Familienstand	verheiratet (seit 05/2001)
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1975–1979	Grundschule Lindenfels
1979–1989	Altes Kurfürstliches Gymnasium, Bensheim
05/1989	Allgemeine Hochschulreife mit Gesamtnote: 2,6

### Ausbildung

04/1990–04/1992	Schule für techn. Assistenten i.d. Medizin Klinikum Heidelberg Abschluss mit Gesamtnote: „befriedigend“
-----------------	---

### Berufliche Tätigkeit

04/1992–10/1992	MTA am Virologischen Institut der Universität Heidelberg
-----------------	--

### Hochschulausbildung

10/1992–11/1998	Studium der Biologie (Dipl.) an der Universität Karlsruhe
-----------------	--

Prüfungsfächer:	<u>Zoologie, Genetik, Mikrobiologie, Organische Chemie</u>
01/1998–11/98	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie Diplom am 11.11.1999 mit Gesamtnote: „gut“
ab 01/1999	Durchführung einer Promotionsarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
10/1999	International School of Biophysics 1999 6 <sup>th</sup> Course: Vision – The Approach of Biophysics and Neurosciences
09/2001	12. Neurobiologischer Doktorandenworkshop 2001
10/2001	Invertebrate Photoreceptors: Structural and Functional Organization of Signaling Cascades International Workshop

**Berufliche Tätigkeit**

01/1999–06/2001	Anstellung als Wiss. Angestellte am Institut für Zoologie I, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie, Universität Karlsruhe
seit 07/2001	Wiss. diplomierte Hilfskraft

