

Funktionelle Charakterisierung der Phosphatase RDGC in *Drosophila melanogaster* Photorezeptorzellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

**Institut für Physiologie
Fachgebiet Biosensorik**

vorgelegt von:

Lisa Strauch

aus Ulm

2018

Dekan: Prof. Dr. Uwe Beifuß

1. Berichtende Person: Prof. Dr. Armin Huber

2. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang Hanke

Eingereicht am: 18.04.2018

Mündliche Prüfung am: 17.07.2018

Für meinen Dad

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit werden oder wurden bereits an folgender Stelle veröffentlicht:

Artikel

Strauch L., Pfannstiel J., Huber A., and Voolstra O. (2018) Solubility and subcellular localization of the *Drosophila* RDGC phosphatase variants are determined by acylation. *FEBS Letters*.

Voolstra O., **Strauch L.**, Mayer M., and Huber A. (2018) Functional characterization of the three *Drosophila* retina degeneration C (RDGC) protein phosphatase isoforms. *PLoS One*

Kongressbeiträge

Voolstra Olaf, **Strauch Lisa**, Mayer Matthias, and Huber Armin. Roles of the *Drosophila* RDGC isoforms. In 25th European Drosophila Research Conference (EDRC), London 22.-25. September 2017.

Weitere Veröffentlichungen aus der Zeit der Promotion, die nicht im inhaltlichen Zusammenhang mit der Dissertation stehen:

Artikel

Katz B., Voolstra O., Tzadok H., Yasin B., Rhodes-Modrov E., Bartels J.-P., **Strauch L.**, Huber A., and Minke B. (2017) The latency of the light response is modulated by the phosphorylation state of *Drosophila* TRP at a specific site. *Channels*.

Strauch L., Cerny A., Belušič G., and Huber A. (2016) Oscillations in the ERG of the *Drosophila* *trpl*³⁰² mutant are caused by an additional mutation in the *inebriated* gene. *Drosophila Information Service* 99.

Kongressbeiträge

Stegmaier L., Cerny A., and Huber A. The role of Arrestin 2 for the stability of the *Drosophila* TRPL channel. Poster auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) in Köln 24.-27. März 2015.

Strauch L., Cerny A., Belušič G., and Huber A. Oscillations in the ERG of the *Drosophila* *trpl*³⁰² mutant are caused by an additional mutation in the *inebriated* gene. In 24th European Drosophila Research Conference (EDRC), Heidelberg 9.-12. September 2015.

Strauch L., Cerny A., Belušič G., and Huber A. Oscillations in the *Drosophila* *trpl*³⁰² mutant are caused by a mutation in the *inebriated* gene. In 2nd European Meeting Phototransduction 6.-7. September 2016.

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Das Komplexauge von <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.2 Phosphatasen	9
1.3 RDGC.....	11
1.4 Die Rhodopsine von <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.5 Der TRP-Kanal	16
1.6 Genetische Manipulation durch CRISPR/Cas-9	18
1.7 Fragestellung der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	21
2.1.1 Fliegenzucht	21
2.1.2 Injektionslösungen	21
2.1.3 Molekularbiologisches Arbeiten	22
2.1.4 Protein- und DNA-Extraktion	22
2.1.5 SDS-Gelelektrophorese	23
2.1.6 Western-Blot	23
2.1.7 Immunpräzipitation.....	24
2.1.8 Subzelluläre Fraktionierung	25
2.1.9 Acyl-Biotin Austausch.....	25
2.1.10 Arbeiten mit Bakterien.....	27
2.1.11 Transfektion in S2-Zellen.....	27
2.1.12 Ni-NTA-Aufreinigung	27
2.1.13 Immuncytochemie	29
2.1.14 ERG-Messungen	29
2.1.15 Chemikalien	30
2.2 Fliegenstämme	31
2.3 Größenstandards	31
2.4 Geräte	32

2.5	Software.....	33
2.6	Verbrauchsmaterial	33
2.7	Molekularbiologische Kits.....	35
2.8	Primärantikörper	36
2.9	Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	37
2.10	verwendete Primer und Oligonukleotide.....	38
2.11	Drosophila-Zucht und -haltung	39
2.12	Belichtung.....	39
2.13	Injektion in Drosophila-Embryonen	40
2.14	Drosophila-Kreuzung	40
2.14.1	<i>rdgC</i> ³⁰⁶ /+.....	40
2.14.2	<i>rdgC-Myc</i>	40
2.14.3	<i>rdgC</i> ^{ΔS} und <i>rdgC</i> ^{ΔSM}	41
2.15	Generieren einer Mutante mit CRISPR-Cas9.....	41
2.15.1	Das CRISPR-Cas9-System.....	41
2.16	Präparation des biologischen Materials.....	43
2.16.1	Präparation von <i>Drosophila</i> -Köpfen oder -Augen für Westernblot Analysen ...	43
2.16.2	Präparation von <i>Drosophila</i> -Augen für die Immuncytochemie.....	43
2.16.3	Präparation von <i>Drosophila</i> -Köpfen oder-Augen für die Immunpräzipitation..	44
2.16.4	Präparation von <i>Drosophila</i> -Köpfen für einen Ein-Kopf-Westernblot.....	44
2.16.5	Präparation von bakterieller DNA für Kolonie-PCR.....	44
2.16.6	Single-Fly DNA-Präparation	44
2.17	Molekularbiologische Methoden	45
2.17.1	RNA-Isolierung aus <i>Drosophila</i> -Köpfen mit Trifast	45
2.17.2	cDNA-Synthese aus <i>Drosophila</i> -Kopf-RNA.....	45
2.17.3	PCR zur Amplifikation bestimmter Genbereiche	45
2.17.4	Kolonie-PCR	47
2.17.5	Restriktionsverdau der DNA.....	48
2.17.6	Ligation von Insert- und Vektor-DNA.....	49
2.17.7	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien und Transformation.....	49
2.17.8	Plasmid-DNA-Extraktion und -Aufreinigung.....	50
2.17.9	QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese	50

2.18	Arbeiten mit S2-Zellkultur	52
2.18.1	Kultivierung von S2-Zellen.....	52
2.18.2	Klonierung für S2-Zellen.....	52
2.18.3	Transiente Transfektion und Proteininduktion in S2-Zellen	53
2.19	Arbeiten mit Sf9-Zellen.....	53
2.19.1	Kultivierung von Sf9-Zellen	53
2.19.2	Klonierung der RDGC-Isoformen für die Verwendung im Bac-to-Bac System... 54	54
2.19.3	Transfektion von Sf9-Zellen (Bac-to-Bac System)	54
2.19.4	Virusamplifikation	55
2.20	Biochemische Methoden.....	56
2.20.1	Agarose-Gelelektrophorese	56
2.20.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE	56
2.20.3	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	57
2.20.4	Westernblot und Inkubation mit Antikörpern	57
2.20.5	Antikörper-Detektion mittels ECL	57
2.20.6	Validierung der Linearität des α -RDGC-Antikörpers	58
2.20.7	Hydrophathie-Blot.....	58
2.20.8	Subzelluläre Fraktionierung von S2-Zellen.....	60
2.20.9	Subzelluläre Fraktionierung aus <i>Drosophila</i> Köpfen	60
2.20.10	Nachweis der Palmitoylierung mit DTT oder β -Mercaptoethanol.....	60
2.20.11	Immunpräzipitation aus <i>Drosophila</i> -Kopf- oder -Augenextrakten	61
2.20.12	Immunpräzipitation aus S2-Zellen.....	61
2.20.13	Aufreinigung von His-getaggten Proteinen mit Ni-NTA-Agarose.....	62
2.20.14	Zellaufschluss und Ni-NTA-Aufreinigung.....	62
2.20.15	Acyl-Biotin-Austauschreaktion	62
2.20.16	Detektion der tiefen Pseudopupille	63
2.20.17	Proteinbestimmung nach Bradford.....	64
2.20.18	Phosphataseassay.....	64
2.20.19	Zeitreihe.....	64
2.21	Immuncytochemie.....	65
2.21.1	Immuncytochemie von S2-Zellen.....	65
2.21.2	Immuncytochemie von <i>Drosophila</i> -Augen.....	66

2.22	Massenspektrometrie.....	66
2.22.1	In-Gel-Verdau	66
2.22.2	Messung	67
2.23	Elektroretinogramm (ERG) von <i>Drosophila melanogaster</i>	68
2.23.1	Das Elektroretinogramm	68
2.23.2	Versuchsaufbau.....	68
2.23.3	Verwendetes Messprotokoll	69
2.24	Statistische Auswertung	69
3	Ergebnisse	71
3.1	Charakterisierung der RDGC Isoformen und die Herstellung von Mutanten mit verändertem Expressionsmuster der RDGC Isoformen	71
3.1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> exprimiert drei RDGC Isoformen	71
3.1.2	Nachweis von RDGC-M auf Proteinebene	74
3.1.3	Generierung von Mutanten mit unterschiedlichen RDGC-Isoformen mittels CRISPR/Cas9.....	78
3.2	Posttranslationale Modifikationen und subzelluläre Fraktionierung der RDGC Isoformen.....	86
3.2.1	Gewebespezifische Lokalisation von RDGC	86
3.2.2	Immuncytochemische Untersuchung von RDGC in <i>Drosophila</i> Augen.....	87
3.2.3	Subzelluläre Fraktionierung von RDGC in Fliegen.....	90
3.2.4	In silico Analyse der RDGC Isoformen auf mögliche Transmembrandomänen oder Membrananker.....	95
3.2.5	Expression von RDGC in S2-Zellen.....	96
3.2.6	Immuncytochemische Analyse der unterschiedlichen RDGC-Isoformen in S2-Zellen	97
3.2.7	Subzelluläre Fraktionierung aller RDGC-Varianten in S2-Zellen	99
3.2.8	Nachweis der Palmitoylierung von RDGC durch Acyl-Biotin-Exchange Experimente.....	100
3.2.9	Rekombinante Expression von RDGC in Sf9-Zellen.....	101
3.3	Funktionelle Charakterisierung der RDGC-Isoformen.....	105
3.3.1	Die Rolle der unterschiedlichen RDGC-Isoformen bei der Dephosphorylierung von RH1 105	
3.3.2	Einfluss von RDGC auf die Dephosphorylierung von TRP	119
3.3.3	Funktionelle Analyse einer rh1>rdgC-S-Fliege	122

4	Diskussion	128
4.1	Drei Isoformen von RDGC.....	128
4.2	RDGC-M und -L sind über Palmitoylierungen in der Membran verankert.....	129
4.3	Lokalisation der unterschiedlichen RDGC-Varianten.	130
4.4	Rekombinant exprimiertes RDGC zur Untersuchung der katalytischen Aktivität...	131
4.5	Identifikation von drei C-terminalen Phosphorylierungsstellen in RH1.....	132
4.6	Hyperphosphorylierung von RH1 und Retinadegeneration	133
4.7	Die Rolle von RDGC bei der Dephosphorylierung von TRP	134
4.8	Überexpression von RDGC-S führt zu unspezifischer Dephosphorylierung.....	136
5	Literaturverzeichnis	138
6	Abbildungsverzeichnis.....	146
7	Abkürzungsverzeichnis.....	148
	Danksagung	151
	Eidesstattliche Versicherung	152

Zusammenfassung

Bei der Phototransduktionskaskade in *Drosophila melanogaster* handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Signalweg, an dessen Ende die Öffnung der TRP-Ionenkanäle steht. Wesentliche Komponenten des Signalweges, wie Rhodopsin und der TRP-Kanal, unterliegen einer reversiblen Phosphorylierung. Wird Rhodopsin durch einfallendes Licht aktiviert, werden an dessen C-Terminus Ser- und Thr-Reste phosphoryliert. Diese Phosphorylierung spielt eine Rolle bei der Internalisierung des Rezeptors. Der TRP-Kanal ist an mindestens 28 Stellen phosphoryliert. Die Stelle Ser936 des TRP-Kanals wird im Dunkeln phosphoryliert und im Licht dephosphoryliert. Diese Phosphorylierung moduliert das zeitliche Auflösungsvermögen des Auges. Sowohl Rhodopsin als auch TRP-S936 werden durch die Phosphatase RDGC, die im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, dephosphoryliert.

RDGC aus *Drosophila melanogaster* ist die zuerst beschriebene Phosphatase aus der Klasse der Proteinphosphatasen mit EF-Händen (PPEFs), einer bislang wenig untersuchten Klasse der Phosphatasen. Auch weil die humanen RDGC-Homologe PPEF-1 und PPEF-2 eine wichtige Rolle in der Krebsforschung spielen, ist es wichtig nähere Informationen über diese Klasse der Phosphatasen zu erlangen.

Es ist bereits bekannt, dass RDGC in drei unterschiedlichen Isoformen exprimiert wird, die im Folgenden als RDGC-S, RDGC-M und RDGC-L bezeichnet werden. Während für die beiden Isoformen RDGC-S und -L der Ursprung bereits geklärt war, lagen für die dritte Isoform RDGC-M keine Informationen vor. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass RDGC-M durch die Nutzung eines alternativen Translations-Startcodons und alternativem Spleißen aus der RNA der kürzeren Isoform entsteht.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen zeigten eine Membranassoziation der beiden Isoformen RDGC-M und RDGC-L, wohingegen RDGC-S in der löslichen Fraktion gefunden wurde. Die Membranassoziation von PPEFs aus *C. elegans* beruht auf der N-terminalen Acylierung der Proteine. Putative Acylierungsstellen werden auch im N-Terminus der membranassoziierten Isoformen RDGC-M und RDGC-L, nicht aber in der löslichen Isoform RDGC-S gefunden. Die rekombinante Expression gefolgt von einer immunocytochemischen Untersuchung der Lokalisation der verschiedenen RDGC-Isoformen und von Acylierungsmutanten in S2-Zellen legt eine Rolle der Acylierung für die Assoziation mit der Plasmamembran nahe. Eine Acylierung von RDGC-L aus der Fliege konnte darüber hinaus auch mit Hilfe eines biochemischen Assays nachgewiesen werden.

Um die Enzymaktivität der unterschiedlichen Isoformen *in vitro* zu untersuchen, wurde als Beispiel für eine lösliche und eine membrangebundene Isoform RDGC-S und RDGC-L rekombinant in Sf9-Zellen exprimiert, aufgereinigt und auf ihre Aktivität untersucht. Weitere

Zusammenfassung

Untersuchungen konnten nicht durchgeführt werden, da bei keiner der beiden Isoformen eine Aktivität festgestellt werden konnte.

Für die funktionale Charakterisierung der unterschiedlichen RDGC-Isoformen, wurden in dieser Arbeit Fliegen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der RDGC-Isoformen untersucht. Diese Mutanten wurden teilweise im Zuge der Arbeit mit Hilfe des CRISPR/Cas 9-Systems hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung von Rhodopsin, wie sie in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten gefunden wird, auch dann verhindert wird, wenn nicht alle drei Isoformen von RDGC exprimiert werden. Auch die mit der Hyperphosphorylierung von Rhodopsin einhergehende Degeneration der Photorezeptorzellen konnte außer in der *rdgC*-Nullmutante in keiner der untersuchten Mutanten gefunden werden.

Untersuchungen der TRP-Dephosphorylierung zeigten, dass keine der drei Isoformen essentiell für die Dephosphorylierung von TRP-S936 ist. Allerdings zeigte sich, dass der Gesamtgehalt an zur Verfügung stehenden RDGC, insbesondere die Menge an RDGC-M, einen Einfluss auf die Kinetik der Dephosphorylierung von TRP-pS936 hat. Eine erhöhte Expression von RDGC-M in Abwesenheit von RDGC-S führt zu einer schnelleren Dephosphorylierung von TRP an der Stelle S936. Eine solche Änderung der Kinetik konnte in einer Fliege mit überexprimiertem RDGC-S nicht gezeigt werden und war daher nicht auf die erhöhte Menge des entsprechenden Proteins zurückzuführen.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass die drei RDGC Isoformen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, die auf Unterschiede im N-Terminus zurückzuführen ist. Dies ist möglicherweise der Grund für die unterschiedliche Geschwindigkeit der Dephosphorylierung von TRP-pS936 durch RDGC-S und RDGC-M. Zudem sind alle drei Isoformen in der Lage, Rhodopsin zu dephosphorylieren.

Summary

The *Drosophila melanogaster* phototransduction cascade is a G-protein coupled signaling pathway that finally results in the opening of TRP ion channels. Essential components of the phototransduction cascade, especially rhodopsin and TRP undergo a reversible light-dependent phosphorylation. If rhodopsin is activated by an incoming light stimulus, its C-terminal Thr- and Ser-residues get phosphorylated. Phosphorylation of the C-terminus is a signal for the internalization of the receptor. The TRP channel is known to be phosphorylated at least at 28 residues. Among these sites Ser936 is the only phosphorylation site which is phosphorylated in the dark and becomes dephosphorylated in the light. This phosphorylation modulates the temporal resolution of the eye. Rhodopsin as well as TRP-S936 are substrates of the phosphatase RDGC, which is the focus of this work.

Drosophila melanogaster RDGC is the first described member of the class of phosphatases with EF hands (PPEFs). The PPEF class of phosphatases is only poorly characterized. As the human RDGC homologues PPEF-1 and PPEF-2 play an important role in cancer studies, it is important to better understand this class of phosphatases.

It is already known that RDGC is expressed in three different isoforms that, according to their molecular weight, are called RDGC-S, RDGC-M and RDGC-L in this study. While the origin of RDGC-S and RDGC-L is understood, no information about the origin of RDGC-M was available. The present work shows that RDGC-M is generated by using an alternative translation start codon and an alternative splice site within the RNA of the short Isoform.

Analysis of the subcellular localization of the three isoforms showed membrane association of RDGC-M and RDGC-L, whereas RDGC-S was found in the soluble fraction. Membrane association of PPEF in *C. elegans* has been reported to be caused by N-terminal acylation. Putative acylation sites are also found in the membrane associated RDGC-M and RDGC-L isoforms but not in the soluble RDGC-S isoform. Recombinant expression followed by immunocytochemical Analysis of the different RDGC isoforms and their acylation site mutants in S2 cells point to acylation in the N-terminus as a reason for membrane association. In addition, acylation of the N-terminus of RDGC-L isolated from flies was directly proven by using a biochemical assay.

In order to determine the *in vitro* activity of RDGC isoforms, the soluble isoform RDGC-S and the membrane associated isoform RDGC-L were expressed in Sf9 cells using the baculovirus system. The two isoforms could be extracted and purified, but could not be used to determine the enzymatic activity as they both did not show any activity.

To functionally characterize the three isoforms, flies with different RDGC expression patterns were analysed. Most of the mutants that were used in these studies were generated in this work by the CRISPR/Cas9 system. Other mutants were obtained from public resources. As a result, it was shown that rhodopsin hyperphosphorylation that is found in *rdgC*³⁰⁶ mutants is

Summary

prevented by the expression of any RDGC isoform. Retinal degeneration, a phenomenon that is caused by rhodopsin hyperphosphorylation is also only observed in the *rdgC*³⁰⁶ mutant but not in any of the other mutants that we investigated here.

Regarding TRP channel phosphorylation none of the three RDGC isoforms is mandatory for the dephosphorylation of TRP at Ser936. However, the results revealed that the total amount of RDGC that is available, in particular the amount of RDGC-M, affects the kinetics of the TRP-S936 dephosphorylation. An increased expression of RDGC-M in the absence of RDGC-S leads to a faster dephosphorylation of TRP-S936. Such a change in TRP-S936 dephosphorylation kinetics was not observed in flies overexpressing RDGC-S in an *rdgC* nullmutant background and therefore cannot be attributed to the increased amount of the corresponding protein.

Taken together this study shows that the three RDGC isoforms differ in their subcellular localization due to variable amino acid sequences in their N-termini. This may be the reason for kinetic differences in the dephosphorylation of TRP-S936 by RDGC-S or RDGC-M. Apart from these findings, all RDGC isoforms are able to dephosphorylate rhodopsin.

1 Einleitung

Lebewesen sind in ihrer Umwelt den unterschiedlichsten Reizen ausgesetzt, die durch sensorische Systeme detektiert werden können. Zur Aufnahme und Verarbeitung dieser Reize wurden im Laufe der Evolution die unterschiedlichsten Mechanismen entwickelt. Diese Mechanismen funktionieren über verschiedene Signalwege und mit unterschiedlichster Geschwindigkeit. Da viele Lebewesen auf eine besonders schnelle Verarbeitung visueller Reize angewiesen sind, ist es kaum verwunderlich, dass es sich bei dem Sehprozess um einen schnellen Signalweg handelt. Eine schnelle Umwandlung der visuellen Reize in ein elektrisches Signal, welches dann im Gehirn weiterverarbeitet werden kann, ist gerade bei fliegenden Lebewesen für die Orientierung im dreidimensionalen Raum wichtig. Die Lobullaplatte im Gehirn ist direkt mit dem Flugapparat von *Drosophila melanogaster* verbunden, wodurch eine schnelle Flugbewegung nach einem Reiz möglich wird (Frye und Dickinson 2001). Aufgrund dieser direkten Verbindung hängt die Geschwindigkeit einer Flugbewegung, zum Beispiel bei einer Flucht, von der Geschwindigkeit der Antwort auf einen visuellen Reiz ab. Die Verarbeitung visueller Reize im Komplexauge von *Drosophila melanogaster* ist der schnellste G-Protein gekoppelte Signalweg, der bislang bekannt ist (Ranganathan et al. 1991).

Ebenso wichtig wie eine schnelle Reizantwort, ist die korrekte und rasche Abschaltung des Signalweges. Durch die schnelle Inaktivierung wird sichergestellt, dass die Refraktärzeit möglichst geringgehalten wird. Je kürzer die Refraktärzeit ist, desto schneller kann in nachgeschalteten Neuronen ein neues Aktionspotential ausgelöst werden. Außerdem ermöglicht die schnelle Aktivierung und Deaktivierung der Phototransduktionskaskade eine schnelle Anpassung an die Änderung äußerer Einflüsse, was für das Überleben der Fliege essentiell ist.

1.1 Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster*

Um die genaueren Vorgänge im Komplexauge von *Drosophila melanogaster* näher untersuchen zu können, ist zunächst ein grundlegendes Verständnis der Funktion dieser Art von Augen notwendig.

Drosophila melanogaster besitzt zwei Komplexaugen, die jeweils aus ca. 800 einzelnen Augen, den sogenannten Ommatidien aufgebaut sind. Jedes Ommatidium besitzt einen dioptrischen Apparat, welcher aus der Cornea, dem Kristallkegel und vier Semperzellen besteht. Im dioptrischen Apparat werden einfallende Lichtstrahlen gebündelt und zu den darunterliegenden Photorezeptorzellen weitergeleitet. In jedem Ommatidium gibt es acht Photorezeptorzellen, von denen die Rezeptorzellen R1-R6 peripher angeordnet sind. R7 und R8 liegen übereinander, was dazu führt, dass im Querschnitt eines Ommatidiums immer nur sieben Photorezeptorzellen zu sehen sind. Jeder Photorezeptor besteht aus dem Zellkörper und dem Rhabdomer, welches aus einem dicht gepackten Mikrovillisaum besteht.

Abbildung 1.1 A zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild des *Drosophila* Komplexauges.

Außerdem ist ein Schnitt durch das Komplexauge sowie die nachgeschalteten optischen Ganglien (Abbildung 1.1 B) gezeigt. Einfallendes Licht wird durch die Linsen in die Photorezeptorzellen geleitet, dort weitergeleitet, über die Phototransduktionskaskade verstärkt und in elektrische Reize umgewandelt. Über die Lamina und Medulla wird das Signal in die Lobula und die Lobulaplatte weitergeleitet. Außerdem zeigte Abbildung 1.1 C die schematische Darstellung eines einzelnen Ommatidiums. Ein Ommatidium besteht aus der cornealen Linse, dem Kristallkegel und den abschirmenden Pigmentzellen. Nachgeschaltet finden sich die Rhabdomere R1-R6 sowie die übereinanderliegenden Rhabdomere R7 und R8. Das Ommatidium endet in einem Axon.

Einleitung

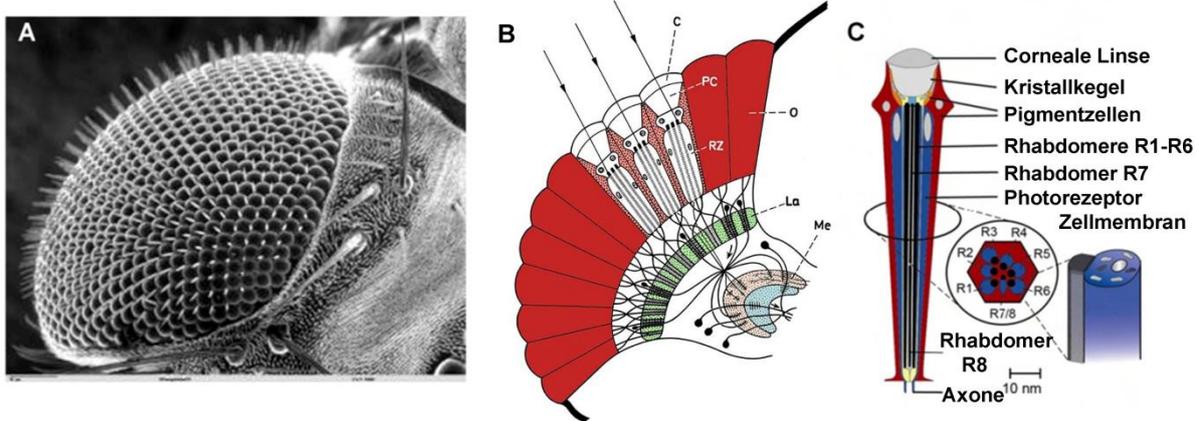


Abbildung 1.1 Aufbau des *Drosophila*-Komplexauges. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Komplexauges von *Drosophila melanogaster* mit ca. 800 Einzelommatidien. (Foto von J. Kumar, Indiana University) B) Schematischer Längsschnitt durch das Komplexauge und nachgeschaltete Ganglien von *Drosophila melanogaster*. O-Ommatidium, C-Cornea, PC-Kristallkegel, RZ-Rezeptorzelle, La-Lamina, Me-Medulla. (Verändert nach Kirschfeld 1967) C) Vergrößerung eines einzelnen Ommatidiums im Längs- und im Querschnitt. Im Längsschnitt sind in Grau die Linse und der darunterliegende Dioptrische Apparat eingezeichnet, in Rot sind die primären und sekundären Pigmentzellen dargestellt. In Blau und Schwarz sind die acht Photorezeptorzellen R1-R8 mit ihren Rhabdomeren zu sehen. Im Querschnitt sind die Photorezeptorzellen eingebettet in die Pigmentzellen zu sehen. Dabei ist der Zellkörper einer jeden Rezeptorzelle in Blau und das dazugehörige Rhabdomer in Schwarz dargestellt. Da die Rezeptorzellen R7 und R8 übereinander liegen, sind im Querschnitt immer nur sieben Photorezeptorzellen zu sehen. Die Vergrößerung eines Photorezeptors zeigt den Zellkörper und den Mikrovillisaum, der das Rhabdomer bildet (verändert nach Wolff und Ready 1993).

Die eigentliche Verarbeitung von Lichtreizen in elektrische Signale, die das Gehirn verwerten kann, erfolgt in den Rhabdomeren der Photorezeptorzellen. Die einzelnen Komponenten, die für diesen Prozess notwendig sind, sitzen entweder dauerhaft in der rhabdomerischen Membran oder werden einer lichtabhängigen Translokation zwischen dem Rhabdomer und dem Zellkörper unterzogen. Den Prozess der Umwandlung von Licht- in elektrische Impulse bezeichnet man als Phototransduktionskaskade. Dabei handelt es sich um eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade. Die Phototransduktionskaskade wird durch die Absorption von Photonen durch den Sehfärbstoff Rhodopsin in den Photorezeptorzellen gestartet. Die Lichtabsorption bewirkt eine Konformationsänderung des sieben Transmembrandomänen umspannenden Rezeptors Rhodopsin (RH). Rhodopsin besteht aus einem proteinogenen Anteil, dem Opsin und dem Chromophor Retinal. Der Chromophor isomerisiert durch Absorption eines einfallende Photons vom inaktiven 11-*cis*-3-Retinal in das aktive all-*trans*-Retinal. Das inaktive Rhodopsin wird so in seine aktive Form, das Metarhodopsin (M) umgewandelt und aktiviert damit das visuelle $G_{\alpha\beta}$ -Protein. Durch den Austausch des an das G-Protein gebundenen GDP zu GTP zerfällt das G-Protein in zwei Teile: die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), welche das membrangebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in das lösliche Inositol-1,3,5-Triphosphat (IP $_3$) und das membranständige Diacylglycerol (DAG) spaltet. Als Folge dessen werden die beiden Ionenkanäle TRP und TRPL geöffnet und der damit einhergehende Kationeneinstrom führt zu einer Depolarisation der Zelle (Montell 2012). Über den Öffnungsmechanismus der beiden Kanäle wird derzeit kontrovers diskutiert. Eine aktuelle Hypothese macht die Depletion von PIP $_2$ indirekt für die Öffnung verantwortlich. Durch die Spaltung von PIP $_2$ kommt es zu einer Freisetzung von Protonen und damit zu einem lokalen Abfall des pH-Wertes. Mit Hilfe eines fluoreszierenden pH-Indikators konnte diese lokale

Einleitung

Ansäuerung experimentell belegt werden (Huang et al. 2010). Eine andere Hypothese besagt, dass DAG selbst zu einer Aktivierung von TRP und TRPL führt (Delgado et al. 2014).

Zudem sorgt das Abspalten des Inositolrings aus der Membran für eine Strukturänderung in der Membran selbst. Dadurch könnten die beiden Kanäle TRP und TRPL auf eine mechanische Art und Weise geöffnet werden. Über „Atomic-Force-Microscopy“ konnte ein schnelles Zusammenziehen der Rhabdomere in Folge eines Lichtstimulus gezeigt werden (Hardie und Franze 2012). Im Gegensatz dazu wird behauptet, dass die Öffnung der Kanäle nicht im Zusammenhang mit der Abspaltung von PIP_2 aus der Membran oder der Änderung des pH-Wertes geschieht (Delgado et al. 2014). Stattdessen wirken mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) als Agonisten für den Öffnungsmechanismus (Chyb et al. 1999; Lev et al. 2012). Allerdings konnte bislang keine Lipase gefunden werden, die lichtabhängig PUFAs aus DAG freisetzt (Leung et al. 2008). Die Öffnung der Kanäle TRP und TRPL führt zum Einstrom von Kationen, hauptsächlich Ca^{2+} und Na^+ . Ca^{2+} spielt bei der Phototransduktionskaskade eine entscheidende Rolle. Es wird hauptsächlich über den TRP-Kanal in die Zelle transportiert. Dabei wird eine Konzentration von 0,08-22 mM an freiem Ca^{2+} in den Photorezeptorzellen erreicht (Postma et al. 1999).

Da bei der Signaltransduktion im Auge eine sehr schnelle Signalweiterleitung besonders wichtig ist, sind die entscheidenden Bestandteile der Phototransduktionskaskade in räumlicher Nähe lokalisiert. Um diese räumliche Nähe dauerhaft zu gewährleisten, bindet das Gerüstprotein INAD (Inactivation no afterpotential D) die $\text{PLC}\beta$, die augenspezifische Proteinkinase C (ePKC) sowie den Ionenkanal TRP an sich. Für eine Verankerung des gesamten Komplexes in der Rhabdomermembran ist INAD zusätzlich an das Klasse III Myosin NINAC gebunden, welches wiederum an das rhabdomerische F-Aktin gebunden vorliegt. Abbildung 1.2 zeigt schematisch den Aufbau und den Ablauf der Phototransduktionskaskade.

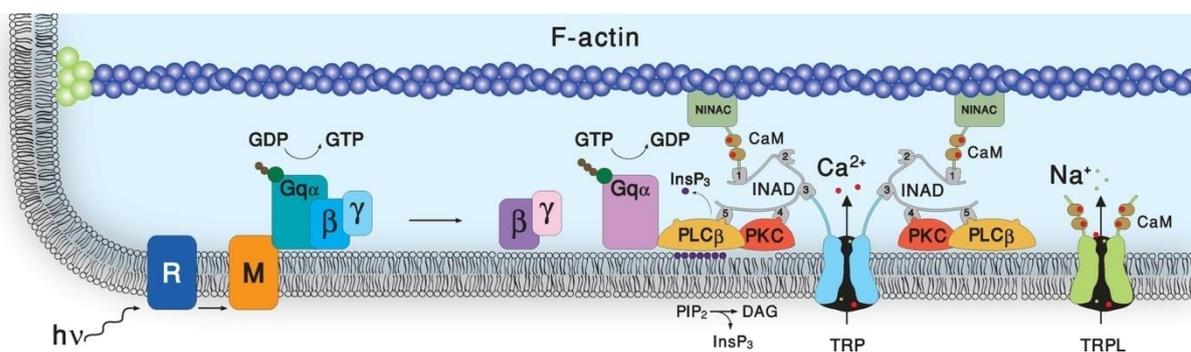


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade. Ein Photon (hier $h\nu$) trifft auf das inaktive Rhodopsin (R) und wandelt dieses durch eine Konfigurationsänderung des Chromophors Retinal in das aktive Metarhodopsin (M) um. Dadurch kommt es am G-Protein zum Austausch von GDP zu GTP und damit zur Freisetzung der katalytischen α -Untereinheit. Diese aktiviert die $\text{PLC}\beta$, wodurch es zur Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in das lösliche Inositol-1,3,5-Triphosphat (IP_3) und das weiterhin membranständige Diacylglycerol (DAG) kommt. Es kommt zur Öffnung der Ionenkanäle TRP und TRPL was wiederum zum Einstrom von Kationen- im Wesentlichen Ca^{2+} und Na^+ - und damit zur Depolarisation der Rezeptorzelle führt (Katz und Minke 2009).

Die Depolarisation in den Photorezeptoren führt dazu, dass Vesikel mit dem Neurotransmitter Histamin in Richtung Synaptischem Spalt wandern. An der präsynaptischen Membran kommt

Einleitung

es zur Exozytose und damit zur Ausschüttung von Histamin in den Synaptischen Spalt. Kommt es hierbei zur gleichzeitigen Ausschüttung von Histamin aus mehreren Photorezeptoren und wird damit ein Schwellenwert an Histamin überschritten, wird ein Reiz über die Lamina und die Medulla weitergeleitet und in der Lobulla und der Lobullaplatte verarbeitet. So gelangt der ursprünglich als Photon eintretende Reiz als elektrisches Signal in das Gehirn. Signale, die aus verarbeiteten Reizen der Photorezeptorzellen R7 und R8 kommen, werden direkt in die Medulla projiziert.

Bei der Deaktivierung der Phototransduktionskaskade spielen mehrere Faktoren eine Rolle. So bildet das Calcium-bindende Protein Calmodulin (CaM) Komplexe mit dem eingeströmten Ca^{2+} , um dadurch die Phosphatase RDGC (retinal degeneration C) zu aktivieren. RDGC dephosphoryliert Metarhodopsin, wobei die Identifikation der genauen Phosphorylierungsstellen Teil dieser Arbeit ist. Außerdem aktivieren diese Komplexe die CaM-Kinase II, die Arrestin 2 phosphoryliert (Lee und Montell 2004; Kahn und Matsumoto 1997; Cassill et al. 1991). Arrestin 2 bindet an das aktive Metarhodopsin, was dieses daran hindert, weitere G-Proteine zu aktivieren. Metarhodopsin wird im Anschluss entweder abgebaut, durch langwelliges Licht (570 nm) in Rhodopsin photokonvertiert oder der Chromophor enzymatisch in 11-*cis*-Retinal umgewandelt und mit dem Opsin wieder zum inaktiven Rhodopsin verbunden. Ein weiterer Aspekt der Deaktivierung ist die Inaktivierung von TRP und TRPL durch das eingeströmte Ca^{2+} . Wird ein bestimmter Schwellenwert an Ca^{2+} erreicht, so wird vermutlich die Affinität der Kanäle gesättigt und damit ein negatives feedback eingeleitet. Auf diesem Wege kommt es zur Inaktivierung der beiden Kanäle (Hardie 2012; Reuss et al. 1997) und zur Deaktivierung der Phototransduktionskaskade.

1.2 Phosphatasen

In der Natur gibt es einige Wege zur Regulation von Proteinen und damit zur Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Prozesse. Bei diesen Regulationen spielen Enzyme eine entscheidende Rolle. Der wichtigste Mechanismus, mit denen sie arbeiten ist neben der allosterischen und der kompetitiven Proteinhemmung vor allem das Prinzip der Phosphorylierung. Dabei wird die Phosphorylierung von Kinasen und die Dephosphorylierung von Phosphatasen durchgeführt. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Dephosphorylierung, weswegen die Kinasen hier nicht näher betrachtet werden.

Das Grundprinzip der Dephosphorylierung ist in allen Klassen der Phosphatasen gleich: Durch die Hydrolyse von phosphorylierten Proteinen kommt es zur Spaltung von Phosphorsäureestern und damit zur Einlagerung von Wasser und zur Abspaltung des Phosphatrestes (s. Abbildung 1.3).

Einleitung

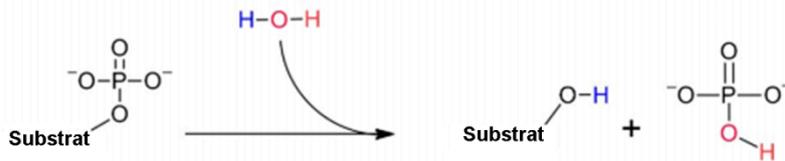


Abbildung 1.3 Die von einer Phosphatase katalysierte Hydrolyse-reaktion. Durch die Hydrolyse der Phosphatgruppe mit Wasser spaltet eine Phosphatase die Phosphatgruppe ab (verändert nach Wikipedia).

Obwohl es auch noch andere Phosphataseklassen gibt, werden hier nur die Protein-Phosphatasen behandelt. Die Proteinphosphatasen sind wiederum in vier Klassen unterteilt (Camps et al. 2000; Mumby und Walter 1993): alkalische Phosphatasen, Ser/Thr-spezifische, Tyr-spezifische oder dualspezifische Proteinphosphatasen. Die wichtigste Klasse ist dabei die Klasse der Ser/Thr-spezifischen Phosphatasen. Wie der Name bereits vermuten lässt, dephosphorylieren diese Phosphatasen phosphorylierte Proteine an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin.

Innerhalb dieser Enzymklasse gibt es wiederum die Klasse der Mg^{2+} -abhängigen Proteinphosphatasen (MPP) und die Phosphoproteinphosphatasen (PPPs) (Barford 1996). Obwohl die Klasse der Phosphoproteinphosphatasen universell in allen Organismen zu finden ist, sind von den Unterfamilien PP1, PP2A, PP2B, PP5 und PPEF/PP7 lediglich die ersten vier gut untersucht. Die Klasse der PPEFs, der Proteinphosphatasen mit EF-Händen, hingegen ist weitestgehend unerforscht. Die *Drosophila* Phosphatase RDGC gehört zur Familie der PPEFs und wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Der Aufbau aller PPEFs ist im Grunde gleich: Die katalytische Domäne ist N- und C-terminal von weiteren Domänen flankiert und teilweise von einem Insert unterbrochen. Des Weiteren befinden sich in der Regel C-terminal zur katalytischen Domäne EF-Hände in unterschiedlicher Anzahl. In Vertebraten und Einzellern zeigen sich bis zu sechs EF-Hände, wohingegen andere Organismen nur Sequenzen zeigen, die denen von EF-Händen ähneln, aber nicht funktional sind. Über die EF-Hände in den PPEFs wird Ca^{2+} gebunden. Die Menge des gebundenen Ca^{2+} wird wahrscheinlich über die Anzahl der EF-Hände reguliert. Ein weiteres Motiv, das für PPEFs typisch ist, ist das IQ-Motiv über das Calmodulin an die PPEFs bindet (s. Abbildung 1.4). Diese strukturellen Eigenschaften deuten auf eine stark Ca^{2+} -abhängige Regulation der PPEFs hin.

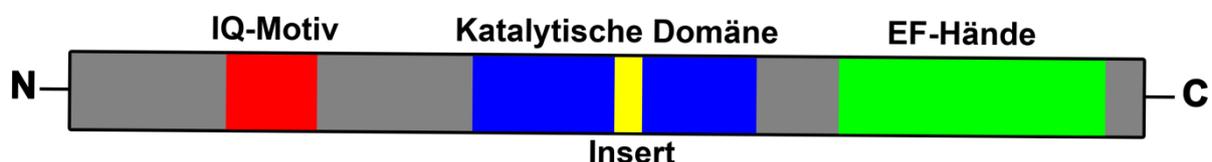


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Aufbaus von PPEFs. Alle bislang bekannten PPEFs besitzen im N-Terminus ein IQ-Motiv, über das die PPEFs an Calmodulin binden. Die katalytische Domäne wird häufig, aber nicht immer durch ein Insert unterbrochen. C-Terminus finden sich die für diese Proteinklasse namensgebenden EF-Hände.

PPEFs werden hauptsächlich in sensorischen Neuronen exprimiert. So auch RDGC, die erste jemals entdeckte PPEF (Steele et al. 1992). Sie wurde in der Retina von *Drosophila melanogaster* gefunden (Steele und O'Tousa 1990). RDGC-Homologe finden sich auch in

anderen Klassen von Organismen wie beispielsweise in *Caenorhabditis elegans* oder auch innerhalb der Klasse der Vertebraten.

PPEF aus *C. elegans* wird als CePPEF bezeichnet und nur innerhalb des Nervensystems und dort in primären sensorischen Neuronen exprimiert. Es ist sowohl in *C. elegans* als auch in Zellkultur (293-Zellen) über den N-Terminus membranassoziiert. Im N-Terminus liegt eine Myristoylierung an Glycin² sowie eine Palmitoylierung an Cystein³ vor. Eine Mutation dieser Stellen führt dazu, dass es nicht länger zu einer Anlagerung der Fettsäurereste kommt. Als Folge daraus ist CePPEF in Zellkultur deutlich schwächer mit der Membran assoziiert. In transgenen *C. elegans* wurde CePPEF durch Mutieren der Palmitoylierungsstelle verändert und war in Folge dessen nicht länger in den Dendriten, Axonen und Cilien lokalisiert (Ramulu und Nathans 2001).

Die in Vertebraten exprimierten Homologe PPEF1 und PPEF2 sind im Gegensatz zu RDGC nicht an der Dephosphorylierung von Rhodopsin beteiligt (Sherman et al. 1997), sondern spielen eine Rolle in der Apoptose, Stressantwort, Zellproliferation, Onkogenese und der Zelldifferenzierung (Park et al. 2017). Die Analyse von humanem Gewebe ergab, dass PPEF1 und auch PPEF2 hauptsächlich in den Hoden und im Gehirn exprimiert werden (Fagerberg et al. 2014). Die humane PPEF-1 wurde in einer aktuellen Publikation (Park et al. 2017) als negativer Regulator des Proteins „Programmed Cell Death 5 (PDCD5)“ identifiziert. PDCD5 ist an der Regulation des Transkriptionsfaktors p53 beteiligt und führt damit zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose. Über die Dephosphorylierung von PDCD5 ist PPEF-1 ebenfalls an dieser Regulation beteiligt. Die Überexpression von PPEF-1 in A549-Zellen (Lungenkrebs-Zellen) führt zu einer Deaktivierung von PDCD5 und unterdrückt dadurch sowohl die Antwort auf einen DNA-Schaden als auch den Zelltod. Im Umkehrschluss wurde bei einem knock-down von PPEF-1 PDCD5 aktiviert, was zu einer gesteigerten Antwort auf einen Etoposid-induzierten DNA-Schaden und verstärkter Apoptose führt.

Abgesehen von diesen Daten ist über die Klasse der PPEFs kaum etwas bekannt. Am besten untersucht ist die Phosphatase RDGC in *Drosophila melanogaster*. Da sich diese Arbeit näher mit der RDGC beschäftigt, wird bereits bekanntes über die RDGC im folgenden Kapitel gesondert behandelt.

1.3 RDGC

Die Phosphatase RDGC ist eine Phosphatase aus der Klasse der Serin/Threonin-Phosphatasen und trägt ihren Namen auf Grund des Phänotyps der Nullmutante in *Drosophila melanogaster*. Diese gehört zu einer Gruppe von Mutanten, bei denen die Mutation unter anderem zu einer relativ schnellen Degeneration der Photorezeptorzellen führt (retinal degeneration). Derselbe Phänotyp zeigt sich noch bei zwei weiteren Mutanten, welche als *rdgA* und *rdgB* bezeichnet werden.

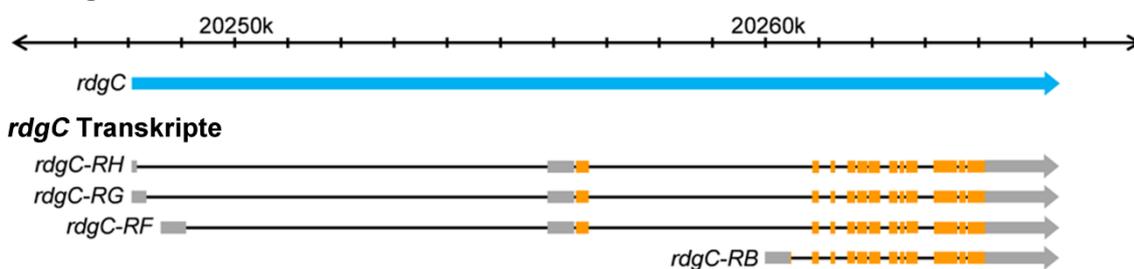
Diese Arbeit beschäftigt sich mit der dritten Mutante, die schwere retinale Degeneration aufweist. Nach *rdgA* und *rdgB* wurde diese als *rdgC* benannt. Die retinale Degeneration beruht

Einleitung

in dieser Mutante darauf, dass das RDGC-Zielprotein Rhodopsin 1 in der *rdgC*-Nullmutante hyperphosphoryliert vorliegt (Vinós et al. 1997). Hyperphosphoryliertes RH1 bildet stabile Komplexe mit Arrestin2, wodurch weniger Arrestin2 zur Verfügung steht, um Metarhodopsin zu inaktivieren. Die RH1-Arrestin2 Komplexe werden aus der rhabdomerischen Membran in den Zellkörper internalisiert und führen so zu einer gesteigerten Apoptose in den Photorezeptoren (Alloway et al. 2000). Diese Degeneration ist licht- und zeitabhängig und kann dadurch verhindert werden, dass die Fliegen konstant im Dunkeln gehalten werden.

Das *rdgC* Gen in *Drosophila melanogaster* codiert für vier unterschiedliche mRNAs, wobei drei der mRNAs (*rdgC-RF*, *-RG*, und *-RH*) sich lediglich in untranslatierten Bereichen unterscheiden und in dieselbe Proteinvariante translatiert werden. Dabei handelt es sich um ein 746 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 84,9 kDa. Die vierte mRNA-Variante (*rdgC-RB*) wird in ein 661 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 75,5 kDa translatiert. Die beiden Proteinvarianten unterscheiden sich im N-Terminus, wobei die lange Isoform N-terminal 85 zusätzliche Aminosäuren besitzt.

Genregion des Chromosoms 3R



vorhergesagte RDGC Proteinvarianten

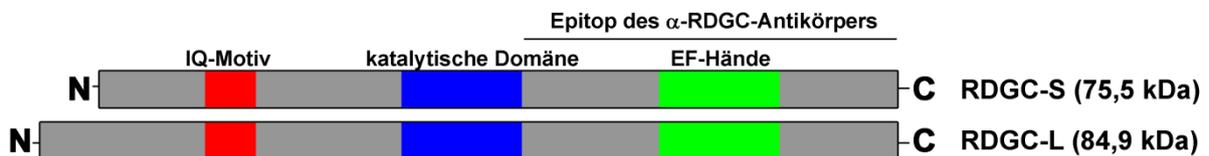


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des *rdgC* Genlokus, seiner Transkripte und vorhergesagten Proteinvarianten. Der *rdgC* Genlokus in *Drosophila melanogaster* liegt auf dem Chromosom 3R. Es werden die vier Transkripte *rdgC-RH*, *-RG*, *-RF* und *-RB* gebildet. Aus diesen vier unterschiedlichen Transkripten werden zwei unterschiedliche Proteinvarianten abgeleitet. N-terminal befindet sich das Calmodulin bindende IQ-Motiv, gefolgt von der Katalytischen Domäne, die in RDGC nicht von einem Insert unterbrochen ist. C-terminal von der katalytischen Domäne liegen die EF-Hände, die für die Ca^{2+} -Bindung notwendig sind.

Neben der Länge unterscheiden sich die beiden Isoformen in den ersten 5 Aminosäuren der kurzen Isoform. Eine Untersuchung von Extrakten aus Wildtyp-Fliegen zeigte jedoch eine dritte Isoform, die bei der Analyse über Westernblot mit einem α -RDGC-Antikörper eine Größe zwischen den bekannten 75,5 kDa und 84,9 kDa aufweist (Lee und Montell 2001). Der Ursprung dieser dritten Isoform ist nicht bekannt.

Das restliche Protein besteht in beiden Fällen aus einem N-terminalen IQ-Motiv, welches für die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin zuständig ist, einer katalytischen Domäne und einem EF-Hand-Motiv mit dem direkt Ca^{2+} gebunden werden kann (s. Abbildung 1.5).

Einleitung

Beide Isoformen des RDGC binden direkt an Calmodulin, was sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} geschieht. Allerdings verbessert die Anwesenheit von Ca^{2+} die Bindefähigkeit von Calmodulin an RDGC (Lee und Montell 2001). Ein bereits seit längerem bekanntes Zielprotein von RDGC ist RH1 (Steele und O'Tousa 1990), welches am C-Terminus dephosphoryliert wird. Die genauen Stellen, an denen Rhodopsin phosphoryliert wird und an denen RDGC als Phosphatase wirkt, sind noch nicht bekannt.

Neben der Dephosphorylierung von RH1 ist RDGC auch an der lichtabhängigen Dephosphorylierung von TRP beteiligt (Voolstra et al. 2017; Katz et al. 2017). Dabei ist die lichtabhängige Phosphorylierungsstelle S936 im C-Terminus des TRP betroffen. Wie genau die Beteiligung der RDGC aussieht, soll im Verlauf dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 Die Rhodopsine von *Drosophila melanogaster*

Die Photorezeptoren der Komplexaugen und Ozellen von *Drosophila melanogaster* enthalten insgesamt sechs Rhodopsine. Rhodopsine bestehen aus dem proteinogenen Anteil Opsin und dem Chromophor 11-*cis*-3-Hydroxyretinal (Zucker 1996). Dieser Chromophor liegt im inaktiven Zustand als 11-*cis*-Retinal vor und wird bei der Aktivierung durch die Absorption von Licht in *all-trans*-Retinal umgewandelt.

In *Drosophila melanogaster* gibt es mehrere Rhodopsine, die sich in ihren Absorptionsspektren unterscheiden. Das Haupt-Rhodopsin RH1, welches in den Photorezeptorzellen R1-R6 vorliegt, hat sein Absorptionsmaximum bei 480 nm. In R7-Zellen finden sich die beiden im ultravioletten Licht absorbierenden Rhodopsine RH3 und RH4, in R8-Zellen finden sich RH5 und RH6, welche im blauen und grünen Licht absorbieren (Stavenga und Arikawa 2008). Während diese fünf Rhodopsine alle im Komplexauge vorkommen, wird das im blauen absorbierende RH2 in den Ozellen gebraucht (Pollock und Benzer 1988).

Das Hauptrhodopsin RH1 in *Drosophila melanogaster* kann nach seiner Aktivierung und der damit einhergehenden Umwandlung in Metarhodopsin durch die erneute Absorption eines Photons wieder zu Rhodopsin konvertiert werden. Diese Photokonversion wird auch als Photo-Flip-Flop bezeichnet. Da Metarhodopsin ein Absorptionsmaximum bei 570 nm hat, ist oranges oder rotes Licht für diese Rückumwandlung besonders effektiv.

Bei der Belichtung mit blauem Licht wird sehr viel Metarhodopsin im Vergleich zum Rhodopsin (70 % M zu 30 % RH1) gebildet (Stavenga und Hardie 2011). Dadurch, dass in der Zelle weniger Arrestin 2 als Rhodopsin vorliegt, reicht diese Menge so nicht aus, um alles Metarhodopsin zu binden (Kiselev und Subramaniam 1997). Es kommt daher zu einer andauernden Aktivierung der Signalkaskade, dem sogenannten „prolonged depolarizing afterpotential“ (PDA) (Minke 2012). Das PDA findet sich nur in weißäugigen Fliegen, nicht aber in rotäugigen. Das rote Schirmpigment absorbiert blaues Licht und reflektiert rotes Licht. Auf diese Art und Weise wird nicht mehr Metarhodopsin generiert, als Arrestin2 zur Deaktivierung zur Verfügung steht (Dolph et al. 1993).

RH1 unterliegt in den Photorezeptoren einem Gleichgewicht aus Recycling, Abbau und Neusynthese (s. Abbildung 1.6).

Einleitung

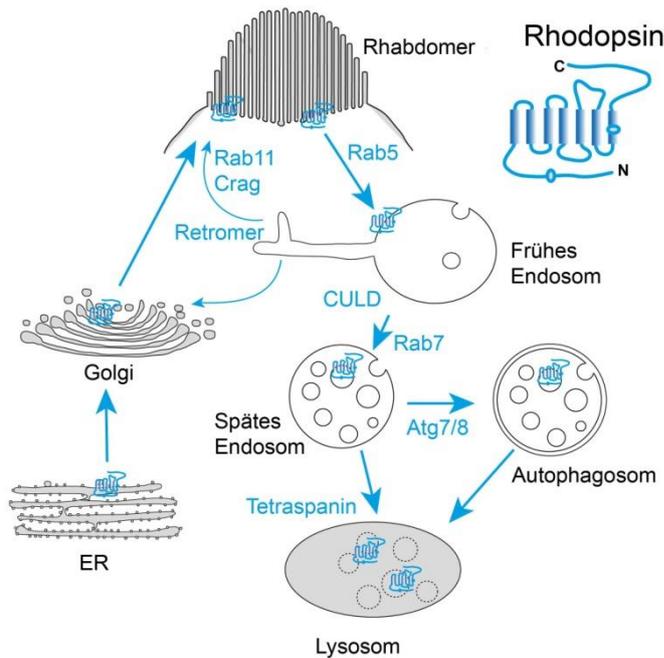


Abbildung 1.6 Rhodopsin1 Gleichgewicht in *Drosophila melanogaster*. Rhodopsin wird über die Bindung an Rab5 in das frühe Endosom aufgenommen. Von dort aus kann es über Rab7 zur Endozytose in das späte Endosom kommen. Über Atg7/8 wird das Autophagosom aktiviert und Rhodopsin im Lysosom abgebaut. Der Transport in das Lysosom kann alternativ auch direkt über Tetraspanin-bedingte Fusion mit dem späten Endosom erfolgen. Alternativ zum Abbau kann Rhodopsin aus dem frühen Endosom auch über den Retromerkomplex recycelt werden und wird mit Hilfe von Rab11 und Crag zurück in die Rhabdomere transportiert. Der dritte Weg ist die Neusynthese, bei der Rhodopsin aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) in den Golgi-Apparat und dann in die Rhabdomere transportiert wird (verändert nach Schopf und Huber 2017)

Bei der Aktivierung und der Deaktivierung von RH1 spielt der Phosphorylierungsgrad eine wichtige Rolle. Nach der Aktivierung wird Rhodopsin durch die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 1 (gprk1) phosphoryliert (Lee et al. 2004) und liegt nun als phosphoryliertes Metarhodopsin (M-p) vor. Durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen bindet Calmodulin an das freie Ca^{2+} und aktiviert so die Phosphatase RDGC (Lee und Montell 2004), die das phosphorylierte Rhodopsin dephosphoryliert. Außerdem sorgt der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex dafür, dass Arrestin2 aus der Bindung an NINAC gelöst wird (Liu et al. 2008). Das freie Arrestin2 wird durch die Ca^{2+} -abhängige Kinase CamKII phosphoryliert und bildet Komplexe mit dem Metarhodopsin (Lu et al. 2009). Metarhodopsin wird entweder durch langwelliges Licht (570 nm) in Rhodopsin konvertiert oder der Chromophor enzymatisch recycelt, an das Opsin gekoppelt und so Rhodopsin generiert (Wang und Montell 2007; Yau und Hardie 2009).

Die exakten Phosphorylierungsstellen von RH1 sind bislang unbekannt. Feststeht, dass die Phosphorylierung im C-Terminus des RH1 stattfindet (Vinós et al. 1997). Dies wurde mit Hilfe einer Fliege untersucht, in der der C-Terminus verkürzt war und die in Folge dessen keine Phosphorylierung zeigte. In Abwesenheit von RDGC kommt es allerdings zu einer Hyperphosphorylierung von RH1, was zu stabilen RH1/Arr2-Komplexen führt. Es kommt zu einer Clathrin-abhängigen Endozytose von Rhodopsin.

Die Phosphorylierung von Rhodopsin, aber auch von Arrestin spielt zudem eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der korrekten Struktur der Rhabdomere. Kommt es wie oben beschrieben zu einer Hyperphosphorylierung von Rhodopsin, führt diese zu einer

Degeneration der Photorezeptorzellen (Kristaponyte et al. 2012). Die Photorezeptorzellen R1-R6 zeigen bereits nach drei Tagen im hell-dunkel Zyklus eine beginnenden Degeneration, wohingegen R7 bzw. R8 erst nach 5 Tagen im hell-dunkel Zyklus beginnen zu degenerieren (Steele und O'Tousa 1990). In R7 und R8 wird nicht RH1, sondern RH3/4 bzw. RH5/6 exprimiert, was den Unterschied in der Degeneration erklären kann. Die Internalisierung der stabilen RH1/Arr2-Komplexe initiiert die retinale Degeneration.

1.5 Der TRP-Kanal

Der TRP-Kanal aus *Drosophila melanogaster* war Namensgeber für eine ganze Klasse von Ionenkanälen, die sich mit unterschiedlichen Aufgaben in sehr vielen Organismen wiederfinden. TRP-Kanäle sind unter anderem an sensorischen Signalwegen beim Sehen, Riechen, Hören, Schmecken, Tasten sowie Temperaturempfinden oder auch an osmotischen Prozessen beteiligt (Balemans et al. 2017). Die Klasse der TRP-Kanäle ist in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe 1 besteht aus den fünf Unterfamilien TRPC, TRPV, TRPM, TRPN und TRPA. Gruppe 2 enthält die zwei Unterfamilien TRPP und TRPML (s. Abbildung 3.7).

Einleitung

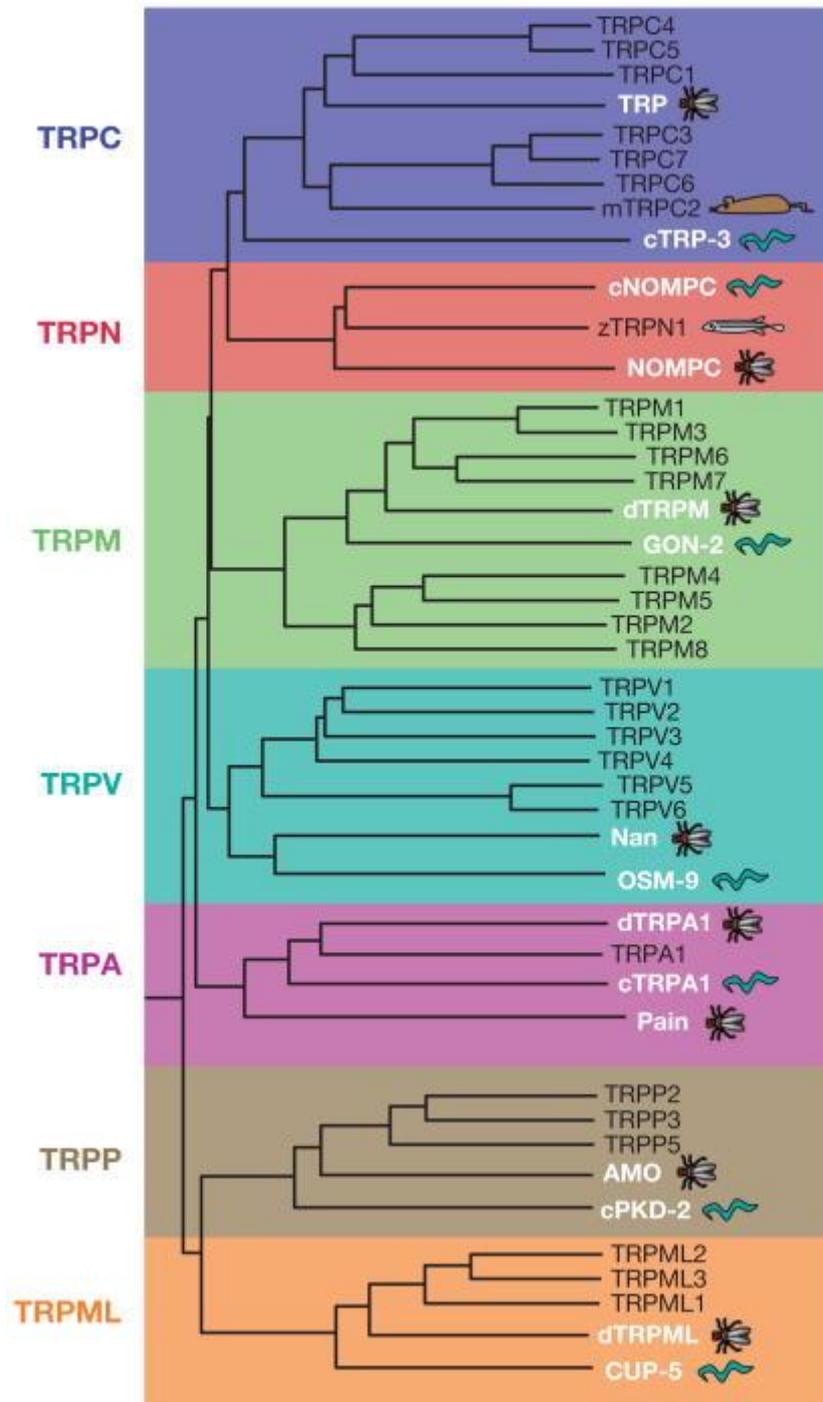


Abbildung 1.7 Die Familie der TRP-Kanäle. Die sieben Unterfamilien der TRP-Kanäle mit ihren Unterklassen. In *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* sind alle sieben Unterfamilien vertreten. Das Symbol der Fliege steht für *drosophila melanogaster*, die grünen Würmer symbolisieren *c. elegans*, die Maus symbolisiert *mus musculus* und der Fisch symbolisiert den Zebrafisch (Cioffi et al. 2009).

Neben den in Abbildung 1.7 aufgeführten Spezies, die für die wissenschaftliche Forschung von großer Wichtigkeit sind, kommen TRP-Kanäle unter anderem auch im Menschen vor. Während in *Drosophila melanogaster* insgesamt 13 verschiedene TRP-Kanäle bekannt sind (Montell 2005), sind es im Menschen 27 (Venkatachalam und Montell 2007). TRP und TRPL in *Drosophila* gehören zur Familie der klassischen TRP-Kanäle (TRPC).

Einleitung

Der TRP-Kanal ist der wichtigste Ionenkanal bei der Phototransduktion in *Drosophila melanogaster*. Seinen Namen erhielt der TRP-Kanal aufgrund des Phänotyps der Nullmutante von *Drosophila*. Diese Mutante zeigt ein sogenanntes „transient receptor potential“, was bedeutet, dass in diesen Fliegen trotz anhaltender Belichtung eine vollständige Repolarisation einsetzt (Cosens und Manning 1969; Minke et al. 1975).

TRP ist ein membrangebundenes Protein mit sechs Transmembrandomänen (Montell und Rubin 1989) und wird in den Rhabdomeren gefunden, wo es über das Gerüstprotein INAD in einem großen Komplex gebunden vorliegt. Es ist der entscheidende Kanal für den Einstrom von Calcium-Ionen in die Photorezeptorzellen. Für seine Öffnung kommen mehrere Faktoren in Betracht, die in 1.1 bereits erörtert wurden.

Für den TRP-Kanal wurden in *Drosophila* 28 Phosphorylierungsstellen gefunden - eine davon N-terminal und 27 C-terminal. Die Phosphorylierung erfolgt zum Teil lichtabhängig. An 15 der gefundenen Stellen findet sich bei Belichtung eine Hochregulierung der Phosphorylierung während es nur eine einzelne Stelle - TRP-S936 - gibt, die im Dunkeln stärker phosphoryliert vorliegt (Voolstra et al. 2010; Voolstra et al. 2013).

Die Phosphorylierung des TRP-Kanals an der Stelle S936 spielt eine entscheidende Rolle bei der Lichtadaptation (Voolstra et al. 2017). Wildtypischen Fliegen zeigen im licht-adaptierten Zustand eine höhere zeitliche Auflösung in der Reizantwort bei oszillierendem Licht als dunkel-adaptierte Fliegen. Es zeigte sich, dass Fliegen, bei denen TRP-S936 nicht phosphoryliert werden kann, die zeitliche Auflösung unabhängig von den Adaptionsbedingungen der von lichtadaptierten Wildtyp-Fliegen entspricht. Im Gegensatz dazu zeigen Fliegen, die eine dauerhafte Phosphorylierung an TRP-S936 imitieren, das zeitliche Auflösungsvermögen dunkel adaptierter Wildtypen (Katz et al. 2017).

Da in vorherigen Arbeiten (Voolstra et al. 2017) RDGC als eine Phosphatase für die Stelle S936 im TRP Kanal gefunden wurde, ist ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit die genauere Untersuchung dieser Interaktion.

1.6 Genetische Manipulation durch CRISPR/Cas-9

CRISPR (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) ist ein System, das in Prokaryoten weit verbreitet ist. Es dient dort der Erkennung und dem Abbau von fremder DNA. Diese ist in der Regel aufgenommene Phagen-DNA. Die Verwendung von CRISPR/Cas für gentechnische Manipulationen ist relativ neu, wird aber in unterschiedlichsten Organismen verwendet.

In *Drosophila melanogaster* wird das CRISPR/Cas9-System verwendet, um in Genen oder Teilen von Genen Unterbrechungen, Deletionen, Insertionen, Austausch oder sogar Tags einzuführen (Bassett et al. 2013; Gratz et al. 2013; Gratz et al. 2014; Kondo und Ueda 2013; Lee et al. 2014; Port et al. 2014; Ren et al. 2013; Sebo et al. 2014; Xue et al. 2014; Yu et al. 2013; Yu et al. 2014).

Einleitung

Für eine erfolgreiche Mutation mit diesem System benötigt es zum einen die Endonuklease Cas9, welche für einen Doppelstrangbruch sorgt, und zum anderen eine sogenannte „guide RNA“ (gRNA). Für die gRNA wird eine Zielsequenz von ca. 20 Nukleotiden, denen ein „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM) vorausgeht, benötigt. Wird nun die gRNA in Fliegen injiziert die Cas9 exprimieren, bindet die gRNA an Cas9 und führt die Nuklease so an die Zielsequenz. Dort sorgen die beiden Nukleaseuntereinheiten von Cas9 für einen Doppelstrangbruch der DNA. Um diesen Bruch zu reparieren, gibt es nun mehrere Möglichkeiten. Eine Methode ist das sogenannte „Non-homologous end-joining“ (NHEJ), bei dem die Enden des Doppelstrangbruchs einfach wieder ligiert werden. Dabei kann es sowohl zu Deletionen als auch Insertionen kommen. Für das gezielte Editieren wird in der Regel das „homology-directed repair“ (HDR) verwendet. In diesem Fall wird ein DNA-Homolog als Templat für eine gerichtete Reparatur genutzt. Dazu wird neben der gRNA auch DNA die von homologen Sequenzen flankiert wird injiziert. Möglich ist dabei auch eine Insertion von größeren Sequenzen wie beispielsweise einem Tag. Diese homologe DNA kann wiederum sowohl als dsDNA, als auch wie in dieser Arbeit, als ssDNA vorgelegt werden. ssDNA-Donoren können aufgrund der maximal synthetisierbaren Größe nur für kleinere Modifikationen bis ~200 Nukleotiden eingesetzt werden (Gratz et al. 2015).

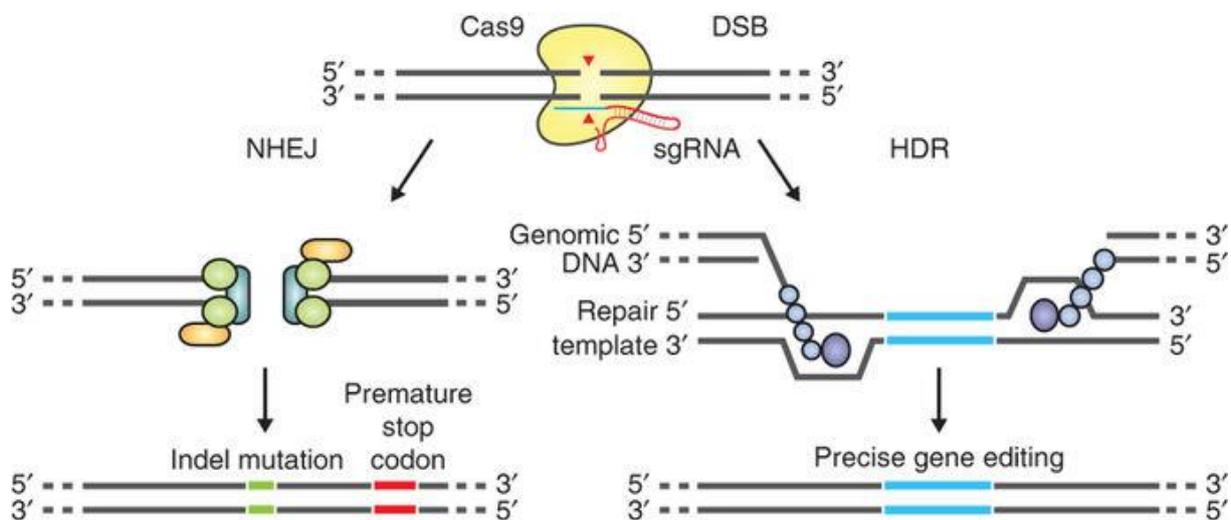


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des CRISPR-Cas9 Systems. Über die GuideRNA (sgRNA) wird die Zielsequenz erkannt und durch die Genschere Cas9 ein Doppelstrangbruch (DSB) induziert. Für die Reparatur des DSB kann entweder ein NHEJ (nonhomologous end joining) oder ein HDR (homology-directed repair) durchgeführt werden. Beim HDR wird zusätzlich zur sgRNA ein sogenanntes „repair“-Templat mitinjiziert, über das gezielte Veränderungen eingeführt werden können. Ohne „repair“-Templat kommt es zu einer Religation des DSB, wodurch es zu Deletionen oder Insertionen kommen kann. (Quelle Bild: Ran et al. 2013)

1.7 Fragestellung der Arbeit

Die Klasse der PPEFs ist im Menschen an vielen Prozessen beteiligt, die in der Medizin und dabei hauptsächlich in der Krebsforschung eine Rolle spielen können. Dennoch ist über die gesamte Klasse dieser Phosphatasen bislang wenig bekannt.

Auch in *Drosophila melanogaster*, in der es nur eine PPEF, die RDGC, gibt, ist die RDGC nicht vollständig charakterisiert. Im Zuge dieser Arbeit wird eine nähere Charakterisierung durchgeführt. Dabei soll zunächst der Ursprung der dritten Isoform auf genetischer Ebene geklärt werden. Um diesen Nachweis zu erbringen, wird die cDNA aus Wildtyp-Fliegen in den TOPO-Vektor ligiert und in *E. coli* kloniert. Diese Klone werden anschließend mit Hilfe einer Kolonie-PCR analysiert. Außerdem soll die Existenz der mittleren RDGC-Isoform auf Proteinebene gezeigt werden. In Folge der Analyse der mittleren Isoform werden Mutanten hergestellt, die unterschiedliche Kombinationen der RDGC-Isoformen exprimieren.

Für alle drei Isoformen soll die subzelluläre Lokalisation untersucht und Gründe für die verschiedenen Lokalisationen gefunden werden. Die Untersuchung der katalytischen Aktivität unterschiedlicher Isoformen soll mit RDGC, welches rekombinant in Sf9-Zellen exprimiert wird, untersucht und im Anschluss einigen Tests unterzogen werden.

RDGC spielt eine Rolle in der Dephosphorylierung von RH1, was im Zuge dieser Arbeit näher untersucht wird. Dabei soll zunächst massenspektrometrisch ermittelt werden, an welchen C-terminalen Stellen Rhodopsin phosphoryliert wird. Da es in *rdgC³⁰⁶*-Nullmutanten zu einer Hyperphosphorylierung von RH1 kommt, besteht ein Teil dieser Arbeit darin, einen Assay zum Nachweis dieser Hyperphosphorylierung zu etablieren. Dieser Assay soll dazu genutzt werden die unterschiedlichen Mutanten zu untersuchen, und so zu ermitteln, welche Isoformen für die Dephosphorylierung von RH1 verantwortlich sind.

Da RDGC neben der Dephosphorylierung von RH1 auch an der Dephosphorylierung von TRP an S936 verantwortlich ist (Voolstra et al. 2017), wird der Einfluss der drei Isoformen bei der Dephosphorylierung von TRP-pS936 mit Hilfe der generierten Mutanten untersucht. Dabei liegt der Fokus sowohl auf der lichtabhängigen Dephosphorylierung an sich und auf der Kinetik dieser Dephosphorylierung. Der Nachweis des Phosphorylierungszustands von TRP soll mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers (α -TRP-pS936) erbracht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

2.1.1 Fliegenzucht

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Fliegenfutter	5 % (w/v) Maismehl 3,2 % (w/v) Saccharose 1,2 % (w/v) Bacto-Agar 2,4 % (w/v) Frischhefe 0,5 % (v/v) Propionsäure 0,0064 % (v/v) 4-Hydroxybenzoemethylester Etwas Ascorbinsäure

2.1.2 Injektionslösungen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Injektionspuffer	5 mM KCl 0,01 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer pH 6,8
Embryowaschlösung	50% Danklorix in H ₂ O
Eiablageplatten	15 g Bacto-Agar 175 ml Bio-Apfelsaft 16 g D-Glucose 500 µl EtOH 5 ml 10 % Nipagin in EtOH 250 µl HAc (konz.)

2.1.3 Molekularbiologisches Arbeiten

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
Agarose-Gel	0,75-4 % (w/v) Agarose in 1 x TAE
EtBr	10 mg/ml in H ₂ O (fertige Lösung)
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin pH 6,8
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in H ₂ O

2.1.4 Protein- und DNA-Extraktion

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
SDS-Extraktionspuffer	4 % (w/v) SDS 1 mM EDTA 75 mM Tris-HCl, pH 6,8
Extraktionspuffer für bakterielle DNA	1% (v/v) Triton X-100 in H ₂ O
Squishing-Puffer (Single Fly DNA)	10 mM Tris pH 8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl 200 µM/ml Proteinase K

2.1.5 SDS-Gelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
5 x SDS Ladepuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 170 mM SDS 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 100 μ g/ml Bromphenolblau
2 x SDS Ladepuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 68 mM SDS 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol 100 μ g/ml Bromphenolblau
5 x SDS-Ladepuffer für Lösungen ohne SDS	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 20 % (v/v) SDS 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 100 μ g/ml Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
4 x SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4 x SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid:N,N-Bisacrylamid (37,5:1)
Ammoniumpersulfat	10 % APS in H ₂ O
Coomassie colloidal	20 % (v/v) Methanol 20 % (v/v) Roti-Blue 5x Konzentrat in H ₂ O

2.1.6 Western-Blot

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Tankblot-Puffer B	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % (w/v) SDS
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T
ECL-Lösung A	0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,25 % (w/v) Luminol
ECL-Lösung B	0,11 % (w/v) p-Hydroxycumarinsäure in DMSO
H ₂ O ₂	30 % in H ₂ O
TBS-T	10 mM Tris

Material und Methoden

	150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,5
--	---

2.1.7 Immunpräzipitation

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Triton-Extraktionspuffer (TXEP)	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 pH 8,0
Digitonin-Extraktionspuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 4 % Digitonin pH 8,0
Triton-Waschpuffer (TXWP)	50 mM Tris 100 mM NaCl 1 % Triton X-100 pH 8,0
Inhibitoren-Mix (Extraktionspuffer)	10 µg/ml Aprotinin 10 mM Benzamidin 10 µg/ml Pepstatin A 50 µg/ml Leupeptin 10 mM Natriumfluorid 1 mM Orthovanadat 50 µM APMSF 10 mM β-Glycerophosphat 500 nM Cantharidin
Inhibitoren-Mix (Waschpuffer)	10 µg/ml Aprotinin 10 mM Benzamidin 10 µg/ml Pepstatin A 50 µg/ml Leupeptin 50 µM APMSF 500 nM Cantharidin

2.1.8 Subzelluläre Fraktionierung

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Extraktionspuffer (XEP)	50 mM Tris 150 mM NaCl 50 µM APMSF pH 8,0
Extraktionspuffer mit Hydroxylamin	50 mM Tris 150 mM NaCl 50 µM APMSF 1 M Hydroxylamin pH 8,0
HEPES	20 mM HEPES 50 µM APMSF pH 7,6
HEPES-SDS	20 mM HEPES 50 µM APMSF 4 % (w/v) SDS pH 7,6

2.1.9 Acyl-Biotin Austausch

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer (pH 7,5)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 pH 7,5
Lysepuffer (pH 7,2)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 pH 7,2
Lysepuffer (pH 6,2)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 pH 6,2

Material und Methoden

2.1.10 Arbeiten mit Bakterien

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
LB-Medium	fertig von Carl Roth 15 g/L in H ₂ O lösen
LB-Agar	fertig von Carl Roth 40 g/L in H ₂ O lösen
NZY-Medium	10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl 12,5 mM MgCl ₂ 12,5 mM MgSO ₄

2.1.11 Transfektion in S2-Zellen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
2 x HBS	50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 280 mM NaCl pH 7,1
2 M CaCl ₂	2 M CaCl ₂ in H ₂ O
Induktionslösung	100 mM CuSO ₄ in H ₂ O

2.1.12 Ni-NTA-Aufreinigung

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0

Material und Methoden

2.1.13 Immuncytochemie

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Fixierungslösung	2 % bzw. 4 % Paraformaldehyd in PBS pH 7,2
Phosphatpuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 7,2
PBS	17,5 mM NaCl 8,41 mM Na ₂ HPO ₄ 1,86 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,2
PBS-T	0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7,2
PBS-T + BSA	0,3 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) BSA in PBS pH 7,2
PBS-T + Milchpulver (PBST-M)	0,1 % (v/v) Triton X-100 1 % Milchpulver in PBS pH 7,2
Blockingpuffer	0,5 % (v/v) Fischgelatine 0,1 % (v/v) Ovalbumin in PBS pH 7,2
Eindeckelmedium	25,6 % (m/v) Mowiol 4.88 2,5 % (w/v) n-Propyl-Gallat 51 % (v/v) Glycin in 1 % PBS
Poly-L-Lysin	0,01 % Poly-L-Lysin in H ₂ O

2.1.14 ERG-Messungen

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Davenport-Lösung	1 mM CaCl ₂ 2 mM KCl 100 mM NaCl 1,8 mM NaHCO ₃ pH 7,2
Chlorinierungslösung	2 M KCl

2.1.15 Chemikalien

Material	Hersteller
bioton-BMCC	ThermoFisher Scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	ThermoFisher
GFP-Trap_M	Chromotek (Planegg-Martinsried)
Grace's Insect Medium Supplemented	ThermoFisher
Grace's Insect Medium Unsupplemented	ThermoFisher
Hydroxylamin	Sigma
Immersionöl (Immersionöl 518F)	Carl Zeiss (Jena)
λ -Phosphatase	New England Biolabs (Ipswich, England)
N-ethylmaleimid	ThermoFisher Scientific
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Pierce™ Protein A-Agarose	Thermo fisher Scientific
Pierce™ Protein G-Agarose	Thermo fisher Scientific
Proteinase K	New England Biolabs
RotiQuant 5x	Carl Roth (Karlsruhe)
TransIT®-Insect Transfection Reagent	Mirus
Trypan Blue	ThermoFisher
Voltalef Öl S10	Voltalef

2.2 Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>rdgC</i> ³⁰⁶	<i>w;+;rdgC</i> ^[306] ;	Steele und O'Tousa, 1990
<i>rdgC</i> ^{306/+}	<i>w;+;rdgC</i> ^{[306]/+} ;	in dieser Arbeit hergestellt
Wildtyp	<i>W;+;+</i>	Laboreigen
<i>rdgC</i> ^[MIO0126-GFSTF.1] (#60143)	<i>yw;Mi{PT-GFSTF.1}rdgC</i> ^[MIO0126-GFSTF.1]	Bloomington Stock Centre
CRISPR-Cas9 (#51323)	<i>yw,vas-Cas9;+;+</i>	Bloomington Stock Centre
<i>TM3,Sb</i>	<i>yw;+;+/TM3,Sb</i>	Laboreigen
<i>TM3,Ser</i>	<i>yw;+;+/TM3,Ser</i>	Laboreigen
<i>rdgC-Myc/TM3</i>	<i>yw;;rdgC-Myc/TM3,Sb</i>	in dieser Arbeit hergestellt
<i>rh1>ttd14-myc</i>	<i>yw;P[y+,pRh1+ttd14-myc];+</i>	Cerny et al., 2015
<i>rdgC</i> ^{ΔL} (#42457)	<i>yw;;Mi{MIC}MIO6989</i>	Bloomington Stock Centre
<i>rdgC</i> ^{ΔSM}	<i>yw;+; rdgC</i> ^{ΔSM}	in dieser Arbeit hergestellt
<i>rdgC</i> ^{ΔS}	<i>yw;+; rdgC</i> ^{ΔS}	in dieser Arbeit hergestellt
<i>rh1>rdgC-S</i>	<i>yw;P[y+,pRh1+rdgC-S];+</i>	Schillo, 2001
<i>rh1>rdgC-S/Cyo</i>	<i>yw;P[y+,pRh1+rdgC-S]/Cyo;+</i>	Schillo, 2001
<i>sine oculis</i> ¹ (#105892)	<i>;so</i> ¹ ;	Kyoto Stock Centre
<i>eya</i> ² (#2285)	<i>;eya</i> ² ;	Bloomington Stock Centre
<i>ninaE</i> ¹⁷	<i>yw;;ninaE</i> ¹⁷	O'Tousa et al., 1985
<i>rh1</i> ^{CT S>A}	<i>yw;P[ninaE</i> ^{S357,358,362,367,371A,T365V}]; <i>ninaE</i> ¹⁷	Kiselev et al., 2000
<i>rh1</i> ^{Δ356}	<i>w;P[y+,pRh1-rh1</i> ^{Δ356}]; <i>ninaE</i> ¹⁷	Vinós et al., 1997
<i>arr2</i> ³	<i>w;arr2</i> ³ , <i>st</i>	Dolph et al., 1993
<i>trp</i> ^{P343}	<i>yw;+;trp</i> ^{P343}	Pak et al., 1979

2.3 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
Prestained Proteinmarker Precision Plus Protein™ Standards All Blue (250-20 kDa)	BioRad (Freiburg)
Unstained Proteinmarker Precision Plus Protein™ Standards All Blue (250-20 kDa)	BioRad (Freiburg)
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs (Ipswich, England)
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs (Ipswich, England)

2.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Geldokumentation	Alpha Imager	Alpha Inootech
Binokular	- Stemi 2000 - C-LEDS	Carl Zeiss (Jena) Nikon
Brutschränke	Verschiedene Modelle	Binder (Tuttlingen)
Dokumentationssystem Westernblot	Chemie Doc™ XRS+	BioRad (Freiburg)
Eismaschine	AF 103	Scotsman
Elektrophoresekammer (Protein)	Mini Protean II Electrophoresis Cell	BioRad (Freiburg)
ERG-Apparatur - Differenzverstärker - Faraday-Käfig - LEDs (blau/orange) - Messkarte - Mikromanipulator - Neutralgraufilter - Netzgerät - Sammellinsen - Stimulationsgenerator	- EXT-08 - BNC-6090A - M3L1-HY-30 M3L1-HB-30 - PS-1152A - PLEM-02M	- NPI electronic - National Instruments - Roithner Lasertechnik - National Instruments - NPI electronic - Linos - Conrad (Stuttgart) - Linos - National Instruments
Feinwaage	XB220A	Precisa (Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager Z1m mit Apotome	Carl Zeiss (Jena)
Gefriermikrotom	CM30505	Leica Microsystems (Bensheim)
Glaskapillarzieher	PC-10	Narishige (Japan)
Homogenisator	Fast Prep24	MP Biomedicals (Eschwege)
Kaltlichtquelle	KL1500 LCD	Schott
Kühl-Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Laufkammer (Westernblot)	Mini Protean Tetra Cell	BioRad (Freiburg)
Lichtmikroskop	Primo Star	Zeiss (Jena)
Lötstation	PS-1152A	Voltcraft (Schweiz)
Magnetrührer	RH basic 2	IKA® (Staufen)
Massenspektrometer	LIQ-Orbitrap XL	ThermoFisher Scientific
Netzteil	Power Pack™ HC	BioRad (Freiburg)
Photometer	BIOPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipettensatz (NG 1607/0-5)	Research 3120	Eppendorf (Hamburg)
Rollenschüttler	TRM 50	IDL (Nidderau)
Sieb	6-2380 (45 und 25 Mesh)	Neolab (Heidelberg)

Material und Methoden

Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf (Hamburg)
Trockenblockheizer/-kühler	GrantBio PCH1	Grant Instruments (England)
Ultrazentrifuge	Optima TL	Beckman Coulter (Brea, USA)
Vortexer	REAX top	Heidolph (Schwabach)
Waage	EW	Kern (Balingen)
Wasseraufbereitungsanlage	Synergy UV	Millipore (Schwabach)
Wasserbad	1004	GFL

2.5 Software

Anwendung	Name
Bildbearbeitung	Photoshop CS2
DNA-Dokumentation	Alphamager 2.0
Diagramme und Statistik	- MS Office Excel 2007 - GraphPad Prism 4
ERG-Messung	WinWCP V4.8.6
Fluoreszenzmikroskopie	Zen2
MS-Analyse	- Progenesis LC-MA Version 4.1 - Scaffold 4
Textbearbeitung	MS Office Word 2007
Western-Blot Dokumentation	- Quantity One - Image Lab

2.6 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Bakterien-Kulturröhrchen	Greiner Bio-One
Blotpapier Whatman 3 mm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Eppis (1,5 ml und 2 ml)	Greiner Bio-One
Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One
Fliegengefäße	Greiner Bio-One
Glaskapillaren (Borosilicate glass) 10 cm	Sutter Instruments
Kanülen	B.Braun (Melsungen)
Objektträger und Deckgläser	Carl Roth (Karlsruhe)
PapPen®	Daido Sangyo Ca. (Japan)
PCR-Tubes	Greiner Bio-One
Petrischalen 55 mm	Carl Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Sarstedt

Material und Methoden

PVDF-Membran	BioRad (Freiburg)
Tissue Tek	ThermoFisher Scientific

2.7 Molekularbiologische Kits

Anwendung	Kit
RNA-Aufreinigung	RNeasy Mini Kit (Qiagen)
cDNA-Synthese	Super Script III First Strand Synthesis (Invitrogen)
cDNA Aufreinigung	- QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen)
Polymerase-Kit	- Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) - Taq DNA Polymerase E (Genaxxon) - ExactRun proofreading Polymerase (Genaxxon)
Plasmid-DNA Isolation	- QIAprep Spin Mini /Midi Prep Kit (Qiagen) - Plasmid DNA Purification Mini Prep Kit (Genaxxon) - PureLink™ HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit (ThermoFisher)
Aufreinigung PCR-Produkt	QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

2.8 Primärantikörper

Antikörper	erzeugt in	Verdünnung	Referenz
α -RDGC Epitop: AS 382-661 aus RDGC-S	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:50 (IC)	Aus der Arbeitsgruppe
α - β -Tubulin (E7, monoklonal)	Maus	1:1000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank
α -INAD Epitop: AS 281-550	Kaninchen	1:2000 (WB)	Voolstra et al., 2015
α -INAD- pT170/pS174 Epitop: T(pT)FTA(pS)MRQC	Kaninchen	1:2000 (WB)	Voolstra et al., 2015
α -Rhodopsin1 (4C5, monoklonal)	Maus	1:1000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank
α -Rhodopsin1 (polyclonal; Epitop: AS 237-258)	Kaninchen	1:1000 (WB)	(Bentrop et al, 1997)
α -TRP (MAb83F6, monoklonal)	Maus	1:1000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank
α -TRP-pS936 Epitop: CADEV(pS)LADD	Kaninchen	1:1000 (WB)	Voolstra et al., 2010
α -Myc (9B11, monoklonal)	Maus	1:1000 (WB) 1:50 (IC)	ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA)
α -V5 (E10/V4RR, monoklonal)	Maus	1:1000 (WB) 1:200 (IC)	ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA)

2.9 Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	erzeugt in	Verdünnung	Referenz
α -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:10000 (WB)	Sigma (München)
α -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:10000 (WB)	Sigma (München)
α -Maus AlexaFluor488 gekoppelt	Ziege	1:100 (IC)	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Maus Cy5 gekoppelt	Schaf	1:100 (IC)	Dianova
Phalloidin AlexaFluor546 gekoppelt	-	1:600 (IC)	Invitrogen (Karlsruhe)
DAPI	-	1:1000 (IC)	Sigma Aldrich

2.10 verwendete Primer und Oligonukleotide

Name	Sequenz
RdgC_R	5'-GGACTTCTTAGGATCGATTACTTTGGA-3'
RdgC_far5'_F	5'-ACGATCCGTACCCGTACACC-3'
rdgC-myc_F	5'-GTCGATTTGACCTTAGGACTTCTT-3'
rdgC-myc_R	5'-AAACAAGAAGTCCTAAGGTCAAAT-3'
rdgC_mitte2_R	5'-ACAAGAAGATCGTCCAATTTTCCATGT-3'
RdgC-RF_F_KpnI	5'-TAGGTACCCTACGCAGCTGCGTGT-3'
RdgC-RB_F_KpnI	5'-TAGGTACCGATGAGAACGCTATCCGA-3'
RdgC-mid-KpnI_F	5'-TAGGTACCATGGGTTGCATAAATTTAAAAA-3'
RdgC_XhoI_R	5'-GAGCTCGGACTTCTTAGGATCGATTACTTT-3'
RdgC_KpnI_R	5'-AAGGTACCTTAGGACTTCTTAGGATCGATT-3'
RdgC-PB_XbaI_F	5'-GTCTAGAGATGAGAACGCTATCCGAG-3'
RdgC-PF_XbaI_F	5'-ATCTAGACTACGCAGCTGCGTGT-3'
RdgC-PB_mitte	5'-GCTGCATAAGAACGGTCT-3'
M13_F	5'-GTA AACGACGCCAG-3'
M13_R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
RdgC-Mid C3A_F	5'- ATCTAGATCGGGGTACCATGGGTGCCATAAATTTAAAAAAGCAGCATAAAG- 3'
RdgC-Mid C3A_R	5'-CCTTTATGCTTTTTTAAATTTATGGCACCCATGGTACCCCGATCTAGA-3'
RdgC-C5A_F	5'-GCGCAGGCACACGGCGCTGCGTAGCATG-3'
RdgC-C5A_R	5'-CATGCTACGCAGCGCCGTGTGCTGCGC-3'
RdgC-C7A_F	5'-ATCGGTGCGCAGGGCCACGCAGCTGCGT-3'
RdgC-C7A_R	5'-ACGCAGCTGCGTGCCCTGCGCACCGAT-3'
RdgC-C5+7A_F	5'-TCATCGGTGCGCAGGGCCACGGCGCTGCGTAGCATGG-3'
RdgC-C5+7A_R	5'-ACCATGCTACGCAGCGCCGTGGCCCTGCGCACCGATG-3'
RdgC-Indel_F	5'-CTCGTCCTTTGCGTTAGCAC-3'
myc-sODN	5'ACGCTGGTTGTGGAACACGACATCGATCCCACGGACTGTGAGTCCAAAGTA ATCGATCCTAAGAAAAGTGAGCAGAAGCTGATCAGCGAAGAAGACCTGTAA GGTCAAATACCAGAAGATGATCAACAAAGTAGCATTATTGTTTTTTGGGCAA AGTTCTC-3'
rdgCshortgRNA_F	5'-GTCGTGCATCAAATGGATGAGAA-3'
rdgCshortgRNA_R	5'-AAACTTCTCATCCATTTTGATGCA-3'
rdgC-Myc_F	5'-GTCGATTTGACCTTAGGACTTCTT-3'
rdgC-Myc_R	5'-AAACAAGAAGTCCTAAGGTCAAAT-3'

2.11 Drosophila-Zucht und -haltung

Für die Haltung der *Drosophila*-Fliegen wurden spezielle Kunststoff-Gefäße mit Standard Maismehl-Nährmedium verwendet. Die Fliegen wurden im Brutschrank (Binder) bei 18 °C, 22 °C bzw. 25 °C gehalten. Bei 18 °C gehaltene Fliegen wurden nach 14 Tagen, Fliegen, die bei 22 °C gehalten wurden nach 10 Tagen und Fliegen, die bei 25 °C gehalten wurden nach 7 Tagen in neue Gefäße umgesetzt. Für alle Versuche wurden sofern nicht anders vermerkt 1-5 Tage alte Fliegen verwendet.

2.12 Belichtung

Für manche Versuche ist eine bestimmte Belichtung der Fliegen nötig. Dazu wurden die Fliegen in farbigen Plastikboxen oder direkt mit neutralweißem Licht belichtet.

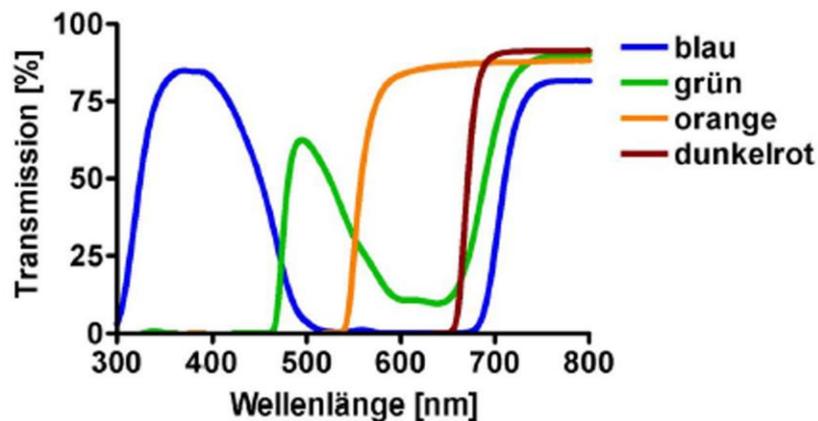


Abbildung 2.1 Transmissionsspektren der verwendeten Farbfilter. Bestimmt mit Hilfe eines Spektralphotometers. (Verändert nach O. Voolstra)

Dunkelgehaltene Fliegen wurden für die Dauer der Dunkelinkubation in lichtundurchlässigen Holzboxen gelagert. Falls nicht anders vermerkt, erfolgte die Hell- bzw. Dunkeladaptation bei Raumtemperatur.

2.13 Injektion in *Drosophila*-Embryonen

Zur Injektion in *Drosophila*-Embryonen erfolgte die Ablage der Eier auf Apfelagarplatten mit etwas Frischhefe. Nach 30-minütiger Ablage wurden die Eier mit Hilfe der Embryonen-Waschlösung abgelöst und gewaschen. Während des nächsten 30 min-Zyklus, wurden die bereits gewaschenen Embryonen nebeneinander auf einem Deckglas mit Tesastreifen aufgereiht und injiziert. Bei der Injektion wurden 27 µl der entsprechenden DNA mit 10 x Injektionspuffer gemischt und ungelöste Bestandteile für 5 min bei 4 °C und 20000 x g abzentrifugiert. Das Gemisch wurde in den Injektionskapillaren aufgezogen und im Bereich der Polzellen in die entsprechenden Fliegen injiziert. Dabei wurde ein Injektionsdruck von 450-630 hPa mit einem Haltedruck von 80 hPa für die Injektionsdauer von 0,1-0,2 s angelegt. Es erfolgte eine Trocknung über Orangegel für 4-6 min und eine anschließende Überschichtung mit Voltalef-Öl. Die überschichteten Embryonen wurden für die weitere Entwicklung auf Apfelagarplatten mit Hefe im Brutschrank bei 18 °C gehalten.

2.14 *Drosophila*-Kreuzung

Für die Kreuzung unterschiedlicher *Drosophila*-Mutanten wurden jungfräuliche Weibchen in einem 6-Stunden-Zyklus bei 25 °C abgesammelt. Im Folgenden sind die Kreuzungsschemata der in dieser Arbeit hergestellten Fliegen zu finden:

2.14.1 *rdgC*³⁰⁶/+

Zur Herstellung einer Fliege, die nur ein wildtypisches *rdgC*-Allel besitzt, wurden *rdgC*³⁰⁶-Mutanten mit wildtypischen Fliegen verkreuzt:

- 1) *rdgC*³⁰⁶ (♂) x wt (♀, Jungfrauen)
- 2) *rdgC*³⁰⁶/+

Aus 2) wurde nur die erste Generation verwendet.

2.14.2 *rdgC-Myc*

- 1) *yw,vasa-Cas9/FM7;+;/rdgC-Myc* (injiziert) x *yw;+;/TM3,Sb*
(Einzelkreuzungen je 1 ♀/♂ Transgen und 5 ♂/♀)
- 2) *yw,vasa-Cas9;+;rdgC-Myc/TM3,Sb*(♂) x *yw;+;/TM3,Ser*(♀)
(Einzelkreuzungen je 1 ♀ x 5 ♀)
- 3) *yw,vasa-Cas9/Y;+;rdgC-Myc/TM3,Ser* inter se
- 4) *yw;+;rdgC-Myc*

2.14.3 *rdgC*^{ΔS} und *rdgC*^{ΔSM}

Schritt 1) bis 3) immer in Einzelkreuzungen mit je 1 ♀/♂ Transgen und 5 ♂/♀

1) <i>yw,vasa-Cas9/FM7;+;(injiziert)</i>	x	<i>rdgC</i> ³⁰⁶
2) <i>vasa-Cas9;+;rdgC(mut)/rdgC</i> ³⁰⁶	x	<i>rdgC</i> ³⁰⁶
3) <i>+;+;rdgC(mut)/rdgC</i> ³⁰⁶	x	<i>yw;+;TM3,Sb</i>
4) <i>yw;+;rdgC(mut)/TM3,Sb</i>	x	<i>yw;+;rdgC(mut)/TM3,Sb</i>
5) <i>yw;+;rdgC(mut)</i>		

2.15 Generieren einer Mutante mit CRISPR-Cas9

2.15.1 Das CRISPR-Cas9-System

Das Clustered Regulatory Interspace Short Palindromic Repeats (CRISPR)-System ist ein System, das ursprünglich aus Bakterien stammt. Dabei wird Virus-DNA gespalten und in den CRISPR-Abschnitt des bakteriellen Genoms integriert. Kommt es zu einem erneuten Virenbefall, wird der CRISPR-Abschnitt transkribiert und die dazu passende Virus-DNA mit Hilfe der Cas-Proteinschere zerschnitten. Dieses System findet auch in anderen Organismen als „Genome editing tool“ Anwendung. Beim Genome-editing braucht es eine Sonde, die in diesem Fall aus einer RNA besteht (Guide RNA; gRNA), welche komplementär zu der zu mutierenden DNA-Sequenz ist. In dieser Arbeit wurden *Drosophila* verwendet, bei denen im Genom bereits die Cas9-Schere integriert ist. Bindet die gRNA an die entsprechende Sequenz, schneidet Cas9 an dieser Stelle und führt zu einem Doppelstrangbruch. Über zelleigene Reparaturmechanismen wird die DNA repariert, was häufig zu Mutationen führt.

Für die Herstellung der *rdgC-Myc*-Fliege wurde ein „homology-directed repair“ durchgeführt. Die beiden hybridisierten Oligonukleotide *rdgC-myc_F* und *rdgC-myc_R* wurden in den pCFD3-dU6:3gRNA-Vektor ligiert. Dazu wurden sowohl die Oligomere als auch der Vektor zunächst mit dem Restriktionsenzym BbsI in Puffer 2.1 verdaut, per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt (s. 2.17.5 und 2.17.8). Bei den beiden Oligomeren wurde eine Phosphorylierung am 5'-Ende eingeführt. Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

Tabelle 2.1 Zusammensetzung Phosphorylierung der *rdgC-Myc* Oligomere

Komponente	Volumen
<i>rdgCshortgRNA_F</i> (100 μM)	1 μl
<i>rdgCshortgRNA_R</i> (100 μM)	1 μl
10X T4 Ligase-Puffer	1 μl
T4 Polynukleotidkinase (10000 U/ml)	0,5 μl
H ₂ O	ad 10 μl

Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C und wurde für 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Ligation erfolgte über eine T4-Ligase (2.17.6), das ligierte Konstrukt wurde in kompetente *E.*

Material und Methoden

coli XL1 blue transformiert (2.17.7) und positive Klone über Ampicillin selektiert. Ein positiver Klon wurde per Sequenzierung bestätigt. Neben diesem Vektor-Konstrukt wurde das „single-stranded“ Oligonukleotid (ssODN) myc-sODN injiziert. Das myc-sODN wurde als Templat für die Reparatur verwendet um am 3'-Ende des *rdgC*-Lokus den Myc-Tag einzuführen. Im Injektionsmix wurden 100 ng/ μ l des ssODN, sowie 250 ng/ μ l des pCFD3-dU6:3gRNA-Vektorkonstrukts verwendet und in γ ,M{vas-Cas9}ZH-2A,w^[1118]/FM7c-Fliegen (Bloomington #51323) injiziert. Anschließend wurden die geschlüpften Fliegen verkreuzt und mittels Westernblot analysiert. Detektiert wurde mit einem α -Myc-Antikörper.

Das zweite Projekt, für das das CRISPR-Cas9-System verwendet wurde, war die Herstellung von Fliegen, denen die kleinen RDGC-Isoformen fehlen. Dazu wurde in der genomischen Region des ersten Exons von *rdgC-RB* mit Hilfe des CRISPR-Cas9-Systems ein Doppelstrangbruch eingeführt. Es wurden die hybridisierten Oligomere *rdgCshortgRNA_F* und *rdgCshortgRNA_R* sowie der VektorpCFD3-dU6:3gRNA mit dem Enzym BbsI in Puffer 2.1 (NEB) verdaut. Es folgte eine Agarose-Gelelektrophorese der verdauten Oligomere und des Vektors mit anschließender Gelextraktion und Aufreinigung (s. 2.17.8). Für eine bessere Ligation wurden die Oligomere an den 5'-Enden phosphoryliert und am 3'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

Tabelle 2.2 Zusammensetzung Phosphorylierung der *rdgCshortgRNA* Oligomere

Komponente	Volumen
<i>rdgCshortgRNA_F</i> (100 μ M)	1 μ l
<i>rdgCshortgRNA_R</i> (100 μ M)	1 μ l
10X T4 Ligase-Puffer	1 μ l
T4 Polynukleotidkinase (10000 U/ml)	0,5 μ l
H ₂ O	ad 10 μ l

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt und im Anschluss für 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Oligomere wurden mit einer T4-DNA Ligase in den vorbereiteten pCFD3-dU6:3gRNA-Vektor ligiert (s. 2.17.6) und in kompetente *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte über Ampicillin und ein positiver Klon wurde anschließend per Sequenzierung bestätigt. Ein Injektionsmix mit 1 μ g/ μ l DNAI wurde in γ ,M{vas-Cas9}ZH-2A,w^[1118]/FM7c-Fliegen injiziert. Die injizierten Fliegen wurden mit *rdgC*³⁰⁶-Fliegen verkreuzt und die Nachkommen mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -RDGC-Antikörper.

2.16 Präparation des biologischen Materials

2.16.1 Präparation von *Drosophila*-Köpfen oder -Augen für Westernblot Analysen

Fliegen des zu untersuchenden Genotyps wurden entsprechend dem Experiment belichtet. Soweit nicht anders vermerkt, wurden belichtete Fliegen im Hellen unter dem Licht des Binokulars und dunkel gehaltene Fliegen im Dunkeln bei Rotlicht (665 nm) präpariert. Für die Präparation ganzer Köpfe wurden die Fliegen in ein Falcontube überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und durch kräftiges Schütteln die Köpfe von den Rumpfen getrennt. Die Köpfe wurden auf einem Kühlakku unter einem Binokular sortiert und in den entsprechenden Puffer überführt. Bei mehr als 100 Köpfen wurden diese in einem mehrstöckigen Sieb mit unterschiedlich großen Einsätzen von den Körpern getrennt. Dabei wurden die Körper mit einem 45 Mesh-Einsatz zurückgehalten und die Köpfe mit einem 25 Mesh-Einsatz aufgefangen.

Bei der Präparation von Fliegenaugen wurden die Fliegen ebenfalls in ein Falcontube überführt und auf Eis betäubt. Auf einem Kühlakku unter einem Binokular wurden die Köpfe mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und anschließend die Augen mit dem Skalpell abgeschnitten. Die Augen wurden in den entsprechenden Puffer überführt und verarbeitet. Soweit nicht anders vermerkt, wurden je Kopf oder je zwei Augen 4 μ l Puffer verwendet. Die Köpfe bzw. Augen wurden mit Hilfe eines Pistills homogenisiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung der Chitinreste wurde bei 22 °C für 10 min bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

2.16.2 Präparation von *Drosophila*-Augen für die Immuncytochemie

Entsprechend belichtete Fliegen wurden in ein Falcontube überführt und auf Eis betäubt. Mit einem Skalpell wurde der Kopf vom Rumpf abgetrennt und halbiert. Der Rüssel wurde entfernt und die Kopfhälften in Fixierlösung (2 % PFA in PBS) für 60 min fixiert. Zur Entfernung der überschüssigen Fixierlösung wurden die Augen 2 x 10 min in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Um die Augen zu entwässern, wurden diese zunächst bei Raumtemperatur 45 min in 10 % Saccharose, dann 30 min in 25 % Saccharose und abschließend über Nacht bei 4 °C in 50 % Saccharose infiltriert. Am darauffolgenden Tag wurden die entwässerten Augen in kleine Aluformen mit TissueTek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.16.3 Präparation von *Drosophila*-Köpfen oder-Augen für die Immunpräzipitation

Die entsprechend belichteten Fliegen wurden in Falcontubes überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Köpfe mechanisch durch kräftiges Schütteln des Tubes von den Rümpfen getrennt. Bei Immunpräzipitationen (IPs), die per Westernblot Analyse ausgewertet wurden, wurden 50 Köpfe verwendet und das Sortieren der Köpfe erfolgte von Hand. Für massenspektrometrische Analysen wurden 300 Köpfe benötigt, welche durch ein mehrstöckiges Sieb mit unterschiedlich großen Einsätzen sortiert wurden. Wurden für die IP Augen anstelle der Köpfe verwendet, so wurden die Fliegen in einem Falcontube auf Eis betäubt und die Köpfe mit einem Skalpell vom Körper getrennt. Die Augen wurden ebenfalls mit einem Skalpell entfernt und in den entsprechenden Puffer überführt. Für IPs mit Auswertung per Westernblot wurden 100 Augen verwendet, für massenspektrometrische Analysen wurden ca. 1000 Augen benötigt.

Sowohl die Köpfe als auch die Augen wurden (bei beiden Analyseverfahren) in 100 µl gekühltem TXEP homogenisiert und anschließend mit weiteren 400 µl TXEP aufgefüllt. Zur Extraktion wurde für 30 min auf Eis inkubiert und von Zeit zu Zeit geschüttelt. Die festen Bestandteile wurden 10 min bei 16 000 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand für die IP weiterverwendet.

2.16.4 Präparation von *Drosophila*-Köpfen für einen Ein-Kopf-Westernblot

Für die Proteinextraktion aus einzelnen Köpfen wurde das zu untersuchende Tier mit CO₂ betäubt und mit Hilfe eines Skalpells der Kopf abgetrennt. Der Kopf wurde in ein Eppendorf-Gefäß mit 10 µl SDS-Extraktionspuffer überführt und mit Hilfe einer weißen Pipettenspitze homogenisiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden 2,5 µl 5x Ladepuffer (4 % SDS) zugesetzt und die Probe entweder bei -20 °C gelagert oder 1 min bei 95 °C inkubiert und anschließend per SDS-PAGE und Westernblot analysiert (s. 2.20.2 und 2.20.4).

2.16.5 Präparation von bakterieller DNA für Kolonie-PCR

Zur Isolation von DNA aus Bakterien für eine anschließende Kolonie-PCR wurde von den entsprechenden Agar-Platten für die zu untersuchende Anzahl an Kolonien jeweils eine halbe Kolonie mit einer weißen Pipettenspitze abgenommen. Die halbe Kolonie wurde in ein 200 µl Reaktionsgefäß mit 50 µl 1 % Triton X-100 überführt. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C für 10 min. Die so gewonnene DNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei 4 °C gelagert.

2.16.6 Single-Fly DNA-Präparation

Eine Fliege wurde in ein PCR-Tube überführt und auf Eis betäubt. 50 µl Squishing-puffer wurden in einer gelben Pipettenspitze aufgezogen, die Fliege mit der Pipettenspitze homogenisiert und der Puffer aus der Spitze entleert. Es folgte ein Verdau mit der beigefügten

Proteinase K für 30 min bei 37 °C gefolgt von einer Inaktivierung bei 95 °C für 5 min. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C.

2.17 Molekularbiologische Methoden

2.17.1 RNA-Isolierung aus *Drosophila*-Köpfen mit Trifast

Ca. 100 Fliegen wurden in einem Falcontube in flüssigem N₂ gefroren und durch Schütteln die Köpfe von den Rümpfen getrennt. Die Köpfe wurden in 300 µl Trifast homogenisiert und mit weiteren 700 µl Trifast aufgefüllt. Das Gemisch wurde 10 min bei 4 °C und 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 s per Hand geschüttelt. Es folgte eine 3 minütige Inkubation bei RT bevor die Phasentrennung für 15 min bei 4 °C und 12 000 x g erfolgte. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Dazu wurde das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert und die RNA bei 4 °C für 10 min bei 12 000 x g pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 7 500 x g erneut pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser (RNase frei) für 10 min bei 55 °C gelöst.

Zur Reinigung der RNA wurde das RNeasy-Kit von QIAGEN verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Der optionale DNase-Verdau wurde ebenfalls entsprechend dem Handbuch durchgeführt und die gereinigte RNA in RNase freiem Wasser eluiert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80 °C.

2.17.2 cDNA-Synthese aus *Drosophila*-Kopf-RNA

Zur Synthese von cDNA aus der isolierten RNA wurde das Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Lifetechnologies) verwendet. Entsprechend dem Handbuch wurde für 5 min bei 65 °C die Sekundärstruktur der RNA aufgebrochen und anschließend mit den mitgelieferten Oligo(dt)₂₀-Primern 50 min bei 50 °C die cDNA synthetisiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Reaktion 5 min bei 85 °C inkubiert. Ein anschließender 20 minütiger Verdau bei 37 °C mit RNase H diente dem Abbau der RNA. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.17.3 PCR zur Amplifikation bestimmter Genbereiche

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde das Phusion® High Fidelity Polymerase Kit (NEB) verwendet. Diese Polymerase ist besonders schnell und weist dabei eine sehr hohe Genauigkeit (*proof reading activity*) auf. Für die Amplifikation bestimmter Bereiche wurden spezifische Primerpaare verwendet. Ein allgemeines Protokoll kann Tabelle 2.3 entnommen

Material und Methoden

werden. Von Genaxxon existiert dieselbe Polymerase unter einem anderen Namen (ExactRun). Diese wurde mit den Puffern des Phusion® High Fidelity Polymerase Kit verwendet.

Tabelle 2.3 Allgemeine Zusammensetzung der PCR-Reaktion mit Phusion/ExactRun

Komponente	20 µl Ansatz	50 µl Ansatz
5x Phusion HF Puffer	4 µl	10 µl
10 mM dNTP-Mix	0,4 µl	1 µl
25 µM Forward Primer	0,4 µl	1 µl
25 µM Reverse Primer	0,4 µl	1 µl
Templat-DNA	variabel	variabel
ExactRun DNA Polymerase	0,2 µl	0,5 µl
Nuklease freies Wasser	ad 20 µl	ad 50 µl

Die Annealing -Temperatur während der PCR ist abhängig davon, welche Schmelztemperatur die verwendeten Primer besitzen und daher variabel. Gleiches gilt für die Dauer der Elongationsschritte. Diese hängt davon ab, wie groß das zu amplifizierende DNA-Stück ist. Bei Primern mit einer angehängten Enzymschnittstelle wird ein zweiphasiges Temperaturprogramm gefahren. Dabei erfolgt das Annealing in der ersten Phase mit einer Temperatur, die anhand der Schmelztemperatur ohne die Schnittstellen berechnet wird. In der zweiten Phase wird mit der eigentlichen Annealing-Temperatur der gesamten Primer verfahren. Tabelle 2.4 zeigt ein allgemein gültiges Temperaturprogramm für die PCR. Die entsprechenden Temperaturprogramme finden sich direkt bei den zugehörigen Ergebnissen.

Tabelle 2.4 Temperaturprogramm für PCR mit Phusion/ExactRun

Schritt	1-Phasen-PCR			2-Phasen-PCR		
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	98 °C	30 s		98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	25-33	98 °C	10 s	10
Annealing	45-72 °C	20 s		45-72 °C	20 s	
Elongation	72 °C	10-30 s pro kB		72 °C	10-30 s pro kB	
Denaturierung	-	-	-	98 °C	10 s	23
Annealing	-	-		45-72 °C	20 s	
Elongation	-	-		72 °C	10-30 s pro kB	
Schluss-Elongation	72 °C	7 min		72 °C	7 min	

Material und Methoden

Bei manchen Anwendungen kommt es nicht auf eine möglichst fehlerfreie Amplifikation des PCR-Produktes an. Bei diesen Versuchen wird gerne die Taq-Polymerase verwendet, die deutlich günstiger ist, als es Polymerasen mit „Proofreading“-Aktivität sind. Auch hierbei werden spezifische Primer verwendet, die bei den entsprechenden Versuchen angegeben sind. Tabelle 2.5 zeigt ein allgemeines Schema für eine Amplifikation mit der Taq-Polymerase. Das dazugehörige allgemeine Temperaturprogramm kann Tabelle 2.6 entnommen werden.

Tabelle 2.5 Allgemeine Zusammensetzung PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase

Komponente	20 µl Ansatz
10x complete buffer E	2 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl
25 µM Forward Primer	0,5 µl
25 µM Reverse Primer	0,5 µl
Templat-DNA	variabel
HF Taq DNA Polymerase E	0,1 µl
Nuklease freies Wasser	ad 20 µl

Tabelle 2.6 Temperaturprogramm für PCR mit Taq-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	25-34
Annealing	50-68 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min pro kB	
Schluss-Elongation	72 °C	7 min	

2.17.4 Kolonie-PCR

Um schnell sehr viele Proben gleichzeitig zu untersuchen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Da es hierbei nicht auf eine fehlerfreie Replikation ankommt, wurde mit der Taq-Polymerase gearbeitet. Bei den Kolonie-PCRs in dieser Arbeit wurden immer die beiden Primer RdgC_far5'_F und RdgC_mitte2_R verwendet. Es wurde folgende Zusammensetzung der PCR-Reaktion verwendet:

Tabelle 2.7 Allgemeine Zusammensetzung der Reaktion für die Kolonie-PCR

Komponente	20 µl Ansatz
10x complete buffer E	2 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl
25 µM RdgC_far5'_F	0,5 µl

Material und Methoden

25 µM RdgC_mitte2_R	0,5 µl
Templat-DNA	3 µl
HF Taq DNA Polymerase E	0,1 µl
Nuklease freies Wasser	ad 20 µl

Es wurde mit folgendem Temperaturprogramm gearbeitet:

Tabelle 2.8 Temperaturprogramm für Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	34
Annealing	53 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Schluss-Elongation	72 °C	7 min	

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss per Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.17.5 Restriktionsverdau der DNA

Um die amplifizierten Genabschnitte in den entsprechenden Vektor ligieren zu können, wurde zunächst sowohl die Insert-DNA als auch der Vektor einem entsprechenden enzymatischen Verdau unterzogen. Für die Kontrolle potentiell positiver Klone wurde ein diagnostischer Verdau in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Die Zusammensetzung der Verdau-Reaktion kann Tabelle 2.9 entnommen werden.

Tabelle 2.9 Restriktionsverdau

Komponente	Diagnostischer Verdau	Präparativer Verdau
10 x Puffer	2 µl	4 µl
Enzym	0,2 µl	0,4 µl
DNA	1 µg	3 µg
Wasser	ad 20 µl	ad 40 µl

Ein diagnostischer Verdau wurde für 2-3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, während ein präparativer Verdau über Nacht bei 37 °C im Brutschrank erfolgte. Im Falle eines diagnostischen Verdau wurde ein erfolgreicher Verdau mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. 2.20.1). Der präparative Verdau wurde ebenfalls über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt um die verdauten Produkte zu reinigen. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben inklusive aller optionalen Schritte gereinigt.

2.17.6 Ligation von Insert- und Vektor-DNA

Die amplifizierte, verdaute und gereinigte DNA wurde über eine „sticky-end“-Ligation an den 5'- und 3'-Enden der Insert- und der Vektor-DNA mit Hilfe einer T₄-DNA-Ligase nach folgendem Schema (s. Tabelle 2.10) ligiert. Um zu kontrollieren, ob der Verdau des Vektors vollständig war und es daher nicht zu einer Religation kommen konnte, wurde ein Kontrollansatz mit verdaulichem und aufgereinigtem Vektor, aber ohne Insert-DNA mitgeführt.

Tabelle 2.10 Ligation von Insert- und Vektor-DNA

Komponente	Ligationsansatz	Kontrollansatz
Vektor-DNA	50 ng	50 ng
Insert-DNA	3-4,5 fache stöchiometrische Menge des Vektors	-
Ligasepuffer	1 µl	1 µl
T ₄ -DNA-Ligase	1 µl	1 µl
Wasser	ad 10 µl	ad 10 µl

Die Ligation erfolgte für 15 min bei RT. Anschließend wurden 5 µl direkt zur Transformation in Bakterien verwendet. Der restliche Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C ligiert und ggf. am darauffolgenden Tag in die entsprechenden Bakterien transformiert.

2.17.7 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien und Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1 blue verwendet. Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine 2 ml Vorkultur der Zellen in LB-Medium mit Tetracyclin angesetzt. Der Stamm *E. coli* XL1 blue besitzt eine Tetracyclin-Resistenz, wodurch sich während der Herstellung kompetenter Zellen eine Selektion durchführen lässt. Mit 100 µl der Vorkultur wurde eine 50 ml Übernacht-Kultur in LB-Medium mit Tetracyclin angesetzt. 1 ml dieser Übernacht-Kultur diente als Inokulum von 200 ml LB-Medium mit Tetracyclin. Die Kultivierung erfolgte bei 250 rpm und 37 °C. Die 200 ml-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6 inkubiert und die Zellen bei 4 °C und 1 000 x g für 15 min pelletiert. Die Zellen wurden in 66 ml RF1-Lösung (sterilfiltriert) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurde erneut pelletiert (1 000 x g, 4 °C, 15 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 16 ml RF2-Lösung (sterilfiltriert) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen in vorgekühlte Gefäße aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl des Ligationsansatzes vermischt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Zu den Zellen wurde 250 µl vorgewärmtes NZY-Medium mit 2 M Glukose gegeben und für 1 h bei 37 °C im

Bakterienschüttler inkubiert. Von den transformierten Zellen wurden 50 µl und 100 µl auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.17.8 Plasmid-DNA-Extraktion und -Aufreinigung

Es wurden einzelne Kolonien in je 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden die 4 ml Kulturen für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit 250 µl aus dieser Kultur wurden 25 ml LB-Medium mit Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Extraktion aus Flüssigkultur wurden je nach Kulturvolumen das QIAGEN-Plasmid Mini oder Midi Kit verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren und die optionalen Schritte berücksichtigt. Bei der Verwendung des QIAGEN-Plasmid-Midi Kits wurde mit dem QIAFilter-Kit gearbeitet. Bei der Isopropanol/Ethanol-fällung wurde jeweils für 1 h bei 4 °C und 5 000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde bei beiden Kits in Wasser gelöst.

Für die Reinigung von DNA wurde das QIAquick PCR-Purification-Kit oder das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet, abhängig davon, ob die DNA in Lösung oder im Gel vorlag. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei optionale Schritte ausgeführt wurden. Eluiert wurde in beiden Fällen mit Wasser. Falls bereits vor der Extraktion/Aufreinigung nur sehr geringe Konzentrationen an DNA zur Verfügung standen, wurden die zu den Kits passenden MinElute-Säulen verwendet um das Elutionsvolumen so gering wie möglich zu halten und damit gleichzeitig eine höchstmögliche Konzentration zu erhalten.

2.17.9 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen in ein Gen, das bereits im entsprechenden Plasmid vorliegt, wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies verwendet. Die benötigten Primer wurden den Herstellerangaben entsprechend entworfen (Primersequenz s. 2.10) und von der Firma Metabion synthetisiert.

Für die Mutagenese wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

Material und Methoden

Tabelle 2.11 Zusammensetzung Mutagenese Reaktion

Komponente	50 µl Ansatz
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix	1 µl
125 ng/µl Mutageneseprimer_F	1 µl
125 ng/µl Mutageneseprimer_R	1 µl
Templat-DNA	30ng
QuickSolution reagent	1,5 µl
Nuklease freies Wasser	ad 50 µl
QuickChange Lightning Enzym	1 µl

Für die Amplifikation wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 2.12 Temperaturprogramm für Mutagenese

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	20 s	18
Annealing	60 °C	10 s	
Elongation	68 °C	2,5 min	
Schluss-Elongation	68 °C	5 min	

Da die eingesetzte Plasmid-DNA im Gegensatz zu der neu synthetisierten DNA methyliert war, wurde das Enzym *DpnI* zum Verdau der nicht-mutierten Ausgangs-DNA verwendet. *DpnI* erkennt spezifisch nur methylierte DNA.

Dazu wurde nach der Mutagenese-Reaktion zu jedem Ansatz 1 µl *DpnI* zugegeben und die Gemische für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA abweichend zu den Herstellerangaben entsprechend 2.17.7 in selbst hergestellte kompetente *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte über Ampicillin.

2.18 Arbeiten mit S2-Zellkultur

2.18.1 Kultivierung von S2-Zellen

Die S2-Zellkultivierung erfolgte in 25 ml Flaschen. Dazu wurde zunächst 1 ml S2-Zellen (in DMSO haltigem Medium bei -80 °C gelagert) schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Kurz vor dem vollständigen Auftauen wurde die Außenseite des Gefäßes mit 70 % Ethanol desinfiziert und die aufgetauten Zellen zu 4 ml frischem S2-Medium (mit 10 % FBS und 1 % PEN/STREP) zugegeben. Bei 27 °C erfolgte das Wachstum bis zu einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml. Anschließend wurden die Zellen mit Medium abgenommen, bei 500 x g 10 min bei RT pelletiert und in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 27 °C, wobei die Kultur alle 3-4 Tage passagiert wurde. Für die Passagierung wurde jeweils 1 ml der aktuellen Kultur in 4 ml frischem Medium aufgenommen und bei 27 °C inkubiert.

2.18.2 Klonierung für S2-Zellen

Zur Expression in S2-Zellen wurde *rdgC-S* und *rdgC-L* aus cDNA amplifiziert. Dabei wurden die flankierenden Primer RdgC-PB_KpnI_F bzw. RdgC_PF_KpnI_F und RdgC_XhoI_R zur Amplifikation verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, isoliert und gereinigt (s. 2.20.1 und 2.17.8). Anschließend wurden die gereinigten PCR-Produkte wie auch der pMT-V5/His A-Vektor mit den Enzymen KpnI und XhoI verdaut (s. 2.17.5), erneut über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt und gereinigt und anschließend mit einer T4-DNA-Ligase ligiert (s. 2.17.6). Das Plasmid-Konstrukt wurde in kompetente *E. coli* XL1 blue transformiert (s. 2.17.7) und auf LB-Platten mit Ampicillin selektiert. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Klonierung wurden einzelne Klone in LB-Medium mit Ampicillin angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und ein Testverdau durchgeführt. Die Bestätigung erfolgte auf einem 1 % Agarosegel.

RdgC-M konnte nicht direkt mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen aus cDNA amplifiziert werden. Daher wurde für die PCR-Reaktion zunächst ein Primerpaar verwendet, bei dem der Forward-Primer in der 5'-UTR (RdgC_IndelF) und der Reverse-Primer flankierend im 3'-Ende lag. Um die Fehlerquote bei der Amplifikation möglichst gering zu halten, wurde die proof-reading Polymerase ExactRun verwendet. Die PCR-Reaktion wurde über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt, isoliert und gereinigt. Um an die PCR-Produkte einen A-Überhang anzuhängen wurden 15 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 2 µl Puffer E, 0,5 µl dNTPs, 2,3 µl H₂O und 0,2 µl Taq-Polymerase für 15 min bei 72 °C inkubiert. Es folgte erneut eine Trennung mittel Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Isolation und Reinigung. Dieses PCR-Produkt wurde in den TOPO-TA-Vektor ligiert, in kompetente *E. coli* XL1 blue transformiert und mit Ampicillin selektiert. Ein positiv selektierter Klon wurde sequenziert und diente als Templat für die folgende PCR-Reaktion.

Im zweiten Schritt wurde *rdgC-M* mit den Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Dazu wurde eine PCR mit einem Primerpaar, das *rdgC-M* flankiert und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme KpnI und XhoI enthält (RdgC-M_KpnI_F und RdgC-XhoI_R) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt, isoliert und gereinigt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen KpnI und XhoI, gefolgt von einer erneuten Agarose-Gelelektrophorese und der Isolation und Aufreinigung des Produkts. Das verdaut und gereinigte PCR-Produkt wurde in den ebenfalls verdauten und gereinigten pMT-V5/His A-Vektor ligiert (s. 2.17.6). Es folgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1 blue mit anschließender Selektion auf Ampicillin-haltigem Medium. Ein positiver Klon wurde per Sequenzierung bestätigt.

2.18.3 Transiente Transfektion und Proteininduktion in S2-Zellen

Die Expression von Proteinen in S2-Zellkultur erfolgte über pMT-basierte Konstrukte, die transient transfiziert wurden. Dazu wurden pro Transfektionsansatz 3 ml Kultur (1×10^6 Zellen/ml) in 35 mm Petrischalen ausgesät und für 24 h bei 27 °C kultiviert. Für jeden Transfektionsansatz wurden 300 µl Lösung A (36 µl 2 M CaCl₂, x µl (=19 µg) rekombinante DNA, ad 300 µl H₂O) langsam und unter ständigem Mischen zu 300 µl Lösung B (2x HBS) zugetropft. Das Gemisch wurde für 30-40 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit bildet sich ein Präzipitat aus DNA und dem Ca²⁺ aus. Das Gemisch wurde anschließend langsam zu den ausgesäten Zellen getropft und weitere 24 h bei 27 °C inkubiert. Vor der Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen für 5 min bei 200 x g bei RT pelletiert und das CaCl₂-haltige Medium abgenommen. Die Zellen wurden vorsichtig in 3 ml frischem S2-Medium resuspendiert und die Proteinexpression durch die Zugabe von 15 µl 100 mM CuSO₄ induziert. Nach einer 24 stündigen Expression wurden die Zellen weiterverarbeitet. Bei Zellen die zu immunocytochemischen Analysen verwendet wurden, wurde vor der Zugabe des CuSO₄ ein Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas mit der beschichteten Seite nach oben in die Zellkulturschale gelegt.

2.19 Arbeiten mit Sf9-Zellen

2.19.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9 Zellen (*Spodoptera frugiperda*) wurden gemäß Herstellerangaben in DMSO haltigem Medium in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen bis zu einer Konzentration von 1×10^7 bis 2×10^7 Zellen/ml kultiviert, für 5 min bei 100 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 4 °C kaltem „cryopreservation medium“ (Grace-medium mit 10 % FBS und 7,5 % DMSO) resuspendiert und in Cryogefäße überführt. In Ermangelung eines automatischen Frosters wurden die Zellen zunächst bei -20 °C und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zur Verwendung von tiefgefrorenen Zellen wurden diese schnell bei 37 °C aufgetaut und das enthaltene DMSO sofort mit vorgewärmtem Grace's-Medium mit FBS verdünnt. Die Konzentration vitaler Zellen wurde mit Hilfe von Trypan Blue bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von 3×10^5 bis 5×10^5 Zellen/ml ausgesät. Die Kultur wurde für die nächsten zwei Passagen bei einer Konzentration von 3×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml gehalten. Anschließend wurde immer dann passagiert, wenn eine Konfluenz von 80-100 % erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 27 °C in Grace's Medium mit 10 % FBS und 1 % PEN/STREP gehalten.

2.19.2 Klonierung der RDGC-Isoformen für die Verwendung im Bac-to-Bac System

Für die Expression in Sf9-Zellen wurde RDGC-S als lösliche Variante und RDGC-L als membrangebundene Proteinvariante kloniert. Da beide Varianten bereits im pMT-V5/His A-Vektor vorlagen, wurden diese Klone als Templat für die PCR zum Einfügen der passenden Schnittstellen verwendet. Es wurde für beide Varianten der Reverse-Primer rdgC-KpnI_R und der entsprechende Forward-Primer (rdgC_PB_XbaI_F bzw. rdgC_PF_XbaI_F) verwendet. Die Sequenzen der Primer können 2.10 entnommen werden.

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit XhoI und KpnI in Puffer 2.1 (NEB) verdaut. Der Vektor pFastBac B wurde ebenfalls mit XhoI und KpnI verdaut. Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte sowie der verdaute Vektor auf einem 1 % Agarose-Gel mit EtBr aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Es folgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit und eine anschließende Ligation der PCR-Produkte in den Vektor. Dazu wurde wie in 2.17.6 beschrieben eine T4-Ligase verwendet. Die ligierten Produkte wurden in *E. coli XL1 blue*-Zellen transformiert und mit Hilfe von LB-Agarplatten mit Ampicillin auf eine positive Ligation selektiert. Es wurde je ein positiver Klon für beide Varianten sequenziert.

2.19.3 Transfektion von Sf9-Zellen (Bac-to-Bac System)

Die passenden Genkonstrukte im pFastBac B-Vektor wurden in kompetente „MAX Efficiency® DH10Bac™“-Bakterien (Thermo Fisher) transformiert. Dazu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der entsprechenden DNA gemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschock wurde für 45 s bei 42 °C durchgeführt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 900 µl vorgewärmtem S.O.C.-Medium für 1-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum und X-Gal/IPTG zur Blau-Weiß-Selektion positiver Klone ausplattiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem PureLink™ HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Elution der DNA von der Säule wurde der Elutionspuffer auf 65 °C erhitzt. Auf diese Weise lassen sich sehr große Plasmide besser eluieren. Nach der Elution mit 900 µl Elutionspuffer wurden 630 µl Isopropanol zugegeben und die DNA für 5 min bei 12 000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70-%igem Ethanol gewaschen (12 000 x g, 5 min, 4 °C). Die gefällte DNA wurde für 10 min an der Luft getrocknet und

anschließend in 50 µl Wasser (65 °C) gelöst. Mittels PCR mit den Klonierungsprimern RdgC-PB_XbaI_F bzw. RdgC-PF_XbaI_F und RdgC_KpnI_R wurden die Klone identifiziert, bei denen eine Rekombination des Konstrukts aus dem pFastBac B™ in das Bacmid aus den „MAX Efficiency® DH10Bac™“ erfolgreich war.

Die eigentliche Transfektion erfolgte mit Hilfe des „TransIT®-Insect Transfection Reagent“ (Mirus). Dazu wurden jeweils 2,5 ml Grace's Insect Medium Supplemented mit 3×10^5 Zellen/ml in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 27 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 2,5 µl des jeweiligen Bacmid-Konstrukts (1 µg/ml) mit 5 µl des TransIT®-Insect Transfection Reagent in 250 µl serumfreiem Grace's Insect Medium Supplemented gemischt. Diese Mischung wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit formen sich Komplexe aus der DNA und dem Transfektions-Reagenz. Nach den 15 min wurde das Gemisch vorsichtig zu den Zellen getropft und für 48 h bei 27 °C inkubiert.

Nach 48 h zeigten sich erste Anzeichen einer viralen Infektion. Sichtbare Anzeichen waren dabei eine Vergrößerung des Zelldurchmessers, ein vergrößerter Zellkern, Verklumpen der Zellen sowie ein Ablösen der Zellkultur vom Boden der Zellkulturflasche.

Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit dem Medium abgenommen und die Zelltrümmer 2 min bei 500 x g abzentrifugiert. Im geklärten Überstand war der erste Virusstock P1, der bei 4 °C lichtgeschützt gelagert wurde.

2.19.4 Virusamplifikation

Da es sich bei P1 um einen Virus mit einem sehr geringen Virustiter handelt, wurde eine Amplifikation des Virustiters durchgeführt. Dazu wurden zunächst 5 ml Sf9-Kultur mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit dem Virus P1 nach folgender Berechnung infiziert:

$$\text{benötigtes P1 – Inokulum (ml)} = \frac{\text{MOI} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right) * \text{Anzahl der Zellen}}{\text{Virustiter} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right)}$$

Es wurde ein MOI = 0,1 und ein geschätzter Virustiter = 5×10^6 pfu/ml verwendet, womit sich ein Virusinokulum von 0,2 ml ergab. Nach 48 h wurden die Zelltrümmer bei RT und 500 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand als Virusstock P2 bei 4 °C aufbewahrt. Es erfolgte auf demselben Weg eine weitere Amplifikation in 20 ml Sf9-Kultur mit 0,8 ml Inokulum (P2). Der so erhaltene Virusstock P3 wurde im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

2.20 Biochemische Methoden

2.20.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei erfolgte die Elektrophorese auf einem 1 % Agarose-Gel. Aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren wandern diese zum Pluspol des angelegten elektrischen Felds und trennen sich dabei ihrer Größe nach auf. Durch den Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im Agarosegel kann dieses mit der DNA interkalieren und durch Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Aufnahme der Signale erfolgte mit Hilfe des Alpha Imager® (Alpha Innotech).

2.20.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine wurden unterschiedlich konzentrierte SDS-Gele hergestellt. Welche Konzentration schlussendlich verwendet wurde, kann den einzelnen Versuchen entnommen werden. Die genaue Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels kann

Tabelle 2.13 entnommen werden.

Tabelle 2.13 Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponenten	Trenngel				Sammelgel
	6 %	8%	10 %	12 %	
H ₂ O		2,9 ml	2,5 ml	2,1 ml	1,2 ml
30 % Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid=37,5:1)		1,6 ml	2 ml	2,4 ml	0,3 ml
4x SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
4x SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	-	-	-	0,5 ml
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	3 µl
10 % APS	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	20 µl

Die entsprechend 2.16.1 hergestellten Präparate wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für 1 min bei 95 °C zur vollständigen Denaturierung erhitzt. Präparate, in denen Rhodopsin (RH1) nachgewiesen werden sollte, wurden nicht erhitzt, da RH1 sonst Multimere bildet. Neben den Proteinextrakten wurde zusätzlich ein Größenstandard (BioRAD, Precision Plus Prestained bei Westernblots und Precision Plus Unstained für Coomassie-Färbungen) aufgetragen.

Für die Elektrophorese wurde pro Gel eine Stromstärke von 30 mA angelegt und die Spannung auf maximal 250 V begrenzt. In dem ca. 1 cm langen Sammelgel wurden die Proben zunächst

zu scharfen Banden komprimiert, die dann im anschließenden ca. 5 cm langen Trenngel aufgetrennt wurden.

2.20.3 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Zur Färbung der Proteine in SDS-PAGE-Gelen wurde das Gel in einer kolloidalen Coomassie-Lösung (60 % Wasser, 20 % Methanol, 20 % Roti®-Blue 5x Konzentrat) über Nacht unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das gefärbte Gel für 40-90 min in Wasser gelagert. Zur Dokumentation wurden die Gele gescannt und am PC bearbeitet (Photoshop CS2).

2.20.4 Westernblot und Inkubation mit Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit wurde der Westernblot als Tankblot durchgeführt, da so hochmolekulare Proteine am besten aus dem SDS-Gel auf die Membran transferiert werden. Als Membran wurde, soweit nicht anders vermerkt, eine PVDF-Membran verwendet. Diese musste vor dem Tankblot zur Aktivierung kurz in Methanol getaucht werden. Anschließend wurden sowohl die Membran als auch die benötigten Whatman-Filterpapiere, die Filterpads und das SDS-Gel für 15 min in Tankblotpuffer B äquilibriert. Das Zusammenbauen erfolgte nach Herstellerangaben und für den Transfer der Proteine auf die Membran wurden 350 mA und eine maximale Spannung von 100 V angelegt. Nach 1 h wurde die Apparatur wieder auseinandergebaut und der prestained Marker mit blauem Kugelschreiber nachgezogen. Die Membran wurde in ein Falcontube mit 20 ml Blockierlösung überführt und für 30 min bei RT geschüttelt. Nachdem so die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt wurden, wurde die Membran über Nacht auf dem Rollenschüttler mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blockierlösung; Verdünnung s. 2.8) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3x 5 min mit je 20 ml TBS-T gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde 1 h bei RT mit dem HRP („Horse-radish-peroxidase“) gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Auch der nicht-gebundene sekundäre Antikörper wurde durch 3x 5 min Waschen in 20 ml TBS-T entfernt. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

2.20.5 Antikörper-Detektion mittels ECL

Um die mit dem HRP-gekoppelten Antikörper markierten Proteine nach dem Westernblot auf einer PVDF-Membran nachzuweisen, wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion genutzt. Das verwendete Pipettierschema kann

Tabelle 2.14 entnommen werden. Die gekoppelte Peroxidase setzt dabei das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol um, wodurch Licht emittiert wird. Dieses Signal wurde mit der Chemie Doc™ (BioRad) detektiert.

Tabelle 2.14 Pipettierschema ECL-Lösung

Lösung	Volumen
Lösung A	2 ml
Lösung B	200 µl
H ₂ O ₂	0,6 µl

2.20.6 Validierung der Linearität des α-RDGC-Antikörpers

Um zu überprüfen ob der α-RDGC-Antikörper für quantitative Untersuchungen verwendet werden kann, wurde eine Antikörpervalidierung durchgeführt. Dazu wurden Extrakte aus Wildtypen und *rdgC³⁰⁶*-Fliegen in ansteigendem Verhältnis gemischt und ein Westernblot mit dem α-RDGC-Antikörper durchgeführt (s. Abbildung 2.2).

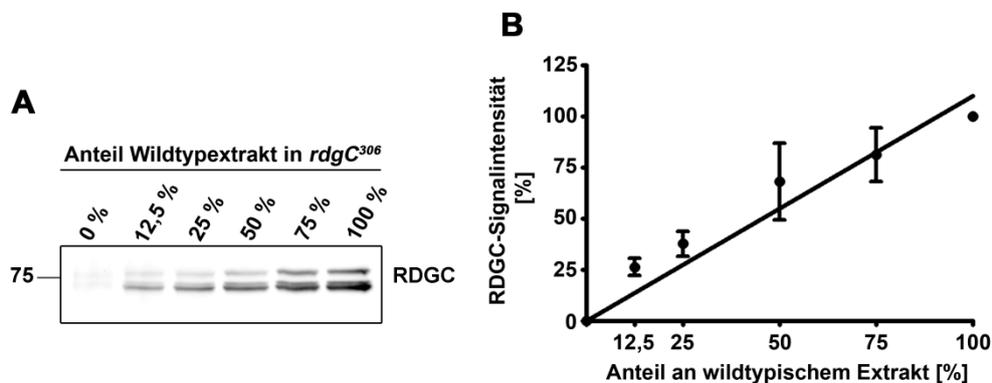


Abbildung 2.2 Validierung der Linearität des α-RDGC-Antikörpers. Es wurden unterschiedliche Anteile aus Kopfextrakten wildtypischer Fliegen mit Kopfextrakten aus *rdgC³⁰⁶*-Mutanten aufgefüllt, so dass der Gesamtproteingehalt in allen Spuren gleich war. A) zeigt einen exemplarischen Westernblot. Es wurden insgesamt 3 Kopfüquivalente je Spur aufgetragen und mit dem α-RDGC-Antikörper nachgewiesen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers ist links dargestellt. In B) wurde die Quantifizierung aller detektierten Banden aus drei Wiederholungen mit einer linearen Regression dargestellt.

Für eine quantitative Analyse wurde das Signal aus Extrakten aus Wildtypen als 100 % und das Signal aus den *rdgC³⁰⁶*-Mutanten als 0 % festgelegt. Die Signale der anderen Gemische wurden in Relation zu diesen beiden Werten gesetzt und eine Regressionsgerade angelegt. Es zeigte sich, dass ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Menge an RDGC-Protein und der Stärke des Antikörpersignals besteht. Darum wurde in dieser Arbeit der α-RDGC-Antikörper zur quantitativen Bestimmung des RDGC-Gehalts in unterschiedlichen Fliegen verwendet.

2.20.7 Hydropathie-Blot

Zur Einschätzung der Membrandurchgängigkeit eines Proteins wurde die Proteinsequenz nach Motiven durchsucht, die einen möglichen Membrandurchgang anzeigen. Dazu wurden Hydropathie-Blots nach Kyte und Doolittle mit Hilfe eines Webtools von ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>; Kyte und Doolittle 1982) durchgeführt. Es wurde ein Fenster von 19 Aminosäuren und ein lineares „weight variation model“ ausgewählt. Bei den

Material und Methoden

erhaltenen Hydrophathie-Blots zeigt ein Wert $>1,6$ einen wahrscheinlichen Membrandurchgang an.

2.20.8 Subzelluläre Fraktionierung von S2-Zellen

Für die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen in S2-Zellen wurde für jedes zu untersuchende Protein ein Ansatz an S2-Zellen ausgesät, transient transfiziert und induziert (s. 2.18.2). Nach 24 stündiger Proteinexpression wurden die Zellen mit dem Medium abgenommen und 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml XEP-Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 50 µM APMSF) gewaschen und anschließend in 90 µl XEP-Puffer homogenisiert. Es folgte ein Ultrazentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g um die membrangebundenen Proteine im Pellet abzutrennen. Die löslichen Proteine im Überstand wurden abgenommen und mit 22,5 µl SDS-Ladepuffer (20 % SDS) versetzt. Das Pellet wurde drei Mal mit 200 µl XEP-Puffer gewaschen und dabei jeweils erneut für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g abzentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 90 µl SDS-Extraktionspuffer gelöst und mit 22,5 µl Ladepuffer (4 % SDS) versetzt. Es wurden jeweils 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend per Westernblot analysiert.

2.20.9 Subzelluläre Fraktionierung aus *Drosophila* Köpfen

Zur Bestimmung der Proteinlokalisierung in Fliegen wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden 45 Fliegenköpfe drei Mal in 30 µl HEPES-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 50 µM APMSF) homogenisiert. Jedem Homogenisationsschritt folgte ein Zentrifugationsschritt von 1 min bei 4 °C und 2500 x g zur Abtrennung der groben Zelltrümmer. Das gepoolte Homogenat wurde für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert und die im Überstand befindlichen Proteine abgenommen und mit 22,5 µl SDS-Puffer (20 % SDS) versetzt. Das Pellet wurde drei Mal mit je 200 µl HEPES-Puffer gewaschen und anschließend erneut für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g abgetrennt. Um membrangebundene und membranassoziierte Proteine voneinander zu trennen, wurde im dritten Waschschrift das gelöste Pellet in zwei Mal 100 µl aufgeteilt und erneut zentrifugiert. Ein Pellet wurde in 45 µl SDS-Extraktionspuffer gelöst und mit 11,25 µl Ladepuffer (4 % SDS) versetzt. Das andere Pellet wurde in 45 µl XEP-Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen membranassoziierten Proteinen wurde abgenommen und mit 11,25 µl Ladepuffer (20 % SDS) versetzt. Das Pellet wurde in 45 µl SDS-Extraktionspuffer und 11,25 µl Ladepuffer (4 % SDS) gelöst. Im weiteren Verlauf wurden je 7,5 Kopfäquivalente auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Westernblot analysiert.

2.20.10 Nachweis der Palmitoylierung mit DTT oder β -Mercaptoethanol

Für den Nachweis einer Palmitoylierung wurde wie in 2.20.9 beschrieben eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Der Extrakt wurde nach dem Waschen ebenfalls halbiert und erneut für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert. Ein Pellet wurde in 45 µl XEP-Puffer mit 2 % β -Mercaptoethanol oder alternativ in 45 µl XEP-Puffer mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) gelöst und für 1 h bei RT inkubiert. Sowohl β -Mercaptoethanol als auch DTT stehen im

Verdacht, Palmitoylierungen abzulösen (Ji et al. 2013). Das zweite Pellet wurde in XEP-Puffer gelöst und ebenfalls für 1 h inkubiert. Anschließend wurde nochmals für 10 min bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und mit 11,25 µl Ladepuffer (20 % SDS) versetzt, während die Pellets in 45 µl SDS-Extraktionspuffer mit 11,25 µl Ladepuffer (4 % SDS) gelöst wurden. Es wurden jeweils 7,5 Kopfüquivalente per SDS-PAGE getrennt und mittels Westernblot analysiert.

2.20.11 Immunpräzipitation aus *Drosophila*-Kopf- oder -Augenextrakten

Für eine Immunpräzipitation (IP) wurden Extrakte aus 300 Köpfen oder 1000 Augen verwendet. Diese wurden entsprechend 2.16.3 hergestellt und mit den daraus resultierenden Überständen weitergearbeitet.

Für die IP muss im Vorfeld der zu verwendende Antikörper an entsprechende Agarose- oder Magnetbeads gebunden werden. Dabei wurden für Antikörper aus Kaninchen Protein A-gekoppelte Beads und für Antikörper aus Maus Protein A/G-gekoppelte Beads verwendet. Es wurden 50 µl Beads 3x mit je 600 µl TXWP gewaschen und anschließend mit 3 µg Antikörper in 100 µl TXWP für 1 h bei 4 °C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurde der nicht gebundene Antikörper 2x mit je 600 µl TXWP und 1x mit 600 µl TXWP+Inhibitoren ausgewaschen.

Bei GFP getaggtten Proteinen wurde ein kommerziell erhältliches Produkt (GFP-Trap®, Chromotek) verwendet, bei dem ein GFP-Antikörper aus Alpaka kovalent an Beads gebunden vorliegt.

Die Extrakte wurden anschließend zu den Beads-gekoppelten Antikörpern gegeben und für 1 h bei 4 °C und 1000 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden nicht gebundene Proteine 4x mit je 600 µl TXWP+Inhibitoren ausgewaschen. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte zwei Mal mit 15 µl 2x SDS-Ladepuffer für 10 min bei 85 °C. Bei IPs in denen Rhodopsin präzipitiert wurde, erfolgte die Elution bei 22 °C, da sich sonst Multimere des Rhodopsins bilden.

2.20.12 Immunpräzipitation aus S2-Zellen

Die Immunpräzipitation aus S2-Zellen diente der Aufreinigung des überexprimierten Proteins. Dazu wurden 24 h nach der Induktion der Proteinexpression mehrere Schalen mit Zellkultur gepoolt und die Zellen für 5 min bei 200 x g bei RT pelletiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte in 100-200 µl TXEP + 50 µM APMSF für 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 100 000 x g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µl als Inputkontrolle abgenommen, der Rest wurde für die Immunpräzipitation verwendet.

Für die IP wurden 100-200 µl Zelllysat mit 3 µg Antikörper für 1 h bei 4 °C und 1000 rpm inkubiert. Um die so entstandenen Präzipitate zu isolieren, wurden dem Gemisch 20 µl Protein

A- oder Protein G-gekoppelte Agarosebeads zugesetzt und 1 h bei 4 °C mit 1000 rpm geschüttelt. Die Proben wurden 4 x mit je 600 µl TXWP + 50 µM APMSF gewaschen und zwei Mal mit je 15 µl 2x SDS-Ladepuffer eluiert.

2.20.13 Aufreinigung von His-getaggtten Proteinen mit Ni-NTA-Agarose

Für eine Ni-NTA-Aufreinigung wurden die entsprechenden His-getaggtten Proteine in S2-Zellen überexprimiert. Für eine native Proteinaufreinigung erfolgte die Lyse in einem harnstofffreien Lysepuffer. Das im Lysepuffer gelöste Zell- bzw Bakterienpellet wurde mit Hilfe des FastPrep-24 Homogenisators und der Matrix D aufgeschlossen. Dazu wurden 3 Impulse für je 20 s bei 6,5 m/s verwendet. Zwischen zwei Impulsen wurden die Extrakte auf Eis gelagert.

Pro 1 ml Zelllysat wurden 50 µl Ni-NTA-Agarose zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 4 °C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Proteine 3 x mit je 1 ml Waschpuffer ausgewaschen. Zur Elution wurden 50 µl Elutionspuffer verwendet. Durch die hohe Imidazol-Konzentration wurde das Protein von der Säule verdrängt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

2.20.14 Zellaufschluss und Ni-NTA-Aufreinigung

Um für die Immunpräzipitation ausreichend Protein zu haben, wurden 2×10^6 Zellen/ml Sf9-Zellen in 40 ml Grace's Insect Medium supplemented mit 10 % FBS mit 1,6 ml P3 infiziert. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mit dem Medium abgenommen und 5 min bei RT und 1 000 x g abzentrifugiert.

Die Zellen wurden mit 5 ml PBS pH=7,4 gewaschen und das Pellet anschließend in 4 ml Lysepuffer mit 1 % Igepal CA-630 und 50 µM APMSF resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem FastPrep®-24 von MP-Biomedicals mit Hilfe der Matrix D. Dazu wurden die Zellen im Lysepuffer in 4 x 1 ml aufgeteilt und vier Mal mit 6 m/s jeweils 20 s homogenisiert. Nach jedem Homogenisationsschritt folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min.

Das Lysat wurde gepoolt, ein Aliquot abgenommen und der Rest mit 200 µl Ni-NTA Agarosebeads bei 4 °C für 1 h unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde drei Mal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und die gereinigten Proteine drei Mal mit je 50 µl Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Schritte wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot oder Coomassie-Färbung überprüft.

2.20.15 Acyl-Biotin-Austauschreaktion

Für die Anreicherung von RDGC wurden zunächst ca. 750 Köpfe von *rdgC-myc/TM3*-Fliegen oder in der Kontrolle von Wildtyp-Fliegen in 500 µl Lysepuffer-2 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin und 1 % IGEPAL CA-630) mit Proteaseinhibitoren (Inhibitor cocktail, Roche) und 50 mM N-ethylmaleimid homogenisiert. Das N-ethylmaleimid musste

Material und Methoden

frisch angesetzt werden, da die Lösung in Wasser instabil ist. N-ethylmaleimid wurde gebraucht, um freie Cysteinreste irreversibel zu blockieren. Die Homogenate wurden für 20 min bei 4 °C inkubiert.

Für die Präzipitation von RDGC wurden 8 µg α-Myc-Antikörper an 50 µl magnetische Protein G-Beads (Dynabeads) gekoppelt (1 h, 4 °C) und anschließend für 3 h bei 4 °C mit den Homogenaten inkubiert. Im Anschluss wurde 3 x mit je 500 µl Lysepuffer ohne N-ethylmaleimid gewaschen und jede Probe halbiert. Eine Hälfte der Beads wurde für 1 h bei 22 °C mit 500 µl Lysepuffer (pH 7,2) mit 1 M Hydroxylamin (Sigma) und die andere Hälfte mit 500 µl Lysepuffer (pH 7,2) ohne Hydroxylamin inkubiert. Hydroxylamin wurde dazu verwendet, Thioester-Bindungen, die bei Palmitoylierungen vorhanden sind zu spalten. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µl Lysepuffer (pH 6,2). Um die so frei gewordenen Cysteine zu markieren, wurden die Proben mit 1,3 µl 8 µM biotin-BMCC (ThermoFisher Scientific) in 1,1 ml Lysepuffer (pH 6,2) für 1 h bei 4 °C markiert. Abschließend wurden die Beads 1 x mit 500 µl Lysepuffer (pH 6,2) und 3 x mit 500 µl Lysepuffer (pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren gewaschen. Zur Elution wurden 25 µl 2 x SDS-Ladepuffer für 10 min bei 80 °C verwendet. Die Proben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit HRP-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen. Als Kontrolle wurde ein Westernblot mit dem α-RDGC-Antikörper durchgeführt.

2.20.16 Detektion der tiefen Pseudopupille

In den Komplexaugen von *Drosophila melanogaster* kommt es bei der richtigen Betrachtung zu einem Phänomen, das sich tiefe Pseudopupille nennt. Auf Grund der Superposition kommt es zu einer virtuellen Überlagerung der Rhabdomere benachbarter Ommatidien. In einem definierten Abstand ist diese Überlagerung als trapezoidales Muster, das dem Muster eines einzelnen Rhabdomers entspricht, sichtbar. Dieses Phänomen kann nicht-invasiv mit Hilfe eines Lichtmikroskops nachgewiesen werden. Es wurde ein MZ 16 F Stereomikroskop mit einer DFC420 C-Kamera (Leica) verwendet um die tiefe Pseudopupille aufzunehmen. Die Belichtung erfolgte antidromisch mit einer Kaltlichtquelle KL 1500 LCD (Schott).

2.20.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Für eine Kalibrierung wurde zunächst eine Eichgerade mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Eichprotein durchgeführt. Dazu wurden aus einer 2 mg/ml Stammlösung folgende Lösungen in Wasser hergestellt: 0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml. Jeweils 800 µl der hergestellten Lösungen wurden mit 200 µl RotiQuant 5x gemischt.

Nach 5-minütiger Reaktion wurde die Absorption bei 595 nm im Eppendorf Photometer gemessen und im Photometer automatisch als Kalibrierung verrechnet.

Zu messende Proteine wurden in Wasser verdünnt und dann im Verhältnis 4:1 mit RotiQuant 5x gemischt. Auch hier erfolgte die Messung bei 595 nm im Eppendorf Photometer, welches die Proteinkonzentration direkt angibt. Zur Berechnung der eigentlichen Proteinkonzentration galt:

Proteinkonzentration = gemessene Proteinkonzentration x Verdünnungsfaktor

2.20.18 Phosphataseassay

Zur Bestimmung der Aktivität rekombinant exprimierter Phosphatase wurde ein *in vitro*-Assay nach Critz und Honkanen (1995) mit dem Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die λ-Phosphatase (NEB) mitgeführt. Es wurden 800 Units der λ-Phosphatase oder alternativ 10 µg rekombinantes Protein in jeweils 100 µl Phosphatasepuffer (25 mM MOPS (pH 7,0), 0,1 M KCl, 0,5 mM DTT, 1 mM MnCl₂, 5 mM EGTA, 0,1 mg/ml BSA, 5,5 mM CaCl₂, 5 µg/ml Calmodulin) für 1 h adaptiert. Nach der Zugabe von 100 µl 1 mM pNPP erfolgte die Aktivitätsbestimmung nach 1 h und nach 16 h bei 30 °C. Die Reaktion wurde bei 410 nm im Photometer durch einen Farbumschlag ins Gelbe bestimmt.

2.20.19 Zeitreihe

Um die Kinetik lichtabhängiger Prozesse reproduzierbar zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau etabliert, in dem sowohl die Lichtintensität, als auch die Lichtqualität konstant waren. Es wurde eine weiße LED (350 mA, 35 000 Lux) verwendet. Die zu belichtenden Fliegen wurden in ein seitlich abgedunkeltes Gefäß mit lichtundurchlässigem Stopfen transferiert, in dem mit einem definierten Abstand von 1 cm von unten belichtet werden konnte. Die Zeitintervalle wurden manuell geschaltet. Direkt nach Ablauf des jeweiligen Zeitintervalls wurden die Fliegen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Anschließend wurden durch Schütteln die Köpfe abgetrennt und jeweils 10 Köpfe in 40 µl SDS-Extraktionspuffer homogenisiert. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurden 10 µl 5 x SDS-Ladepuffer zugegeben und für 1 min bei 95 °C inkubiert. Die groben Bestandteile wurden für 5 min bei RT und 16000 x g abzentrifugiert. Es wurden jeweils drei Kopfüquivalente per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot mit dem α-TRP und dem α-TRP-pS936

Antikörper inkubiert. Dazu wurden SDS-PAGE und Westernblot zwei Mal parallel durchgeführt.

2.21 Immuncytochemie

2.21.1 Immuncytochemie von S2-Zellen

Für die Immuncytochemie von S2-Zellen wurden diese wie in 2.18.2 beschrieben transient transfiziert und die Proteinexpression induziert. Dabei wurde während der Induktion der Proteinexpression ein Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas in die Schale mit den S2-Zellen gelegt. 24 Stunden nach der Induktion wurde das Medium entfernt und das beschichtete Deckglas mit 1 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden zunächst für 10 min in eiskaltem Methanol inkubiert und anschließend 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Das Fixans wurde in drei Waschschritten mit je 500 µl PBS-T ausgewaschen und die Zellen anschließend in 200 µl PBST-M blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 200 µl PBST-M über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Am darauffolgenden Tag wurde erneut drei Mal mit je 500 µl PBS-T gewaschen und die Präparate anschließend für 2 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Neben dem sekundären Antikörper wurde DAPI zur Färbung der Zellkerne verwendet. Diese Inkubation erfolgte ebenfalls in 200 µl PBST-M.

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper und DAPI wurde erneut drei Mal mit je 500 µl PBS-T gewaschen, die Deckgläser kurz in Wasser abgespült und die Präparate anschließend in Mowiol eingedeckelt. Die Detektion erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

2.21.2 Immuncytochemie von *Drosophila*-Augen

Aus den entsprechend 2.16.2 präparierten Fliegenaugen wurden an einem Cryomikrotom 10 µm dünne Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser aufgenommen. Zur Fixierung wurden die Schnitte 10 min in 2 % PFA inkubiert. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde anschließend mit PBS (pH 7,2) entfernt (3 x 5 min, 50 µl) und die Schnitte daraufhin mit PBST+BSA für 30 min in der feuchten Kammer blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (in PBST+BSA) erfolgte über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer. Bei der Untersuchung GFP-getaggtter Proteine war eine Inkubation mit Antikörpern nicht nötig. Hier erfolgte direkt eine Inkubation mit Phalloidin und DAPI in PBST+BSA für 2 h in der feuchten Kammer. Bei Präparaten mit primärem Antikörper wurden die Schnitte am Folgetag drei Mal mit je 50 µl PBS gewaschen und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, Phalloidin und DAPI erfolgte in Blockingpuffer für 2 h in der feuchten Kammer. Nach der zweistündigen Inkubation wurden die Schnitte in beiden Fällen 3x mit 50µl PBS gewaschen, kurz in Wasser geschwenkt und in Mowiol eingedeckelt. Die Detektion erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

2.22 Massenspektrometrie

2.22.1 In-Gel-Verdau

Die Proteine wurden einem In-Gel-Verdau mit Trypsin nach Shevchenko et al (Shevchenko et al. 2001) zugeführt. Dazu wurden die entsprechenden Gelbanden ausgeschnitten, zerkleinert und mit je 200 µl H₂O für 5 min bei 1000 rpm hydriert. Die folgenden Schritte erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur und die Überstände wurden verworfen. Zunächst wurde für 10 min bei 1000 rpm mit 150 µl Acetonitril inkubiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 65 °C und 1000 rpm in 100 µl DTT-Lösung (100 mM NH₄HCO₃, 10 mM DTT), gefolgt von einer erneuten 10 minütigen Inkubation mit 150 µl Acetonitril bei 1000 rpm. Die Gelstücke wurden für 20 min in 85 µl Iodacetamid-Lösung (100 mM NH₄HCO₃, 55 mM IAA) im Dunkeln inkubiert und anschließend 10 min mit 200 µl 100 mM NH₄HCO₃ und 10 min in 150 µl Acetonitril gewaschen. Das Vorquellen erfolgte 30 min mit 25 µl 10 ng/µl Trypsin in 40 mM NH₄HCO₃ auf Eis und der eigentliche Verdau über Nacht bei 37 °C. Abgestoppt wurde der Verdau mit 1 µl 10 % TFA.

Die getrockneten Peptide wurden in 0,1-%iger FA gelöst und mit Hilfe des EASY-nLC 1000 Systems, welches mit einem Q-Exactive Plus Massenspektrometer und einer EASY-Spray Nanoelektrospray Ionenquelle (alles Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war, getrennt. Dazu wurden die Peptide direkt auf eine EASY-Spray Säule (2 µm, 100 Å PepMapRSLC C18, 25 cm x 75 µm, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 35 °C und einer Flussrate von 250 nl/min mit einem Gradienten von 2 % bis 40 % Lösungsmittel B innerhalb von 40 min und bis zu 90 % Lösungsmittel B innerhalb von 5 min. Es folgte ein isokratischer Fluss bei 90 % für 10 min mit anschließendem Gradienten

von 90 % bis zu 2 % Lösungsmittel B innerhalb von 5 min und einer abschließenden Reäquilibration mit 2 % Lösungsmittel B für 15 min. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Lösung A (0,5 % Essigsäure) und Lösung B (0,5 % Essigsäure in Acetonitril/H₂O (80/20, V/V)) verwendet. Detektiert wurde mit einer Orbitrap mit einer Auflösung von 70 000 ($m/z = 200$), einer Maximalen Injektionszeit (MIT) von 120 ms sowie einem Wert für die automatische Verstärkungsregelung (AGC) von 1×10^6 . Die interne Kalibrierung der Orbitrap erfolgte mit Hilfe von Lock-Massen aus der Raumluft (Olsen et al. 2005).

2.22.2 Messung

Für die Messung des RDGC-M Peptids wurden MS/MS-Spektren der 12 häufigsten Peptidvorläufer in der Orbitrap generiert. Dazu wurde eine Fragmentierung über „high energy collision dissociation“ (HCD) mit einer Auflösung von 35000, einer normalisierten Kollisionsenergie von 25 kV und einer Intensitätsgrenze von 1×10^5 durchgeführt. Als Bereich für die Ladung der Ionen der Fragmentierung wurde +2 bis +5 und eine Größe von 1,6 kDa festgelegt. Als weitere Parameter wurde die „automatic gain control“ AGC 5×10^5 und eine maximale Injektionszeit (MIT) von 120 ms eingestellt. Um eine mehrfache Fragmentierung der Ionen zu verhindern, wurden die Vorläufer-Ionen in einem 10 ppm-Fenster für 20 s ausgeschlossen. Die gefundenen Massen wurden gegen eine Modifizierte Datenbank (UP000000803, Version GCA_000001215.4) abgeglichen. In dieser *Drosophila melanogaster* Proteomdatenbank wurde das vorhergesagte Protein RDGC-S entfernt und durch die Sequenz des vorhergesagten RDGC-M ersetzt. Als Suchparameter wurde Trypsin als Verdauungsenzym eingesetzt, zwei ausgelassene Spaltungen und außerdem eine Massentoleranz von 5 ppm für Peptidvorläufer und 0,02 Da für Fragmentationen erlaubt. Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinresten und als variable Modifikation die Oxidation von Methionin festgelegt. Ein RDGC-S spezifisches Peptid wurde in demselben Versuchsaufbau gefunden. Dazu wurde mit den oben genannten Parametern gearbeitet, allerdings wurde gegen die unmodifizierte Datenbank gesucht.

Für die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen von RH1 erfolgte der In-Gel-Verdau wie oben beschrieben. Für die Messung wurden Nano-LC-ESI-MS/MS Experimente durchgeführt und dazu ein ACQUITY nano-UPLC System gekoppelt an eine Orbitrap verwendet. Die verdauten Peptide wurden auf einer Vorsäule (2 cm x 180 μ m, Symmetry C18, 5 μ m Partikelgröße) entsalzt und anschließend auf einer reversed-phased C18-Säule (25 cm x 75 μ m, BEH 130, 1,7 μ m Partikelgröße) getrennt. Es wurde ein Gradient von 1 % ACN zu 40 % ACN in 0,1 % FA innerhalb von 60 min bei einer Flussrate von 250 nl/min verwendet. Detektiert wurde mit $m/z=400$ bei einer Auflösung von 60000. Für die sieben am häufigsten vorkommenden Peptidvorläufer wurden Fragmentierungsspektren erstellt. Fragmentiert wurde mit „collision induced dissociation“ (CID) mit einer Kollisionsenergie von 35 kV. Als Suchparameter wurde ein Trypsinverdau angegeben und eine Massentoleranz von 10 ppm für Peptidvorläufer und 0,06 kDa für Fragmentationen angesetzt. Eine feste Modifikation war die Carbamidomethylierung von Cysteinresten und als variable Modifikationen wurden Oxidation

von Methionin und Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin festgelegt. Gesucht wurde gegen eine feste Datenbank (NCBIInr_20160130 database).

2.23 Elektretinogramm (ERG) von *Drosophila melanogaster*

2.23.1 Das Elektretinogramm

Die elektrischen Vorgänge, die im Zuge eines einfallenden Lichtquants im Auge von *Drosophila melanogaster* stattfinden, lassen sich mit Hilfe eines Elektretinogramms darstellen und messen. Dabei wird die Änderung des elektrischen Potentials zwischen einer Mess- und einer Referenzelektrode gemessen. Die Referenzelektrode wird in den Kopf und die Messelektrode in das Auge der Fliege eingestochen. Dadurch wird die Summe der Potentialänderung mehrerer Photorezeptorzellen als extrazelluläre Ableitung gemessen. Gemessen wird in der Regel mit zwei unterschiedlichen Lichtqualitäten, die zum einen im Absorptionsmaximum von Metarhodopsin (orange, 580 nm) und zum anderen im Absorptionsmaximum von Rhodopsin (blau, 480 nm) liegen.

2.23.2 Versuchsaufbau

Da für eine erfolgreiche Messung eine absolute Bewegungslosigkeit der Fliege wichtig war, wurden die entsprechenden Fliegen in einer gelben Pipettenspitze (2 – 200 µl) fixiert. Dazu wurde die Fliege soweit in eine abgeschnittene Pipettenspitze gepustet, bis nur der Kopf zu sehen war. Anschließend wurde der Kopf am Rüssel mit einem Mini-LötKolben und einer Bienenwachs-Colophonium-Mischung (3:1) fixiert. Für die eigentliche Messung wurde eine Elektrode aus chloriniertem Silberdraht in einer Glaskapillare mit Davenport-Lösung als Referenzelektrode in den Kopf eingestochen. Die Messelektrode, aufgebaut wie die Referenzelektrode, wurde in das Auge eingestochen. Um das System zum einen vor elektrischen Interferenzen von außen und zum anderen vor Fremdbeleuchtung zu schützen, befindet sich die gesamte Messapparatur in einem dunklen Faraday-Käfig. Auf diese Art konnte eine Änderung des elektrischen Potentials bei einem ankommenden Lichtreiz gemessen werden. Die Verstärkung des Signals erfolgte mit einem DPA-2FS Differenzverstärker, die Umwandlung und die Dokumentation erfolgte mit einer PCI-6221-Messkarte. Als Software wurde das Programm WinWCP 4.8.6 verwendet. Für die Messungen wurden orangene ($\lambda_{\text{Max}}= 590 \text{ nm}$) bzw. blaue ($\lambda_{\text{Max}}= 470 \text{ nm}$) LEDs mit einer Lichtintensität von $2,22 \text{ mW/cm}^2$ (orange) bzw. $1,38 \text{ mW/cm}^2$ (blau) genutzt. Das Licht wurde mit Hilfe eines Linsensystems fokussiert und die Intensität bei Bedarf mit Neutralgraufiltern im Strahlengang abgeschwächt.

2.23.3 Verwendetes Messprotokoll

Um möglichst konstante Ausgangsbedingungen zu haben, wurden alle Fliegen vor der Messung für drei Minuten dunkel adaptiert. Im Anschluss wurde das jeweilige Messprotokoll durchgeführt. Wurden bei einer Fliege mehrere Messungen hintereinander durchgeführt, so erfolgte dazwischen ein kurzer Orangelichtpuls gefolgt von einer Dunkeladaptation von drei Minuten.

PDA Test 20 blau

Mit diesem Protokoll wurde der Zeitpunkt des Eintritts in das PDA bei unterschiedlichen Mutanten bestimmt. Dazu wurden zunächst zwei Orangelichtpulse (Neutralfilter log 2) und anschließend 20 Impulse mit Blaulicht (Neutralfilter log 3,4) verwendet. Für die Auswertung wurden die maximalen Amplituden während der einzelnen Blaulichtpulse gemessen. Außerdem wurde der Blaulichtpuls bestimmt, bei dem zum letzten Mal ein on-Transient zu sehen war. Da der Eintritt in das PDA unter anderem dann umso schneller erfolgt, je mehr phosphoryliertes Rhodopsin vorliegt, kann mit diesem Protokoll ein Rückschluss auf den Phosphorylierungsgrad von Rhodopsin in unterschiedlichen Mutanten bei verschiedenen Bedingungen gezogen werden.

2.24 Statistische Auswertung

Für die Statistische Auswertung wurde für jedes Experiment, das mehrfach durchgeführt wurde der Standardfehler (SEM, standard error of the mean) berechnet. Dazu wurde zunächst die Standardabweichung bestimmt und durch die Wurzel der Anzahl der Wiederholungen geteilt:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Mit s = korrigierte Standardabweichung und n = Anzahl der Wiederholungen

Für den Vergleich von Datenpunkten und der Bestimmung der Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) durchgeführt. Es wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt, was bedeutet, dass getestet wird, ob sich die Mittelwerte mehrerer Stichproben unterscheiden. Diese Stichproben unterscheiden sich in einer unabhängigen Variablen. In diesem Fall ist die unterscheidende Variable der Genotyp der betrachteten Fliegen. Mit der einfaktorischen Varianzanalyse wird allerdings nur festgestellt, ob es signifikante Unterschiede in einer Gruppe von Mittelwerten gibt. Deswegen werden verschiedene Post-hoc-Tests nachgeschaltet.

Dunnett's Test

Der Dunnett's Test wird immer dann verwendet, wenn unterschiedliche Messpunkte mit einer Kontrolle verglichen werden. Dabei werden Mittelwertpaare im kleinen Stichprobenumfang untersucht. Eine Varianzhomogenität, also die gleiche Varianz in allen untersuchten Gruppen ist nicht notwendig. Unterschiede werden ab einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet.

Least Significant Difference-Bonferroni Test

Bei dieser Methode werden mehrere Messpunkte miteinander verglichen. Um dabei die Alphafehler-Kumulierung zu neutralisieren, wird die Bonferroni-Korrektur angewandt. Bei der Alphafehler-Kumulierung handelt sich um die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Alphafehlers, also einem Fehler der ersten Art, durch mehrfaches Vergleichen einer Stichprobe. Bei der Bonferroni-Korrektur ist ein Unterschied daher erst dann relevant, wenn $p < 0,05/n$ ist. Dabei ist n die Anzahl der Tests, mit der diese Stichprobe verglichen wird. Die Bonferroni-Korrektur wird immer dann eingesetzt, wenn verschiedene Datenpunkte eines Datensatzes miteinander verglichen werden.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Resultate aus den Versuchen zur Charakterisierung der Phosphatase RDGC gezeigt. Die Ergebnisse werden in drei große Säulen unterschieden. Zunächst werden die drei Isoformen auf Gen- und Proteinebene charakterisiert und Mutanten mit unterschiedlicher Zusammensetzung dieser Isoformen hergestellt. Anschließend wird die subzelluläre Lokalisation untersucht und die Isoformen rekombinant in Zellkultur exprimiert. Abschließend erfolgt eine funktionelle Charakterisierung der unterschiedlichen Isoformen.

3.1 Charakterisierung der RDGC Isoformen und die Herstellung von Mutanten mit verändertem Expressionsmuster der RDGC Isoformen

3.1.1 *Drosophila melanogaster* exprimiert drei RDGC Isoformen

Die Phosphatase RDGC wird in *Drosophila melanogaster* durch das *rdgC*-Gen codiert. Von diesem einen Gen ausgehend, werden vier unterschiedliche mRNA-Sequenzen transkribiert. Dabei werden wiederum die drei mRNA-Stränge *rdgC-RF*, *-RG* und *-RH* in ein ca. 84 kDa großes Protein translatiert, während die vierte mRNA *rdgC-RB* für ein kleineres, ca. 72 kDa großes Protein codiert. Für die Analyse der beiden Varianten auf Proteinebene wurde eine Westernblot-Analyse der Proteine aus wildtypischen Köpfen durchgeführt. Um dabei die Proteinbanden bestmöglich zu trennen, erfolgte die SDS-PAGE über ein 10-%iges SDS-Gel und der Nachweis mit Hilfe des α -RDGC-Antikörpers (s. Abbildung 3.1)

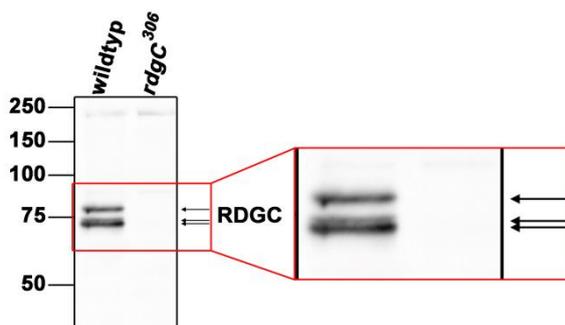


Abbildung 3.1 Ein Westernblot von *Drosophila*-Kopfextrakten mit α -RDGC-Antikörper zeigt drei Proteinvarianten. Extrakte aus wildtypischen Fliegen zeigen bei ca. 75 kDa drei voneinander abgegrenzte Banden, die in der *rdgC*-Nullmutante (*rdgC³⁰⁶*) fehlen. Im vergrößerten Ausschnitt ist deutlich erkennbar, dass über der kleinsten Bande eine weitere Bande zu sehen ist. Pro Spur wurden drei Kopfüquivalente aufgetragen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit dem α -RDGC-Antikörper. Die Größe (in kDa) und Position der Molekulargewichtsmarker ist links angegeben.

Anstelle der erwarteten zwei Banden bei ca. 76 und 85 kDa wurden mit dem α -RDGC-Antikörper drei Banden nachgewiesen. Die dritte Bande lag knapp oberhalb der kleineren RDGC-Bande und konnte in *rdgC*-Nullmutanten nicht nachgewiesen werden. Obwohl diese dritte RDGC-Isoform auf Proteinebene in der Literatur bereits beschrieben worden ist (Lee

Ergebnisse

und Montell, 2001), konnte ihr Ursprung bis jetzt nicht geklärt werden. Um die drei unterschiedlichen Isoformen im Folgenden unterscheiden zu können, wurde das kleinste Protein als RDGC-S (von Short), das mittlere als RDGC-M (Mid) und das größte als RDGC-L (Long) bezeichnet. Auf RNA- und DNA-Ebene wurden die Bezeichnungen *rdgC-S*, *rdgC-M* und *rdgC-L* eingeführt.

Da es für das Erscheinen der dritten Bande keine Erklärung gab, wurde zunächst auf genetischer Ebene nach einem Grund für deren Auftreten gesucht. Dazu wurde RNA aus wildtypischen Fliegen isoliert und mit Hilfe eines *rdgC*-spezifischen Primers, der nahe am 3'-Ende des *rdgC*-Gens bindet (*rdgC_R*), in cDNA umgeschrieben. Die so generierte cDNA wurde als Templat für eine Amplifikation der unterschiedlichen *rdgC*-Varianten verwendet.

Da in der hier zugrundeliegenden Arbeitshypothese der Ursprung der mittleren Isoform im Transkript der kurzen Isoform *rdgC-RB* liegt, wurde für die PCR-Reaktion derselbe reverse-Primer wie bei der cDNA-Synthese (*RdgC_R*) sowie ein Forward-Primer, der in der 5'-UTR der kurzen Isoform bindet (*RdgC_far5'_F*) verwendet. Zur Kontrolle einer gelungenen PCR-Reaktion wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und ein PCR-Produkt auf der Höhe von ca. 2 kbp gefunden.

Die verbliebene PCR-Reaktion wurde zunächst mit dem Qiagen PCR-Purification Kit gereinigt, anschließend in den TOPO-TA-Vektor pCRTM2.1-TOPO[®] kloniert und in chemisch kompetente *Escherichia coli XL1 Blue*-Zellen transformiert. Zur Selektion positiver Klone wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

Aus dieser Klonierung wurden 24 Klone einer Kolonie-PCR zugeführt. Dazu wurde zunächst die DNA der einzelnen Klone isoliert und für die Kolonie-PCR der Forward-Primer in der 5'-UTR sowie ein in der Mitte des *rdgC* liegender Reverse-Primer (*rdgC_mitte2_R*) genutzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %-Agarose-Gel analysiert (s. Abbildung 3.2).

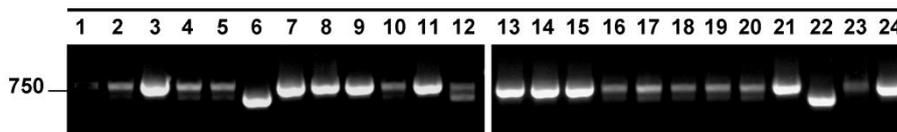


Abbildung 3.2 Agarosegel der Kolonie-PCR mit *rdgC-RB* in TOPO-TA. Auf der Höhe von 788 Bp waren die Fragmente zu finden, die *rdgC-S* mit einem Teil der 5'-UTR entsprechen. Die beiden Klone 6 und 22 zeigten kleinere PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 600 bp. Links ist die Größe (in Bp) sowie die Position des verwendeten DNA-Markers gezeigt.

Bei 22 der untersuchten Klone ergab sich ein PCR-Produkt mit der Größe von 788 Bp, welches die erwartete Größe war. Zwei der Klone zeigten allerdings ein kleineres PCR-Produkt, welches nur ca. 600 Bp groß war.

Dieses kleinere PCR-Produkt konnte zunächst nicht erklärt werden. Aus diesem Grund wurden die beiden Klone 6 und 22 sequenziert und Klon 21 als Kontrolle mitgeführt. Als Sequenzierungsprimer wurden die Vektor-spezifischen Primer M13 (Forward und Reverse) verwendet. Bei der Sequenzierung ergab sich, dass in den Klonen 6 und 22 in der 5'-Region ein

Ergebnisse

Unterschied zum Kontrollklon 21 zu finden war. Während in Klon 21 wie erwartet die 5'-UTR und die Anfangssequenz, die der kleineren RDGC-Isoform entsprechen, zu finden war, zeigte sich in Klon 6 eine andere Sequenz, weswegen dieser Klon im folgenden als *rdgC-M* und der Klon für die kurze Isoform als *rdgC-S* bezeichnet wird.

```

rdgC-S ....CCTTCTCATGGGTTGCATAAATTTAAAAAAGCATAAAGGGCCACCTACGCCACCAGATCTA
rdgC-M....CCTTCTCATGGGTTGCATAAATTTAAAAAAGCATAAAGGGCCACCTACGCCACCAGATCTA

rdgC-S GAGACAAGTGTGTAAAGACTTTAAAGCGGCTGCAAAATATAATTATAGCGTAAATGTTAACCA
rdgC-MGAGACAA-----

rdgC-S GTTGTTAGCCCAAAAAATCCCCTCAACCCCTCTCTATCCCCTTGCCACAGTCTTTGACGTT
rdgC-M-----

rdgC-S TTCAGCATTGTGTTAATAGCAGACGAATAAATTGCATCAAATGGATGAGAACGCTATCCGAGC
rdgC-M-----CTATCCGAGC

rdgC-S GGCAATCTTCATCCAGAAATGGTATCGCAGGCACCAGGC . . .
rdgC-MGGCAATCTTCATCCAGAAATGGTATCGCAGGCACCAGGC . . .
  
```

Abbildung 3.3 *rdgC-M* und *rdgC-S* sind Spleißvarianten aus *rdgC-RB*. Vergleich des 5'-Bereichs der mRNA Sequenzen von *rdgC-S* und *-M*. In schwarz ist der untranslatierte Bereich und in rot der proteinogene Bereich dargestellt. Das jeweilige Startcodon ATG wurde mit einem Unterstrich markiert.

Wie Abbildung 3.3 zeigt, ergibt sich das Protein RDGC-M aus der Nutzung einer alternativen Spleißstelle des Transkripts *rdgC-RB*. *RdgC-S* unterscheidet sich in den ersten 13 Basenpaaren der codierenden Sequenz von denen in *rdgC-M*, wobei *RdgC-M* außerdem im N-Terminus 48 zusätzliche Basenpaare hat. Damit codiert *rdgC-M* für eine RDGC-Variante, welche sich im N-Terminus von den beiden bekannten Varianten, hier als RDGC-S und RDGC-L bezeichnet, unterscheidet. Da nur der N-Terminus betroffen ist, sollten sich die funktionell wichtigen Motive wie IQ-Motiv, katalytische Domäne und EF-Hände auch in RDGC-M (s. Abbildung 3.4) finden. Mit Hilfe der Proteinsequenz, die aus dem nun bekannten Transkript hergeleitet wurde, konnte außerdem kein Unterschied im C-Terminus gefunden werden. Dafür sprach auch, dass das Epitop des α -RDGC-Antikörpers im C-Terminus liegt und alle drei Proteine von ihm erkannt wurden (s. Abbildung 3.4)

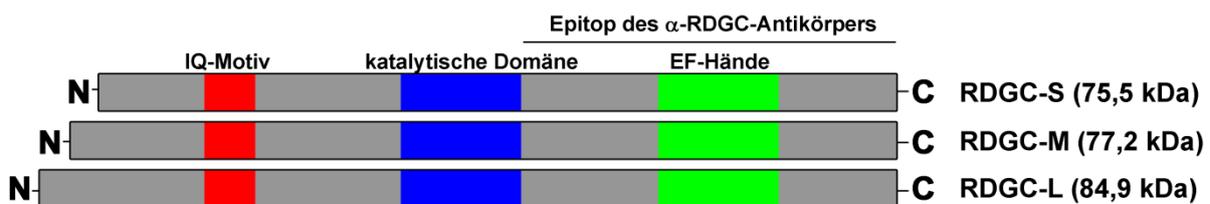


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der verschiedenen RDGC-Isoformen. Die drei Protein-Isoformen, die von RDGC existieren, besitzen drei wichtige Motive. Ein IQ-Motiv zur Bindung an Calmodulin, EF Hände für die Bindung an Calcium sowie eine katalytische Domäne. Zusätzlich wurde der Bereich markiert, in dem das Epitop des anti-RDGC Antikörpers liegt.

3.1.2 Nachweis von RDGC-M auf Proteinebene

Um nachzuweisen, dass von der gefundenen *rdgC-M* mRNA ein entsprechendes Protein in Fliegen transkribiert wird, sollte der für RDGC-M spezifische N-terminale Bereich massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Hierzu musste RDGC durch Immunopräzipitation gereinigt werden. Zunächst wurde eine Immunpräzipitation mit dem α -RDGC-Antikörper durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper an Protein A-Agarosebeads gebunden und dann mit dem Extrakt homogenisierter Augen wildtypischer Fliegen inkubiert. Auf ein 10 % SDS-Gel wurden ein Aliquot des Inputs sowie die Fraktion mit den eluierten Proteinen aus der Immunpräzipitation aufgetragen. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Es konnte auf der erwarteten Höhe keine Bande nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen wurden unterschiedliche Extraktionspuffer mit verschiedenen Detergenzien und NaCl-Gehalten verwendet, der Antikörper sowohl kovalent als auch nicht-kovalent an die Beads gebunden und die Zeit der Immunpräzipitation variiert. Trotz dieser Variationen war es nicht möglich, RDGC mit Hilfe des α -RDGC-Antikörpers zu präzipitieren. Daraus wurde gefolgert, dass der α -RDGC-Antikörper für eine Immunpräzipitation nicht geeignet ist.

Um dennoch RDGC isolieren zu können, wurde mit einer Fliege weitergearbeitet, in der das RDGC-Protein markiert vorlag. Eine solche Fliege ist die im Bloomington Stock Center unter #60143 erhältliche Fliege *rdgC*^[MI00126-GFSTF.1], bei der mit Hilfe des „*Minos mediated integration cassette*“ (MiMIC)-Systems mehrere Tags in das *rdgC*-Gen eingeführt wurden.

Neben einem eGFP-Tag wurde über die Kasette außerdem ein Flash-, Streptavidin-, TEV- und ein 3xFlag-Tag in das Gen integriert. In diesem Fall wurde der Tag zwischen dem dritten und dem vierten Exon eingeführt, was zur Folge hatte, dass alle drei Isoformen betroffen waren (s. Abbildung 3.16).

Für die Isolierung des getaggten RDGC wurde zunächst eine IP gegen den eGFP-Tag durchgeführt. Dabei wurde die GFP-Trap[®] (Chromotek) verwendet, da dort ein Antikörper aus Alpaka verwendet wird. Dieser Antikörper besteht lediglich aus einer Kette, die kovalent an die Beads gebunden vorliegt. Da die GFP-Trap nicht in jedem Fall den Tag erkennt, wurde parallel mit einem kovalent an die Beads gekoppelten GFP-Antikörper (Roche) gearbeitet. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie nachgewiesen.

Weder in der IP mit dem GFP-Antikörper noch mit der kommerziellen GFP-Trap[®] konnten Proteine in der gesuchten Größe von ca. 100 kDa präzipitiert werden. Das größere erwartete Molekulargewicht war auf die eingeführten Tags mit einer Gesamtgröße von ca. 30 kDa zurückzuführen. Ein Grund dafür könnte sein, dass der GFP-Tag nicht am C- oder N-terminalen Ende der Proteine, sondern stattdessen in der Mitte des Proteins liegt. Dort ist er eventuell

Ergebnisse

sterisch gehemmt und kann deswegen nach der Extraktion in nicht-denaturierendem Puffer nicht vom GFP-Antikörper oder der GFP-Trap® erkannt werden.

Da in diesen Fliegen RDGC noch durch weitere Tags markiert ist, wurde eine IP mit einem α -FLAG-Antikörper gebunden an Protein-A/G-Agarosebeads durchgeführt. Auch in diesem Fall konnte RDGC nicht präzipitiert werden.

Deswegen wurde im Folgenden eine Fliege hergestellt, bei der ein Tag in den C-Terminus eingeführt wurde. Um die Struktur des Proteins möglichst wenig zu stören, wurde mit dem Myc-Tag ein sehr kleiner Tag eingeführt.

Herstellung einer *rdgC-myc* Fliege mit CRISPR/Cas9

In das *rdgC*-Gen wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems ein Myc-Tag eingefügt. Im C-Terminus des Gens befindet sich ein „Protospacer adjacent motif“ gefolgt von der Zielsequenz (target site). Über CRISPR/Cas9 wurde ein Doppelstrangbruch induziert und mit Hilfe eines zusätzlich injizierten „single-stranded oligodeoxynukleotide“ (ssODN) wurde ein so genanntes „homology-directed repair“ (HDR) durchgeführt und so der Tag eingebracht. Dieser ssODN wurde zusammen mit der passenden gRNA in *yw,vas-Cas9;+;+*-Fliegen, die Cas9 exprimieren, injiziert. Tabelle 3.1 zeigt die Statistik dieser Injektion und der anschließenden Kreuzung wie in 2.14.2 beschrieben.

Tabelle 3.1 Statistik der Injektion

Schritt	Ergebnis
injizierte Embryonen	2120
Larven	136
geschlüpfte Fliegen	121
unabhängige Linien	1
abhängige Linien	2

Auf diese Art wurde am 3'-Ende des *rdgC*-Gens die Sequenz des *myc*-Tags eingeführt. Die zweite Generation der geschlüpften Fliegen wurde für ein Screening nach einem erfolgreichen Einbau des *myc*-Tags verwendet. Dazu wurden Homogenate aus einzelnen Köpfen über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem α -MYC-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde auf jedem Western-Blot der Kopfextrakt einer *rrh1>ttd14-myc*-Fliege mitgeführt.

Ergebnisse

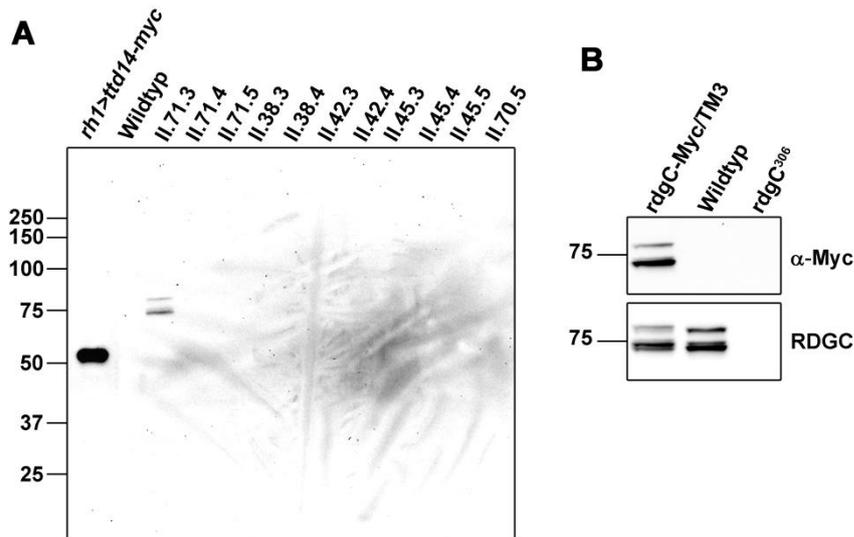


Abbildung 3.5 Nachweis der Insertion des Myc-Tags. A) zeigt einen exemplarischen Westernblot des Screenings nach positiven *rdgC-Myc* Fliegen. Neben der Positivkontrolle durch eine Fliege, die Myc-getaggetes TTD14 exprimiert, konnte mit dem α -Myc Antikörper lediglich in der Linie II.71.3 ein Signal detektiert werden. Es wurde jeweils ein Kopfüquivalent aufgetragen. B) zeigt den Westernblot von Kopfextrakten aus den positiven Fliegen des Screenings aus A) nach Beendigung der Kreuzung. Als Kontrollen wurden Wildtypen und *rdgC³⁰⁶*-Mutanten mitgeführt. Neben der Detektion mit dem α -Myc-Antikörper wurde zur Kontrolle das Signal mit dem α -RDGC-Antikörper detektiert. Wie erwartet, weisen alle drei RDGC-Banden in der *rdgC-myc/TM3*-Fliege ein etwas höheres Molekulargewicht auf als diejenigen aus der Wildtyp-Fliege. Für jeden Genotyp wurden drei Kopfüquivalente aufgetragen. Der große dunkle Fleck in (A) war unspezifischer Hintergrund, der aus Rillen in der Aufnahmeplatte resultierte.

Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft einen Westernblot aus dem Screening, inkubiert mit einem α -MYC-Antikörper. In der ersten Spur wurde als Positivkontrolle der Extrakt aus dem Kopf einer *ttd14-myc* Fliege aufgetragen, während in der zweiten Spur ein Extrakt aus Wildtyp-Fliegen als Negativkontrolle diente. Die folgenden Spuren zeigen verschiedene Linien, wobei die römische Zahl den Kreuzungsschritt, die zweite Zahl die Founderfliege und die letzte Zahl die aus der Founderfliege hervorgegangene Linie angibt. In der Linie II.71.3 konnten alle drei Proteinbanden mit dem α -Myc-Antikörper nachgewiesen werden.

Unter 121 getesteten Linien konnte neben der in Abbildung 3.5 gezeigten Linie nur noch eine weitere Linie identifiziert werden, bei der ein Signal zu erkennen war. Diese zwei Linien gingen beide aus derselben Founderfliege hervor. Der Versuch, im weiteren Verlauf der Kreuzung das mutierte Gen homozygot zu kreuzen scheiterte. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass es bei der genetischen Manipulation mit CRISPR/Cas9 zu einem unspezifischen Doppelstrangbruch gekommen ist, der eine zusätzliche Mutation in einem anderen Gen, welches homozygot letal ist, zur Folge hat. Für die weiteren Versuche wurden heterozygote Fliegen des Genotyps *rdgC-myc/TM3* verwendet.

Isolierung und massenspektrometrische Analyse von RDGC aus *rdgC-myc/TM3* Fliegen

Für die Isolierung der drei getaggten RDGC-Proteine aus *rdgC-myc/TM3*-Fliegen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde ein an Protein A/G-Agarosebeads gekoppelter α -Myc-Antikörper verwendet. Die IP wurde entsprechend 2.20.11 durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf zwei 10 % SDS-Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt, das andere wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und einem α -RDGC-Antikörpers inkubiert.

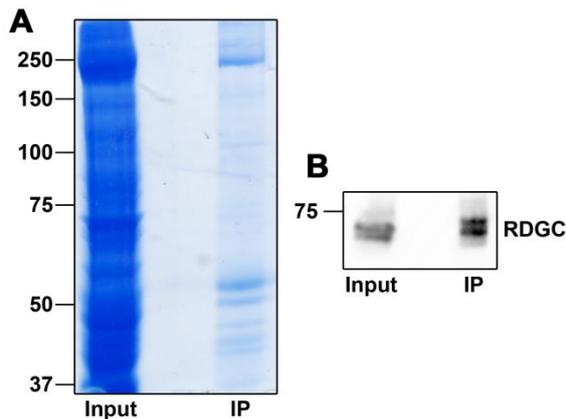


Abbildung 3.6 IP mit α -Myc-Antikörper aus *rdgC-Myc/TM3*-Fliegen. A) Coomassie gefärbtes Gel der IP. Der Input wurde ebenfalls aufgetragen. In der Inputspur wurden ca. 7,5 und in der IP-Fraktion ca. 200 Kopfäquivalente aufgetragen. B) Der zum Coomassie-Gel gehörige Westernblot wurde mit einem α -RDGC-Antikörper inkubiert. In der Inputspur wurden 4 und in der IP-Fraktion ca. 80 Kopfäquivalente aufgetragen. Position und Größe (in kDa) des molekularen Größenmarkers sind jeweils links gezeigt.

Abbildung 3.6 A zeigt ein exemplarisches Coomassie-Gel, auf dem auf der zu erwarteten Höhe von 75 kDa keine Bande identifiziert werden konnte. Da der zugehörige Westernblot allerdings auf der entsprechenden Höhe von 75 kDa ein deutliches Signal zeigte, wurde für den Nachweis von RDGC-M auf Proteinebene auf Verdacht die entsprechende Bande aus einem Coomassie-Gel ausgeschnitten und entsprechend 2.22 massenspektrometrisch weiter analysiert. Die für die massenspektrometrische Analyse verwendete Proteinbande stammte aus einem anderen als dem in Abbildung 3.6 gezeigten Gel.

Um RDGC-M eindeutig nachweisen zu können, musste in der Sequenz von RDGC-M nach einem Trypsin-Verdau ein Peptid identifiziert werden, welches in den beiden anderen RDGC-Isoformen nicht vorkommt. Dazu wurde zunächst ein hypothetischer Verdau auf Ebene der Aminosäuresequenz durchgeführt. Da Trypsin C-terminal von Arginin (R) und/oder Lysin (K) spaltet, ergab sich im N-Terminus der Sequenz von RDGC-M das Peptid GPPTPPDLETTIR, welches weder in RDGC-S noch in RDGC-L vorkommt.

Ergebnisse

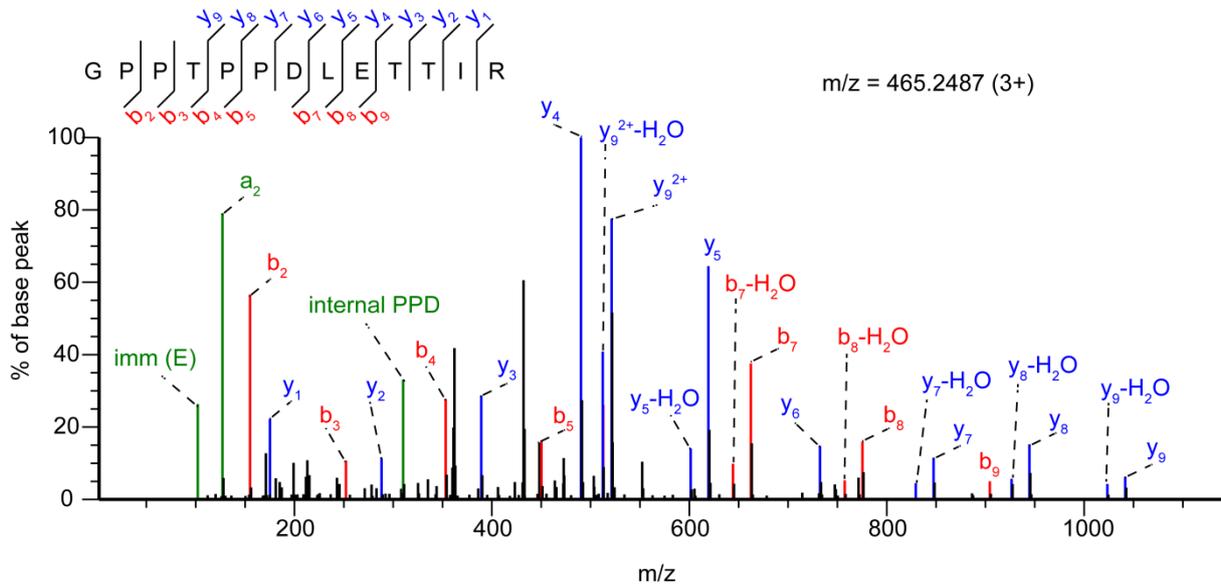


Abbildung 3.7 Fragmentierungsspektrum des präzipitierten und tryptisch verdauten RDGC-Myc. Das Fragmentierungsspektrum des Peptids GPPTPPDLETTIR zeigt eine durchgehende Y-Serie von Y₁-Y₉ sowie eine fast durchgängige b-Serie mit b₂-b₅ und b₇-b₉. Damit war eine hohe Abdeckung mit den vorausgesagten Fragmenten gewährleistet. Das Peptid wurde gegen eine modifizierte *Drosophila melanogaster* Datenbank, in der das bestehende RDGC-Protein entfernt und mit der vorhergesagten Sequenz für RDGC-M ersetzt wurde, abgeglichen.

Wie Abbildung 3.7 zeigt, wurde in der ausgeschnittenen Bande das gesuchte Peptid nach der Analyse im Massenspektrometer gefunden. Das dargestellte Fragmentierungsspektrum zeigt die Abdeckung des Peptids über die y- und die b-Serie. Auf Grund der hohen Sequenzabdeckung konnte das gefundene Peptid in einer modifizierten Datenbank (Uniprot *Drosophila melanogaster* proteome database UP000000803, version GCA_000001215.4) als das gesuchte Peptid identifiziert werden. In dieser Datenbank wurde das bestehende RDGC-Protein durch das vorhergesagte RDGC-M-Protein ersetzt. Auf diese Weise wurde die Existenz des Proteins RDGC-M nachgewiesen.

3.1.3 Generierung von Mutanten mit unterschiedlichen RDGC-Isoformen mittels CRISPR/Cas9

In Fliegen, die die Genshere Cas9 exprimieren (Bloomington Stock Center, #51323) wurde ein Vektor mit der Zielsequenz gegen das erste Exon von *rdgC-RB* injiziert und auf diese Art ein Doppelstrangbruch induziert. Dafür wurde die Zielsequenz für den Doppelstrangbruch mit Hilfe flankierender Oligonukleotide (*rdgC-myc_F* und *rdgC-myc_R*) in den pCFD3-dU6:3gRNA-Vektor kloniert. So sollten *rdgC-S* und/oder *rdgC-M* zerstört werden, *rdgC-L* sollte hingegen nicht betroffen sein. Es wurden initial 1134 Embryonen injiziert, die Statistik der Injektion kann

Tabelle 3.2 entnommen werden.

Ergebnisse

Tabelle 3.2 Statistik der Injektion

Schritt	Ergebnis
injizierte Fliegenembryos	1134
Larven	34
geschlüpfte Fliegen	26
lebensfähige Linien	14
Linien mit Veränderungen in der RDGC-Zusammensetzung	4

Da für ein erfolgreiches Screening kein Allel mit dem nativen *rdgC*-Gen vorhanden sein durfte, konnten die Fliegen erst nach dem dritten Kreuzungsschritt auf ein abweichendes Muster der RDGC-Banden untersucht werden. Das Screening erfolgte mit Hilfe eines Ein-Kopf-Westernblots und anschließender Detektion mit dem α -RDGC-Antikörper. Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch einen solchen Screening-Blot.

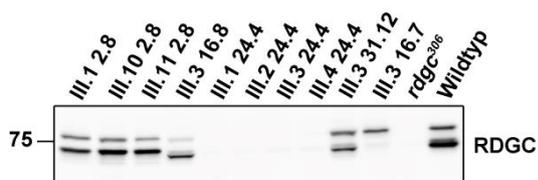


Abbildung 3.8 Ein-Kopf-Westernblot Screening nach mutierten Fliegen mit verändertem Expressionsmuster. Es wurden Extrakte aus einzelnen Köpfen verschiedener *Drosophila* Linien nach CRISPR/Cas9-Mutagenese sowie zur Kontrolle Extrakte aus Wildtyp- und *rdgC*³⁰⁶-Köpfen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit dem α -RDGC-Antikörper. Position und Größe (in kDa) des molekularen Größenstandards sind links gezeigt.

Bei dieser Kreuzung wurden die injizierten Fliegen zunächst gegen *rdgC*³⁰⁶-Fliegen gekreuzt um ein möglicherweise vorhandenes natives *rdgC*-Allel sowie die Cas9-Schere zu entfernen. Im Anschluss wurde über unterschiedliche Balancer-Fliegen das mutierte *rdgC*-Allel homozygot gekreuzt. Das genaue Kreuzungsschema kann 2.14.3 entnommen werden.

Die aus den Linien III.1 2.8, III.10 2.8 und III.11 2.8 resultierenden Fliegen zeigten eine Bande auf der Höhe von RDGC-L und eine auf Höhe von RDGC-M, während die zu RDGC-S gehörende Bande fehlte. Aus diesem Grund wird diese Mutante im Folgenden als *rdgC*^{AS} bezeichnet. Diese Fliege zeigte neben dem Mangel an RDGC-S einen auffällig hohen Gehalt an RDGC-M. In Linie III.3 16.7 fehlte die RDGC-S Bande ebenfalls und die RDGC-M Bande war stark reduziert. Daher wird diese Mutante im Folgenden als *rdgC*^{ASM} bezeichnet. Die Linien III.1 24.4 bis III.4 24.4 zeigten kein RDGC-Signal mehr. Da mit der *rdgC*³⁰⁶-Mutante bereits eine RDGC-Nullmutante existierte, wurde diese Mutante nicht weiter untersucht, weswegen der Grund für die vollständige Abstinenz von RDGC in den gezeigten Linien nicht weiter untersucht wurde. Wahrscheinlich wurde zusätzlich zu dem gezielten Doppelstrangbruch ein

Ergebnisse

unspezifischer Bruch im *rdgC-L*-Lokus eingeführt und damit eine Expression von RDGC-L verhindert.

Ergebnisse

Außerdem wurde eine bereits existierende Fliege verwendet, in der mit Hilfe des MiMIC-Systems eine so genannte „integration cassette“ in das erste Intron des *rdgC*-Lokus eingeführt wurde (Venken et al. 2011). Die Kasette besteht aus der Spleißakzeptor-Stelle gefolgt von drei Stop-Codons in allen drei Leserastern. Auf diese Art wird in allen drei, für die lange Isoform codierenden Transkripte, ein vorzeitiges Stop-Codon eingeführt und RDGC-L daher nicht transkribiert (s. Abbildung 3.9). Diese Fliege (*Mi{MIC}rdgC^[Mi06989]*) wird im Folgenden als *rdgC^{AL}* bezeichnet.

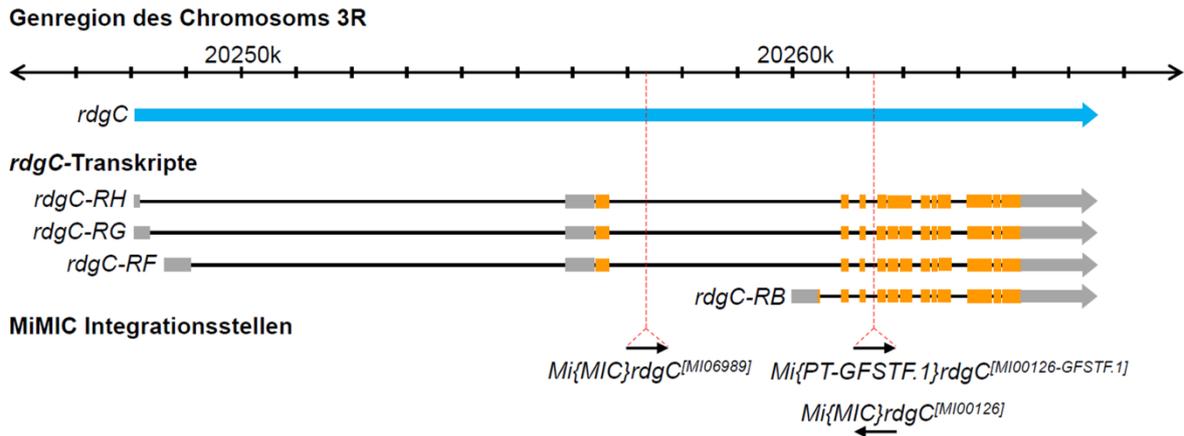


Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der MiMIC Integrationsstellen. In der *Mi{MIC}rdgC^[Mi06989]*-Fliege sorgt das Einführen der MiMIC-Kasette dafür, dass in den drei Transkripten *rdgC-RH*, *RG* und *-RF* ein Stop-Codon eingeführt wird. Dadurch wird die lange Isoform RDGC-L nicht exprimiert. Diese Fliege wird im Folgenden als *rdgC^{AL}* bezeichnet.

Die Quantifizierung des Signals des α -RDGC-Antikörpers ergab einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen der Menge an RDGC-Protein und der Stärke des Antikörpersignals. Darum wurde im Folgenden der α -RDGC-Antikörper zur quantitativen Bestimmung des RDGC-Gehalts in unterschiedlichen Fliegen verwendet.

Abbildung 3.10 zeigt einen Westernblot aller in dieser Arbeit verwendeten Mutanten mit einem abgewandelten RDGC-Expressionsmuster sowie eine Quantifizierung der vorhandenen RDGC-Mengen in diesen Fliegen. RDGC-S und -M konnten nur gemeinsam quantifiziert werden, wohingegen RDGC-L extra quantifiziert wurde.

Ergebnisse

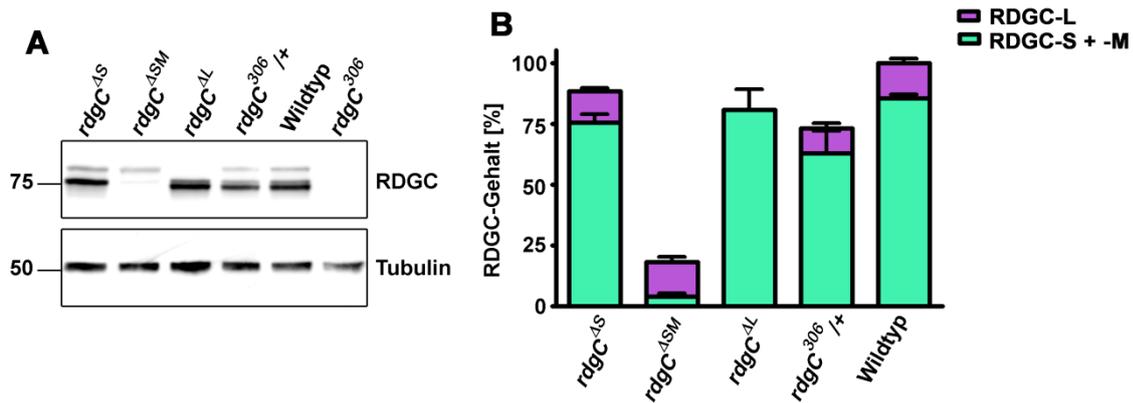


Abbildung 3.10 RDGC-Gehalt in verschiedenen Mutanten. Es wurden pro Spur 3 Kopfüquivalente von unterschiedlichen Mutanten aufgetragen. A) zeigt einen exemplarischen Westernblot auf dem neben dem Nachweis mit dem α -RDGC-Antikörper Tubulin als Ladekontrolle mit dem α -Tubulin-Antikörper nachgewiesen wurde. Position und Größe (in kDa) des molekularen Größenmarkers sind links dargestellt. B) zeigt die Quantifizierung normiert auf das Tubulin-Signal. RDGC-L (lila) wurde getrennt von RDGC-S und -M (grün) quantifiziert und dargestellt. Der Standardfehler wurde mit n=6-9 Wiederholungen ermittelt.

Um die unterschiedlichen RDGC-Expressionsmuster der Mutanten zu erklären, wurde das *rdgC*-Gen der Mutanten sequenziert. Eine Sequenzierung der genomischen DNA von *rdgC^{ΔSM}* zeigte, dass der Grund für das veränderte Bandenmuster eine fünf Basenpaar große Deletion war, die zu einem Frameshift führte (s. Abbildung 3.11).

Ergebnisse

Genregion des Chromosoms 3R

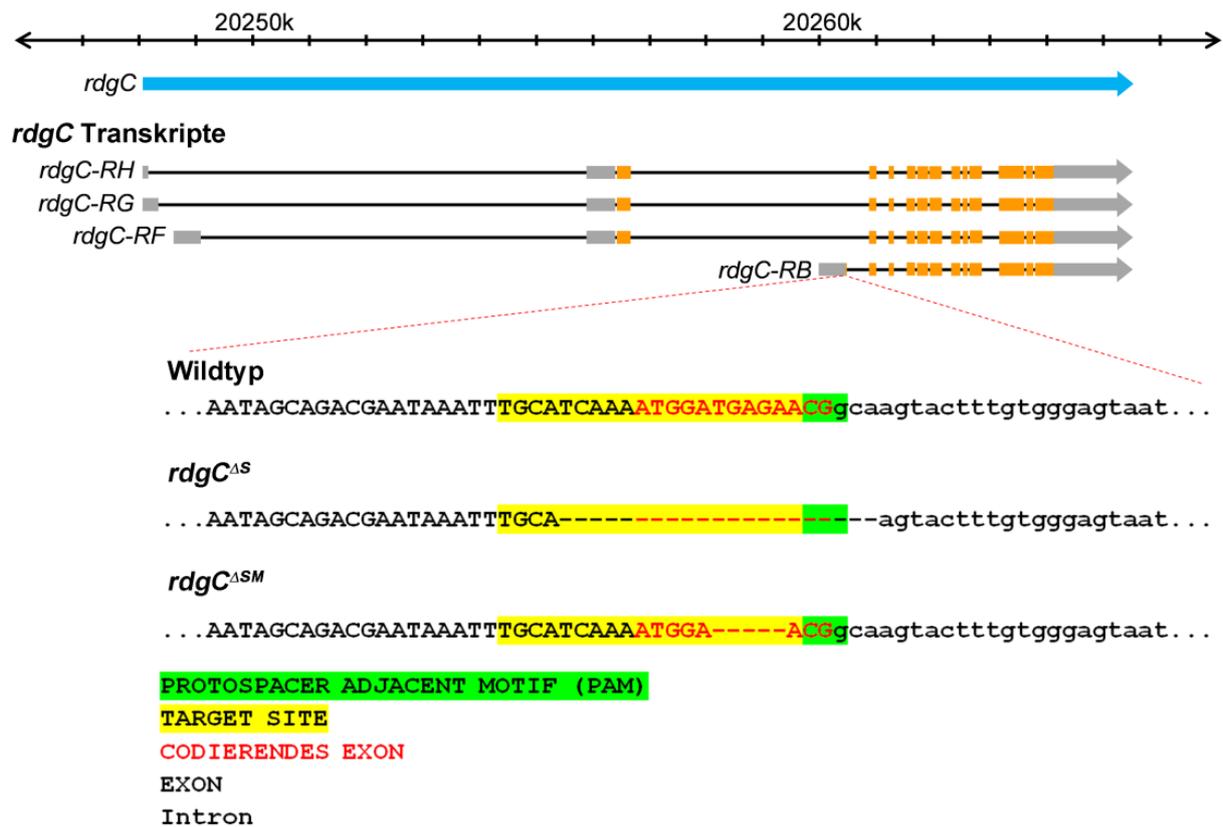


Abbildung 3.11 Sequenzierung von genomischer DNA aus *rdgC*^{ΔS}- und *rdgC*^{ΔSM}-Fliegen. Es wurde ein Primer in der 5'-UTR von *rdgC-S* zur Sequenzierung verwendet. Das PAM, welches für die Manipulation mit CRISPR benötigt wird, wurde grün hinterlegt. Die „Target site“ der injizierten gRNA wurde gelb hinterlegt. Großbuchstaben implizieren eine Exon-Region während Kleinbuchstaben eine Intron-Region beschreiben. Rote Buchstaben bedeuten, dass es sich um ein codierendes Exon handelt.

So kann weiterhin mRNA für RDGC-S hergestellt werden, bei der Proteinsynthese kommt es dann allerdings zu einem Abbruch der Translation. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde wie oben bereits gezeigt eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde mit cDNA aus *rdgC*^{ΔSM}-Fliegen eine PCR zur Amplifikation des *rdgC-RB*-Transkripts durchgeführt. Es wurde ein Forward-Primer in der 5'-UTR von *rdgC-RB* und ein Reverse-Primer im 3'-Ende (*RdgC_far5'_F* und *rdgC_R*) verwendet und damit sowohl vorhandenes *rdgC-M* als auch *rdgC-S* amplifiziert. Diese Produkte wurden in den TOPO-TA-Vektor ligiert. Es folgte eine Transformation in *E. coli* XL1 blue Zellen mit Selektion auf LB-Amplicillin Platten. Aus einzelnen Kolonien wurde die DNA extrahiert und eine Kolonie-PCR mit den bereits verwendeten Primern durchgeführt (Abbildung 3.12). In diesem Experiment zeigte sich ein einziger Klon (55), bei dem eine kleinere Bande als in allen anderen Klonen zu finden war. Dieser Klon wurde sequenziert und als *rdgC-M*-Klon identifiziert. Die Menge an mRNA von RDGC-M war in deutlich geringerer Menge zu finden, als dies in wildtypischen Fliegen der Fall war. Im Gegensatz zu wildtypischen Fliegen, in denen das Verhältnis der mRNAs *rdgC-S:rdgC-M* bei der Kolonie-PCR 11:1 betrug, lag in *rdgC*^{ΔSM}-Fliegen ein Verhältnis von 71:1 vor. Auf Grund dieser deutlich geringeren Menge an *rdgC-M* mRNA war die Expression von RDGC-M in *rdgC*^{ΔSM}-Fliegen so stark reduziert.

Ergebnisse

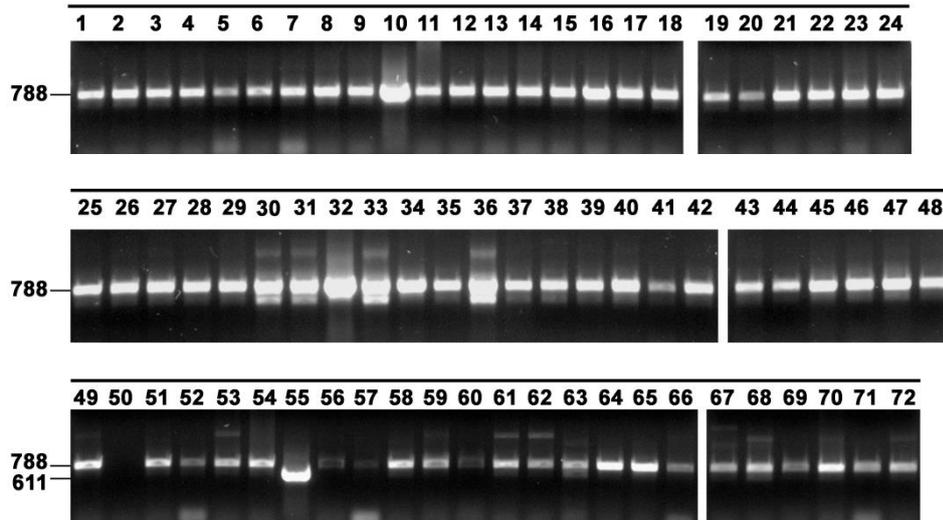


Abbildung 3.12 Kolonie-PCR aus Klonen mit ursprünglicher cDNA aus *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen. Es wurde die DNA von 72 Klonen auf die Expression von *rdgC-M* mRNA untersucht. Während die meisten Fliegen eine dem *rdgC-S* entsprechende Bande bei 788 Bp aufweisen zeigt Klon 55 eine Bande bei der für *rdgC-M* erwarteten Höhe von 611 Bp.

RdgC^{ΔS} zeigte eine wildtypische Menge an RDGC-L, nicht aber an RDGC-M. Während in Wildtypen RDGC-S und -M ca. 85 % des Gesamtgehalts an RDGC ausmachen, war diese Menge in *rdgC^{ΔS}*-Fliegen auf ca. 75 % reduziert. Im Vergleich zu Wildtyp Fliegen, bei denen RDGC-S stärker als RDGC-M exprimiert wird, war in der *rdgC^{ΔS}*-Mutante in Abwesenheit von RDGC-S der Gehalt an RDGC-M deutlich erhöht.

Die Sequenzierung dieser Fliege ergab, dass es zu einer 21 Basenpaar langen Deletion im ersten Exon von *rdgC-RB* kam, die sowohl das Start-Codon von *rdgC-S* als auch die Spleiß-Donorstelle des ersten Exons betraf (s. Abbildung 3.11). Dadurch konnte in dieser Fliege keine *rdgC-S* mRNA transkribiert werden, was wahrscheinlich der Grund war, dass RDGC-M so verstärkt exprimiert wurde. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde auch aus diesen Fliegen die cDNA isoliert, *rdgC-RB* amplifiziert (Primer RdgC_far5'_F und RdgC_R) und in den TOPO-TA Vektor ligiert. Nach der Transformation in *E. coli XL1 blue* Zellen wurde aus halben Kolonien die DNA isoliert. Diese wurde als Templat für eine Kolonie-PCR wie für die entsprechenden Klone mit cDNA aus *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen verwendet (s. Abbildung 3.13).

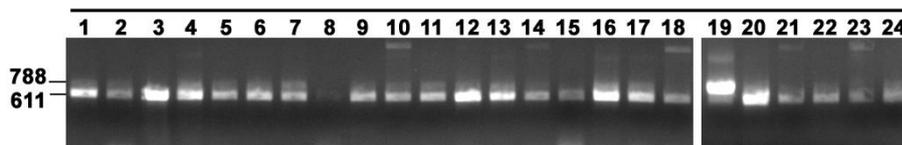


Abbildung 3.13 Kolonie PCR aus Klonen mit ursprünglicher cDNA aus *rdgC^{ΔS}*-Fliegen. Es wurde die DNA von 24 Klonen auf die Expression von *rdgC-S* mRNA untersucht. Alle Fliegen zeigten eine Bande bei 611 bp, nur in Klon 19 zeigte sich eine Bande >611 bp.

Ergebnisse

Abbildung 3.13 zeigt in 23 der untersuchten 24 Klone eine Bande auf der Höhe von 611 Bp, was der erwarteten Größe des *rdgC-M* Transkripts entspricht.

Es konnte ein Klon (19) identifiziert werden, bei dem das entstandene PCR-Produkt in der Größe dem für *rdgC-S* erwarteten Produkt entspricht. Da die Deletion eine *rdgC-S* mRNA ausschließen müsste, wurde der Klon 19 sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei diesem Klon nicht um RDGC-S handelte. Damit wurde die Hypothese, dass die fehlende Spleiß-Donorstelle von RDGC-S dazu führte, dass nur noch *rdgC-M* mRNA hergestellt werden konnte, bestätigt.

Um für spätere Versuche einen Zusammenhang zwischen der Menge an exprimiertem RDGC und einem entstandenen Phänotyp herstellen zu können, wurde eine Fliege gekreuzt, die heterozygot für wildtypisches RDGC war. Dazu wurden wildtypische Weibchen mit *rdgC³⁰⁶* Männchen verkreuzt. Da diese Kreuzung nicht stabil war, wurden immer nur Fliegen aus der ersten Generation verwendet. Obwohl nur noch ein *rdgC*-Allel vorlag, konnten noch immer ca. 75 % an Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3.10).

Eine Fliege, in der nur RDGC-S aber kein RDGC-M exprimiert wird, konnte mit dem CRISPR-Cas9-System nicht hergestellt werden. Es existiert von einer anderen Arbeitsgruppe (Schillo, 2007) eine Fliege, in der nur RDGC-S, allerdings überexprimiert unter dem *rh1*-Promotor im *rdgC³⁰⁶*-mutanten Hintergrund, exprimiert wurde. Diese Fliege wurde gesondert von den anderen Mutanten untersucht, da in ihr als einzige Mutante RDGC nicht unter dem nativen Promotor exprimiert wurde. Der *rh1*-Promotor führt zu einer Überexpression von RDGC-S. Um dies zu zeigen, wurden unterschiedliche Anteile an Extrakten aus *rh1-rdgC-S*-Fliegen mit Extrakten aus *rdgC³⁰⁶*-Mutanten gemischt, per SDS-PAGE und Westernblot dargestellt und mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen (s. Abbildung 3.14).

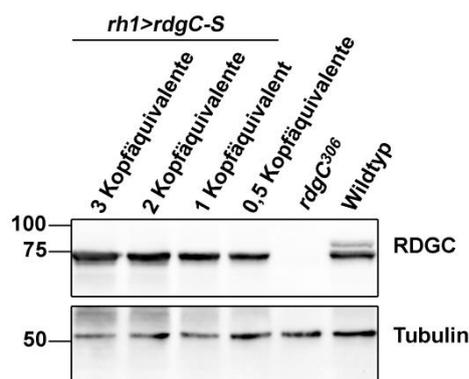


Abbildung 3.14 Vergleich verschiedener Mengen an *rh1>rdgC-S*-Fliegen mit Wildtyp-Fliegen. Es wurden unterschiedliche Anteile an Extrakten aus *rh1>rdgC-S*-Köpfen mit Extrakten aus *rdgC³⁰⁶*-Mutanten gemischt, so dass in jeder Spur insgesamt 3 Kopfüquivalente aufgetragen wurden. Der Nachweis von RDGC erfolgte mit Hilfe des α -RDGC-Antikörpers, der Nachweis von Tubulin mit dem entsprechenden Antikörper diente als Ladekontrolle. Die Menge von 0,5 Kopfüquivalenten *rh1>rdgC-S*-Fliegen entspricht in etwa dem Gehalt an RDGC-S in drei Kopfüquivalenten wildtypischer Fliegen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind links dargestellt.

Es zeigte sich, dass der Gehalt an RDGC-S aus 0,5 Kopfüquivalenten von *rh1>rdgC-S*-Fliegen in etwa dem Gehalt von RDGC-S aus drei Kopfüquivalenten wildtypischer Fliegen entspricht.

3.2 Posttranslationale Modifikationen und subzelluläre Fraktionierung der RDGC Isoformen

3.2.1 Gewebespezifische Lokalisation von RDGC

Es war bereits aus der Literatur bekannt, dass sich RDGC sowohl in der Retina der Komplexaugen als auch in den Ozellen sowie in den Pilzkörpern im Gehirn von *Drosophila melanogaster* nachweisen lässt (Steele und O'Tousa 1990). Um diesen Befund für alle drei Isoformen zu bestätigen, wurde unterschiedliches Gewebe in unterschiedlichen Mutanten untersucht. Für den Nachweis in den Augen wurden von wildtypischen Köpfen mit Hilfe eines Skalpell die Komplexaugen abgetrennt und homogenisiert. Für den Nachweis im Gewebe ohne Augen wurden ebenfalls die Komplexaugen abgetrennt und das verbliebene Kopfgewebe homogenisiert. Da so die Ozellen nicht berücksichtigt werden, wurden zusätzlich zu den Nullmutanten *rdgC³⁰⁶* und Wildtypen außerdem *sine oculis¹*-Köpfe untersucht. In dieser Mutante werden weder Komplexaugen noch Ozellen ausgebildet. Im Unterschied zu den *sine oculis¹*-Mutanten besitzen die ebenfalls untersuchten *eya²*-Fliegen bei fehlenden Komplexaugen immer noch die Ozellen. Alle diese Gewebevarianten wurden nach dem Homogenisieren per SDS-PAGE und Westernblot analysiert und das Vorkommen von RDGC anschließend mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für membrangebundene Komplexaugen-spezifische Proteine wurde ein α -Rhodopsin1-Antikörper, für lösliche nicht-gewebespezifische Proteine ein α -Tubulin-Antikörper und für membranassoziierte Proteine ein α -INAD-Antikörper verwendet.

In Köpfen sowie isolierten Augen wildtypischer Fliegen wurden die drei Varianten RDGC-S, RDGC-M und RDGC-L gefunden. In *sine oculis¹*- und *eya²*-Fliegen war deutlich die Bande zu finden, die RDGC-L entspricht. Auf der Höhe der beiden kleineren Isoformen RDGC-S und -M war eine sehr schwache Bande sichtbar, die so jedoch auch in *rdgC*-Nullmutanten zu finden war (s. Abbildung 3.15). Diese Bande war vermutlich unspezifischer Hintergrund. RDGC-M und RDGC-S scheinen augenspezifisch zu sein. Da es zwischen den *sine oculis¹*- und den *eya²*-Köpfen nicht zu einem großen Unterschied in der RDGC-Expression kam, spielt der RDGC-Gehalt in den Ozellen keine größere Rolle.

Ergebnisse

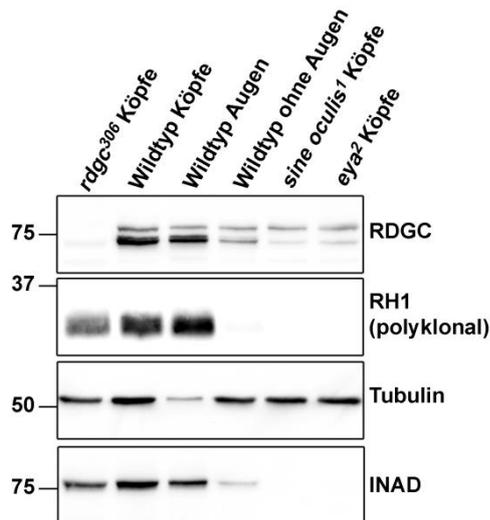


Abbildung 3.15 Gewebespezifische Lokalisation der RDGC-Isoformen. Es wurden jeweils drei Kopfüquivalente oder entsprechend sechs Augenäquivalente pro Spur aufgetragen. RDGC wurde mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen. Rhodopsin (RH1) und INAD wurden als augenspezifische Kontrollen und Tubulin als allgemeine Ladekontrolle nachgewiesen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind links gezeigt.

Die Extrakte aus Köpfen ohne Augen zeigten neben RDGC-L auch eine Bande auf der Höhe der kleineren Isoformen. Bei genauer Betrachtung kann in diesen Fliegen eine sehr schwache Bande mit dem RH1-Antikörper sowie eine INAD-Bande nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass in den Extrakten noch Reste der Komplexaugen verarbeitet wurden.

Die Kontrolle mit Rhodopsin zeigte, dass weder in den Köpfen von *sine oculis¹* noch in *eya²*-Extrakten RH1 nachweisbar war. Obwohl in den Restköpfen sowie den *eya²*-Fliegen immer noch Ozellen vorhanden waren, konnte mit dem α -RH1-Antikörper kein Signal nachgewiesen werden. Grund dafür ist, dass in Ozellen kein RH1 sondern RH2 exprimiert wird.

INAD konnte wie Rhodopsin nur in Gewebe ohne Augen nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der Kontrolle mit Rhodopsin zeigte sich in Restköpfen von wildtypischen Fliegen eine schwache Bande. Grund dafür war, dass beim Abschneiden der Augen diese vermutlich nicht komplett abgetrennt werden konnten. Aus diesem Grund wurden auch die *eya²*-Fliegen mitgeführt.

Tubulin wurde in jedem der getesteten Gewebe nachgewiesen. Das schwache Tubulinsignal in den isolierten Augen kam daher, dass dort insgesamt deutlich weniger Gewebe zum Homogenisieren verwendet wurde.

3.2.2 Immuncytochemische Untersuchung von RDGC in *Drosophila* Augen

Um weitere Einblicke in die Lokalisation RDGC zu erhalten, wurden zunächst Cryoschnitte der Augen von wildtypischen Fliegen oder *rdgc³⁰⁶*-Fliegen angefertigt und anschließend immuncytochemisch untersucht. Dazu wurden die Schnitte zunächst fixiert, permeabilisiert und dann mit dem α -RDGC-Antikörper inkubiert. Um mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager Z1m, Carl Zeiss) die Antikörperlokalisierung nachweisen zu können, wurde ein

Ergebnisse

AlexaFluor-488 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Zusätzlich dazu wurden die Zellkerne mit DAPI und das F-Aktin in den Rhabdomeren mit Phalloidin angefärbt. Das autofluoreszierende DAPI sowie das an ein Fluorophor gekoppelte Phalloidin können beide im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. *RdgC³⁰⁶*-Fliegen dienen zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers.

Bei vergleichbarer Belichtungsdauer wurde in Wildtyp-Fliegen und in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten ein ähnliches Signal detektiert. Der α -RDGC-Antikörper konnte daher für immuncytochemische Untersuchungen nicht verwendet werden.

Da die immuncytochemische Untersuchung mit dem α -RDGC-Antikörper nicht erfolgreich war, wurden *rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliegen verwendet, die unter anderem einen GFP-Tag im *rdgC*-Gen tragen und daher eine Autofluoreszenz zeigen.

Die Kassetten mit den enthaltenen Tags (eGFP-FIAsH-StrepII-TEV-3xFlag) wurde mit Hilfe des MiMIC-Systems zwischen dem dritten und dem vierten Exon integriert (s. Abbildung 3.16). Damit lagen die Tags zwischen dem IQ-Motiv und der katalytischen Domäne, weswegen es die Funktionalität des getaggenen RDGC nicht beeinträchtigen sollte. Außerdem wurde mit dieser Stelle die Kassetten für alle vier *rdgC*-Transkripte integriert.

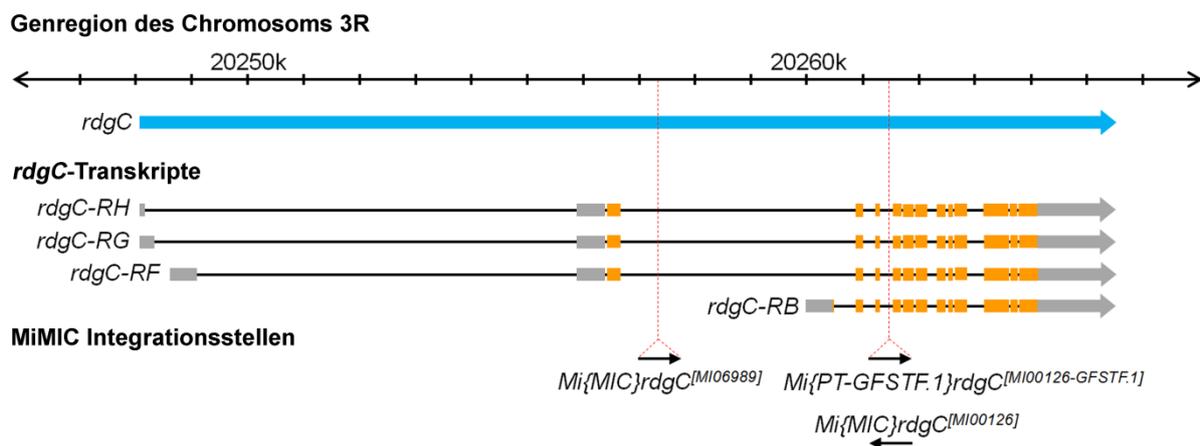


Abbildung 3.16 Schematische Darstellung der MiMIC-Integrationsstellen. Die roten Linien zeigen die Stellen an, an denen das *rdgC*-Gen mit Hilfe des MiMIC-Systems manipuliert wurde. In der *Mi{PT-GFSTF.1}rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliege wurde zwischen dem dritten und dem vierten Exon die MiMIC-Kassette integriert und so in alle RDGC-Isoformen die Tags (eGFP, FIAsH, STrepIII, TEV und 3xFlag) eingeführt.

Für die Immuncytochemie wurden homozygote Fliegen verwendet und lediglich mit einem Fluoreszenz-markierten Phalloidin das Rhabdomer-spezifische F-Aktin sowie mit DAPI die Zellkerne markiert. Für den Nachweis von RDGC genügte die Autofluoreszenz des eGFP-Tags im Gen. Um mögliche lichtabhängige Unterschiede in der Lokalisation von RDGC abzuklären, wurden eine Stunde dunkel gehaltene bzw. eine Stunde weiß belichtete Fliegen untersucht. Für dieses Experiment wurden wildtypische Fliegen als Negativkontrolle mitgeführt.

Ergebnisse

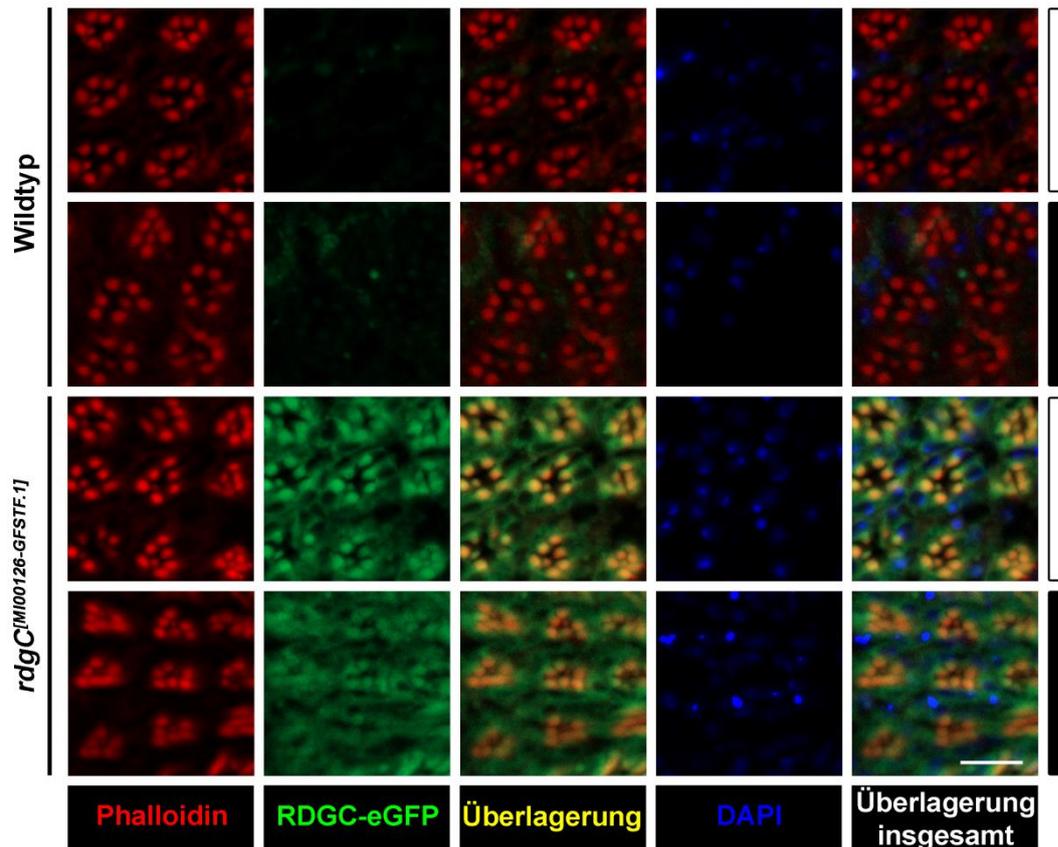


Abbildung 3.17 Subzelluläre Lokalisation von RDGC im Dunkeln und nach 1 h Belichtung. Die Rhabdomerstruktur wurde mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. RDGC wurde über die Autofluoreszenz des eGFP-Tags nachgewiesen. Es wurden sowohl getaggte Fliegen als auch Wildtypen untersucht. Um eine lichtabhängige Translokation von RDGC zu überprüfen, wurden dunkel gehaltene (schwarzer Balken) und 1 h belichtete (weißer Balken) Fliegen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Wie Abbildung 3.17 zeigt, konnte in den *rdgC^{M100126-GFSTF.1}*-Fliegen ein eindeutiges eGFP-Signal ausgemacht werden, das in wildtypischen Fliegen nicht zu finden war. Da alle Aufnahmen mit derselben Belichtungsdauer ausgeführt wurden, handelt es sich bei dem eGFP-Signal in den getagkten Fliegen um RDGC-spezifische Signale. Dieses Signal war vermehrt in den Rhabdomeren zu finden, was an der Überlagerung aus dem eGFP- und dem Phalloidin-Signal zu sehen war. Diese Überlagerung zeigte sich in der dritten Spalte in Abbildung 3.17 als gelbes Signal. Darüber hinaus konnte auch außerhalb der Rhabdomere ein eGFP-Signal detektiert werden. Da bei den verwendeten Fliegen alle drei RDGC-Isoformen getaggt vorliegen, konnte das Signal in der Immunocytochemie nicht einer Isoform zugeordnet werden.

Die Lichtbedingung hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von RDGC in den Sehzellen. Sowohl in belichteten als auch in dunkel gehaltenen Fliegen war der Hauptanteil von RDGC in den Rhabdomeren lokalisiert. Eine lichtabhängige Translokation war in dieser Zeitspanne nicht nachzuweisen. Da eine Translokation möglicherweise nicht innerhalb einer einstündigen Licht- bzw. Dunkeladaption vonstatten geht, sondern mehr Zeit benötigt, wurden zusätzlich 16 h belichtete bzw. dunkel gehaltene Fliegen untersucht. Die Untersuchung zeigte in Abbildung 3.18 vergleichbare Ergebnisse wie nach einer einstündigen

Ergebnisse

Adaption an die Lichtverhältnisse. Dies deutete darauf hin, dass es auch nicht zu einer langsamen Translokalisierung von RDGC in den Sehzellen kommt.

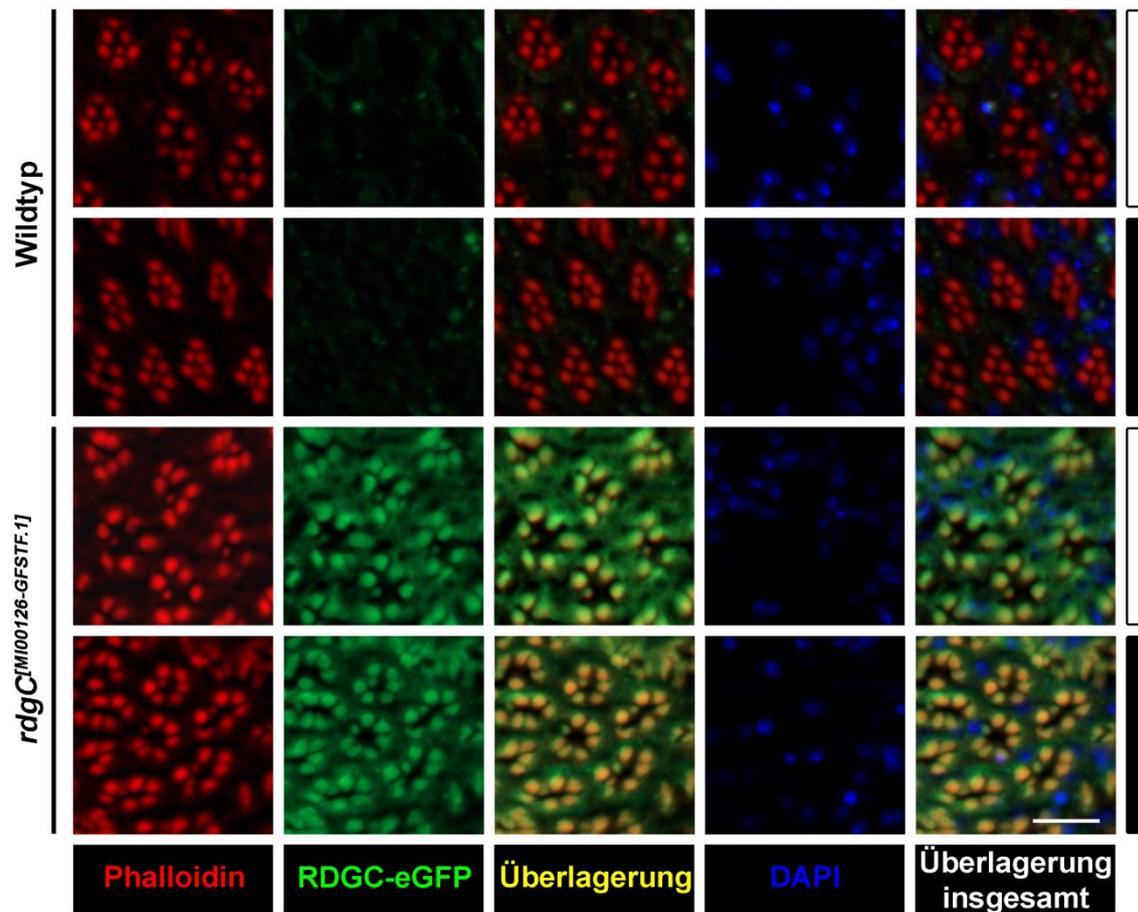


Abbildung 3.18 Subzelluläre Lokalisation von RDGC nach 16 h Belichtung. Die Rhabdomerstruktur wurde mit Fluoreszenzmarkiertem Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. RDGC wurde über die Autofluoreszenz des eGFP-Tags nachgewiesen. Es wurden sowohl getaggte Fliegen als auch Wildtypen untersucht. Um eine lichtabhängige Translokalisierung von RDGC zu überprüfen, wurden dunkel gehaltene (schwarzer Balken) und 16 h belichtete (weißer Balken) Fliegen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

3.2.3 Subzelluläre Fraktionierung von RDGC in Fliegen

Da die immunocytochemische Analyse von RDGC in den Sehzellen keine eindeutige Zuordnung zu den Rhabdomeren oder dem Cytosol ergab, wurde eine subzelluläre Fraktionierung der unterschiedlichen Isoformen durchgeführt. So sollte ein Unterschied in der Zuordnung zu löslichen oder membrangebundenen Proteinen gezeigt werden.

Dabei wurden zunächst lösliche und membrangebundene Proteine voneinander getrennt. Während lösliche Proteine im Überstand (ÜS) zu finden sind, befinden sich membrangebundene Proteine in der Pelletfraktion. Da sich in Wildtypen RDGC-S und -M auf

Ergebnisse

Grund ihrer elektrischen Mobilität nicht getrennt voneinander quantifizieren lassen, wurden zusätzlich zu den Wildtyp-Fliegen *rdgC^{ΔS}*-Mutanten untersucht (s. Abbildung 3.19).

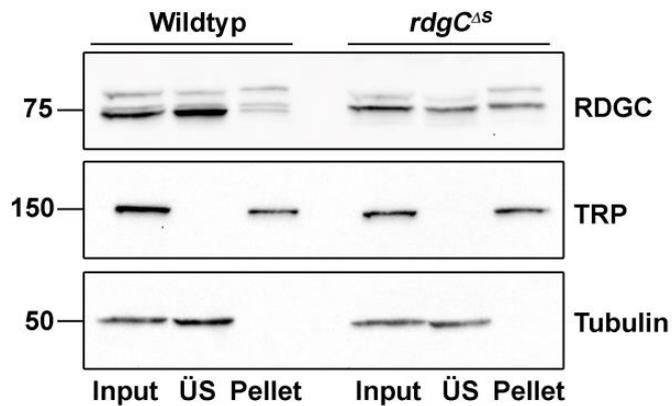


Abbildung 3.19 Subzelluläre Fraktionierung von RDGC aus Wildtypen und *rdgC^{ΔS}*-Fliegen. Fraktionierung von Extrakten aus Wildtypen und *rdgC^{ΔS}*-Fliegen in Membranproteine und lösliche Proteine. RDGC-S findet sich hauptsächlich in der löslichen Fraktion, wohingegen die beiden Isoformen RDGC-M und -L in beiden Fraktionen zu finden sind. TRP dient als Kontrolle für Membranproteine, Tubulin für die lösliche Fraktion. Es wurden je 7,5 Kopfüquivalente aufgetragen.

In der ersten Spur wurde zunächst der Input vor der Fraktionierung aufgetragen. Alle drei Proteinvarianten waren gut voneinander abgrenzbar. Nach der Fraktionierung konnten die drei unterschiedlichen Isoformen nicht eindeutig einer Fraktion zugeordnet werden. Allerdings war RDGC-S hauptsächlich in der löslichen Fraktion zu finden, während RDGC-M und RDGC-L verstärkt in der Membranfraktion vertreten waren. Bei RDGC-L war das Verhältnis von löslichem zu membrangebundenem Anteil ca. 43:57 während für die kleineren Proteine ein Verhältnis von ca. 87:13 gefunden wurde (s. Abbildung 3.20).

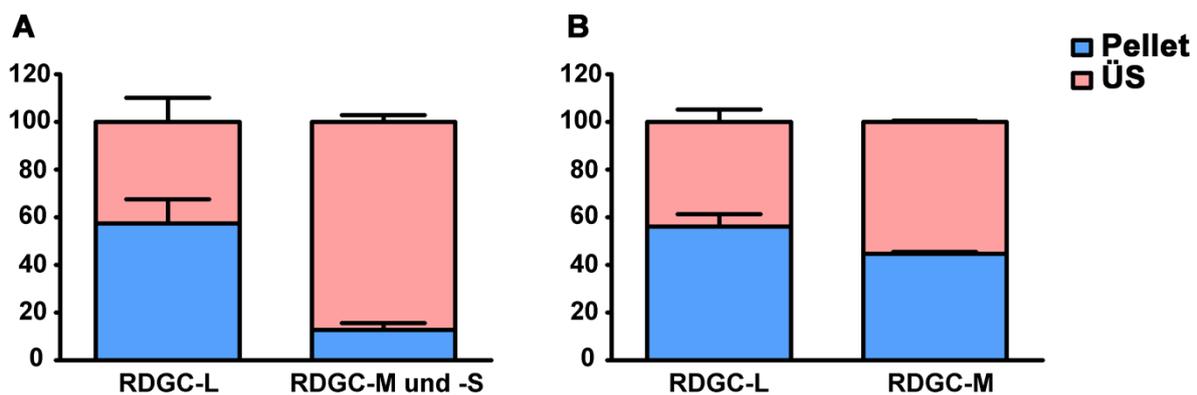


Abbildung 3.20 Quantifizierung der subzellulären Fraktionierung der unterschiedlichen RDGC Isoformen. Quantifizierung von RDGC in den unterschiedlichen Fraktionen aus A) wildtypischen Fliegen und B) *rdgC^{ΔS}*-Fliegen. Es wurde der Anteil von RDGC-L und RDGC-S mit -M prozentual vom Gesamtgehalt angegeben. In blau wurden die membranzugehörigen Anteile und in rot die löslichen Proteinanteile dargestellt. Die Quantifizierung wurde mit $n=3$ durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Da RDGC-S und -M nicht getrennt voneinander quantifiziert werden konnten, wurde die Verteilung nur für RDGC-L im Vergleich zu RDGC-S/-M untersucht. Um genauer zu studieren,

Ergebnisse

wie sich die Lokalisation von RDGC-M verhält, wurden die in dieser Arbeit generierten Fliegen *rdgC^{ΔS}* für eine subzelluläre Fraktionierung verwendet. Auch hier wurden sowohl Input als auch lösliche und membrangebundene Fraktion aufgetragen. In diesen Fliegen wurde sowohl für RDGC-L als auch für RDGC-M eine ungefähre Gleichverteilung in beiden Fraktionen festgestellt. Dabei war das Verhältnis für RDGC-L leicht in Richtung membrangebundene Fraktion verschoben (ÜS: Pellet = 44:56). Im Gegensatz zu Wildtyp-Fliegen in denen die Anwesenheit von RDGC-S dafür sorgt, dass das Gleichgewicht stark in Richtung ÜS verschoben war, konnte in der Mutante *rdgC^{ΔS}* für RDGC-M eine ungefähre Gleichverteilung in die beiden Fraktionen festgestellt werden.

Um zu überprüfen ob der Tag, in den *rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliegen einen Einfluss auf die Lokalisation von RDGC hat, wurde eine subzelluläre Fraktionierung von Kopfextrakten dieser Fliegen durchgeführt. Um die Lokalisation von getaggttem und wildtypischem RDGC zu vergleichen, wurden neben den Extrakten aus homozygoten *rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliegen auch Extrakte wildtypischer und heterozygoter Fliegen fraktioniert.

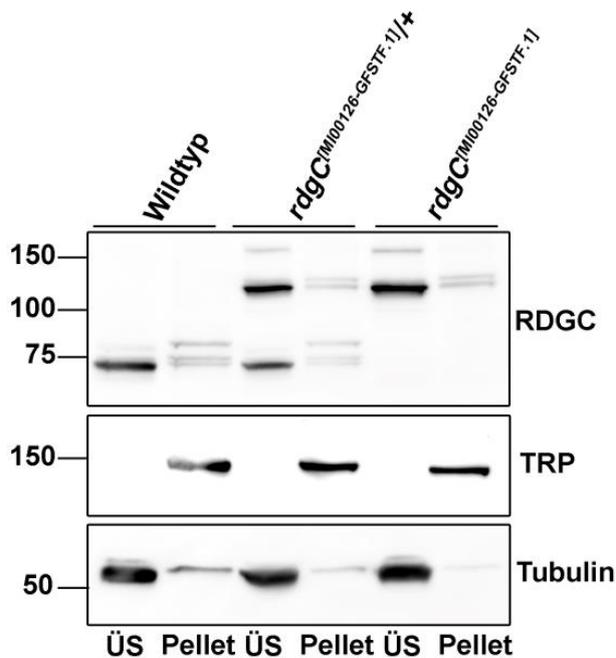


Abbildung 3.21 Fraktionierung von RDGC in *rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliegen. Es wurden neben den homozygoten auch heterozygote *rdgC^[MI00126-GFSTF.1]*-Fliegen sowie Wildtypen untersucht, um getaggttes und natives RDGC vergleichen zu können. Als Kontrolle für Membranproteine wurde TRP und als Kontrolle für die löslichen Proteine Tubulin detektiert. Es wurden pro Spur 6 Kopfüquivalente aufgetragen. Die Größe (in kDa) und die Position des molekularen Größenmarkers wurden links gezeigt.

In Abbildung 3.21 können sowohl in Wildtyp-Fliegen als auch in den heterozygoten Mutanten die drei Isoformen RDGC-S, RDGC-M und RDGC-L wie bereits beschrieben verteilt. Über den eingeführten Tag war das Molekulargewicht für jede Isoform um ca. 30 kDa größer als das entsprechende wildtypische Protein. Auch bei den getaggtten Proteinen konnte RDGC-S vornehmlich im Überstand gefunden werden, während RDGC-M und RDGC-L membrangebunden waren. Bei den Mutanten konnte im Überstand zusätzlich auf der Höhe

Ergebnisse

von 150 kDa eine Bande gefunden werden, bei der es sich aber wahrscheinlich um ein unspezifisches Signal handelt. Da RDGC-L auch im getaggtten Zustand nur um 9,4 kDa größer ist als RDGC-M bzw. RDGC-S handelt es sich bei dieser Bande nicht um RDGC-L. Um getaggttes und natives RDGC direkt vergleichen zu können wurden Extrakte aus heterozygoten *rdgC*^[MI00126-GFSTF.1]-Fliegen ebenfalls fraktioniert. Es zeigte sich, dass die Lokalisation des getaggtten RDGCs für alle Varianten gleich war wie für das wildtypische RDGC. Während RDGC-S sowohl getaggt als auch im nativen Zustand verstärkt in der löslichen Fraktion zu finden war, waren RDGC-M und -L eher in der Pelletfraktion zu finden. Der Tag hat auf die subzelluläre Lokalisation von RDGC keine Auswirkung.

Ergebnisse

Proteine, die sich bei der subzellulären Fraktionierung in der Pelletfraktion finden sind nicht immer direkt an die Membran gebunden. Ein Teil dieser Proteine ist über eine Bindung an andere Proteine mit der Membran assoziiert. Ein Beispiel für ein solches membranassoziiertes Protein in *Drosophila melanogaster* ist das Gerüstprotein INAD, welches im folgenden Versuch als Kontrollprotein diente. Zur Unterscheidung membranständiger und membranassoziierter Proteine wurde die Pelletfraktion mit 8 M Harnstoff behandelt.

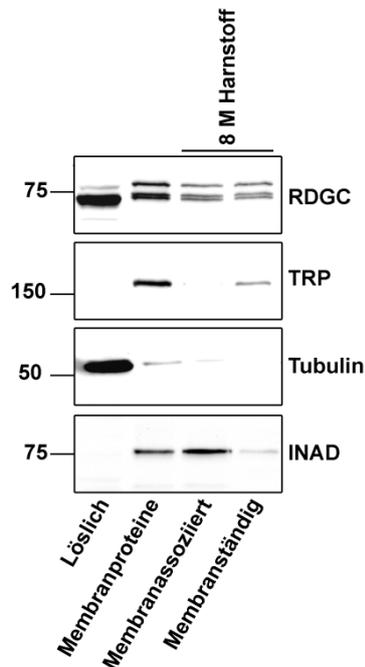


Abbildung 3.22 Subzelluläre Fraktionierung mit 8 M Harnstoff. In der ersten Spur wurde die lösliche Fraktion aufgetragen, in der zweiten Spur befinden sich alle Proteine, die vor der Harnstoffbehandlung zur Membranfraktion gehörten. Spur drei beinhaltet indirekt und Spur vier direkt an die Membran gebundene Proteine.

Bereits vor der Fraktionierung mit Harnstoff zeigte sich RDGC-S vornehmlich in der löslichen Fraktion, während RDGC-M und -L wie erwartet eher in der Membranfraktion zu finden waren. Die Membranproteine wurden einer Behandlung mit 8 M Harnstoff unterzogen. Dabei ergab sich in etwa eine Gleichverteilung der beiden Isoformen RDGC-M und -L in die membranständige und membranassoziierte Fraktion.

Anhand der Kontrollen mit TRP und INAD zeigte sich, dass die ambivalente Zuordnung in der Lokalisation keinem Fehler in der Durchführung der Fraktionierung zuzuschreiben war. Das Kontrollprotein für die membranassoziierte Fraktion war INAD, welches nach Behandlung mit 8 M Harnstoff tatsächlich vornehmlich in dieser Fraktion zu finden war. TRP als membranständiges Protein konnte auch mit 8 M Harnstoff nicht aus der Membranfraktion gelöst werden. Anders als die Kontrollen INAD und TRP konnten die beiden Varianten RDGC-M und -L nicht eindeutig einer Fraktion zugeordnet werden.

3.2.4 In silico Analyse der RDGC Isoformen auf mögliche Transmembrandomänen oder Membrananker

Da die beiden Isoformen RDGC-M und -L im Vergleich zum löslichen RDGC-S membran-zugehörig zu sein scheinen, sich die drei Isoformen aber nur im N-Terminus unterscheiden, könnte dort ein Membrananker vorhanden sein. Um dies zu klären, wurden Hydropathie-Blots nach Kyte und Doolittle mit dem ProtScale Webtool (<http://web.expasy.org/protscale/>; Gasteiger et al. 2003) durchgeführt. Ein Wert $>1,6$ zeigt dabei einen potentiellen Membrandurchgang an. Es wurde eine Fenstergröße von 9 sowie ein lineares „weight variation model“ angenommen

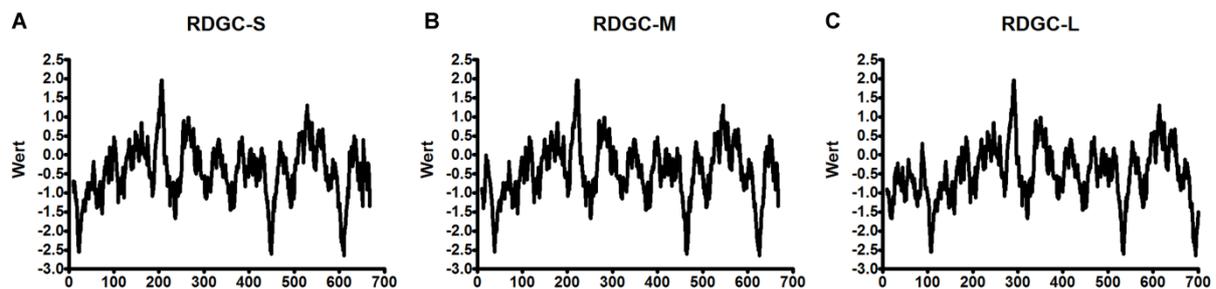


Abbildung 3.23 Hydropathie-Blots für die drei RDGC-Isoformen. Die Hydropathie-Blots wurden mit der Aminosäure-Sequenz der einzelnen Isoformen und einem Webtool (<http://web.expasy.org/protscale/>) erstellt.

Abbildung 3.23 zeigt bei keiner der drei Isoformen einen Wert $>1,6$, womit kein potentieller direkter Membrandurchgang vorhanden ist. Insbesondere die unterschiedlichen N-terminalen Bereiche weisen keine hohen Hydropathiewerte bei RDGC-M und RDGC-L im Vergleich zu RDGC-S auf. Es ist bereits für RDGC-Homologe in anderen Organismen bekannt, dass der N-Terminus für die Anlagerung in die Membran verantwortlich ist.

Betrachtet man diese PPEFs, die homolog zur *Drosophila* RDGC sind, findet man sowohl in *C. elegans* als auch in *Kinetoplastea* am N-Terminus eine Membranverankerung durch Myristoylierung oder Palmitoylierung. Die Vermutung lag nahe, dass die Membranverankerung von RDGC in *Drosophila melanogaster* ebenfalls über die Bindung an einen Fettsäurerest zustande kommt. Um diesem Verdacht nachzugehen, wurde die N-terminale Sequenz mit einem Vorhersageprogramm (NBA-PALM; Xue et al. 2006) auf das Vorkommen eines Fettsäureankers überprüft. Es wurde für RDGC-M eine potentielle Palmitoylierungsstelle an Cys3 und für RDGC -L an Cys5 und Cys7 vorhergesagt. Bei RDGC-S war kein potentieller Membrananker über das Vorhersageprogramm zu finden.

Um die Hypothese der Palmitoylierung zu überprüfen, wurde neben den drei bekannten wildtypischen RDGC Isoformen zudem potentielle Palmitoylierungsmutanten in *Drosophila* Schneider 2-Zellen (S2-Zellen) exprimiert und dort untersucht.

3.2.5 Expression von RDGC in S2-Zellen

Für die Klonierung von *rdgC-S* und *-L* in den S2-Expressionsvektor pMT-V5/His A wurde die in 3.1.1 hergestellte cDNA als Templat verwendet. Diese cDNA diente als Templat für eine PCR, bei der *rdgC*-spezifische flankierende Primer mit entsprechenden Restriktions-Schnittstellen (*rdgC-RF_F_KpnI* bzw. *rdgC-RB_F_KpnI* und *RdgC_XhoI_R*) zur Amplifikation verwendet wurden. Die Primersequenzen können 2.10 entnommen werden. Über die mit den Primern eingeführten Schnittstellen konnten die PCR-Produkte nach einem Verdau mit dem entsprechenden Enzym und einer Reinigung mit dem Qiagen PCR-Purification Kit in den ebenfalls verdauten Vektor pMT V5-His A ligiert werden. Diese Konstrukte wurden anschließend in *E. coli XL1 blue* Zellen transformiert und mittels Ampicillin selektiert. Es wurden sowohl für *rdgC-S* als auch für *rdgC-L* im pMT V5/His A Vektor positive Klone gefunden.

Da *rdgC-M* nicht direkt mit flankierenden Primern mit den gewünschten Restriktions-Schnittstellen aus cDNA amplifiziert werden konnte, wurden zunächst Primer ohne zusätzliche Schnittstellen (*rdgC_Indel_F* und *rdgC_R*) verwendet. Da die genutzte proof-reading DNA-Polymerase (Phusion Polymerase) keinen A-Überhang einführt, wurde dies über eine kurze Inkubation mit einer Taq-Polymerase erledigt. Das Produkt wurde nach einer Aufreinigung mit dem Qiagen PCR-Purification Kit in den TOPO-TA Vektor (pCR[®]2.1-TOPO) kloniert. Die DNA eines positiven Klons wurde als Templat für eine PCR mit Primern mit integrierten Schnittstellen verwendet (*RdgC-mid-KpnI_F* und *RdgC_XhoI_R*). Dieses PCR-Produkt wurde ebenfalls mit dem Qiagen PCR-Purification Kit aufgereinigt, verdaut und in den entsprechend verdauten pMT V5-His A Vektor ligiert. Nach der Transformation in kompetente *E. coli XL1 blue* ergaben sich auch hier positive Klone. Für jede der drei Isoformen wurde ein positiver Klon sequenziert.

Um die Hypothese der Palmitoylierung von RDGC-M und RDGC-L zu bestätigen, wurden mit passenden Primern und dem QuickChange Site directed mutagenesis Kit an den potentiellen Palmitoylierungsstellen eine Cystein zu Alanin Mutation eingeführt. Dafür wurden zunächst die entsprechenden Primer mit den gewünschten Mutationen nach Herstellerangaben (Agilent) designed (s.2.10). Anschließend erfolgte die Mutagenese ebenfalls nach Herstellerprotokoll. Die mutierten Plasmide wurden in kompetente *E. coli XL1 blue* transformiert und mit Ampicillin selektiert. Zur Bestätigung der korrekten Mutagenese wurde für jede mutierte Form ein Klon sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die Mutation der N-Termini von RDGC-M und -L. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen in wildtypischer sowie mutierter Form sind in Abbildung 3.24 gezeigt.

Ergebnisse

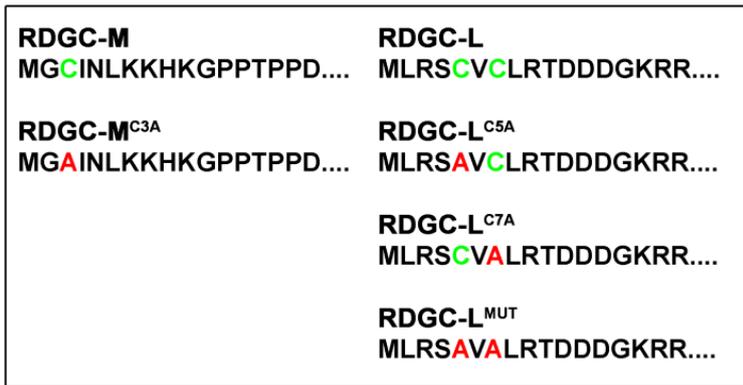


Abbildung 3.24 Aminosäuresequenzen der N-Termini wildtypischer und mutierter Isoformen. Es sind die Aminosäuresequenzen der N-Termini wildtypischer und mutierter Isoformen gezeigt. In Grün sind die potentiell palmitoylierbaren Cysteine und in Rot die Stellen im mutierten Zustand markiert.

Die S2-Zellen wurden wie in 2.18.2 beschrieben mit den unterschiedlichen RDGC-Varianten transfiziert und die Proteinexpression mit CuSO₄ induziert. 24 h nach der Induktion wurden die Zellen einem Westernblot unter Verwendung des α -RDGC-Antikörpers zugeführt (s. Abbildung 3.25). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Tubulin mit dem entsprechenden Antikörper.

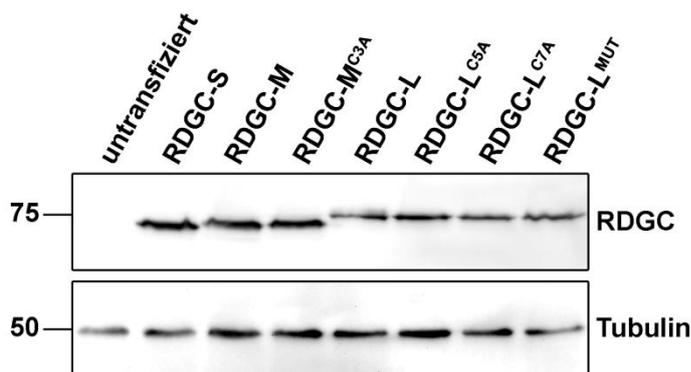


Abbildung 3.25 Expression aller wildtypischen und mutierten Isoformen in S2-Zellen. Es wurden Extrakte aus S2-Zellen ($\sim 10^5$ Zellen), die je eine Isoform von RDGC entweder in der nativen oder der mutierten Form exprimierten aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. RDGC wurde mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde die Expression von Tubulin mit dem α -Tubulin-Antikörper nachgewiesen.

Wie Abbildung 3.25 zeigt, wurden alle hergestellten RDGC-Varianten in S2-Zellen exprimiert. Schwankungen in der Proteinmenge waren auf unterschiedlich effiziente Transfektionen zurückzuführen. Die drei Isoformen und die entsprechenden Mutanten wurden im Folgenden näher untersucht.

3.2.6 Immuncytochemische Analyse der unterschiedlichen RDGC-Isoformen in S2-Zellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der RDGC-Isoformen einschließlich der mutierten Varianten, wurden erneut S2-Zellen wie in 2.18.2 beschrieben transfiziert und induziert. Die Proteine wurden mit einem primären α -V5-Antikörper und einem sekundären

Ergebnisse

AF488-gekoppelten α -Maus-Antikörper markiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

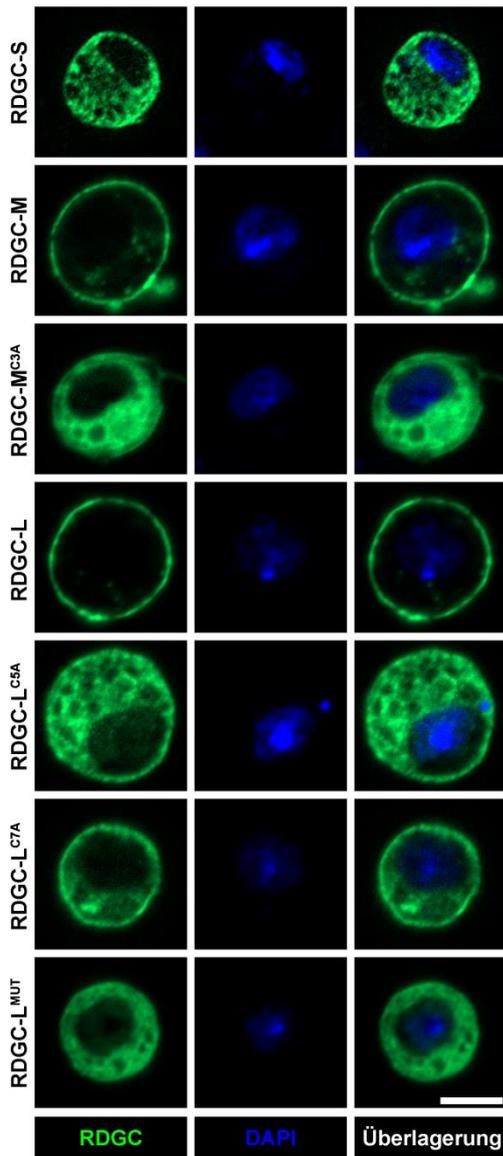


Abbildung 3.26 Immunocytochemie transient transfizierter S2-Zellen. Es ist für alle transfizierten Isoformen eine exemplarische Zelle gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Der Nachweis von RDGC erfolgte über den eingeführten V5-Tag mit Hilfe eines α -V5-Antikörper und sekundär mit einem AF488-gekoppelten α -Maus-Antikörper (grün). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

Abbildung 3.26 zeigt exemplarisch je eine transfizierte Zelle für jede der untersuchten RDGC-Varianten. RDGC-S war über die gesamte Zelle verteilt im Cytoplasma, aber nicht im Zellkern nachweisbar, was das typische Bild für ein lösliches Protein ist und daher so zu erwarten war. Im Gegensatz dazu waren sowohl wildtypisches RDGC-M als auch wildtypisches RDGC-L nur am äußeren Rand der Zelle in der Plasmamembran lokalisiert.

Durch die Mutation von Cystein3 in RDGC-M zu Alanin, war das Protein nicht länger klar abgegrenzt in der Plasmamembran zu sehen. Es zeigte sich vergleichbar mit RDGC-S eine Verteilung über die gesamte Zelle. Die Mutation der potentiellen Palmitoylierungsstellen Cys5

Ergebnisse

und Cys7 in RDGC-L zeigte denselben Effekt auf die Lokalisation. Auch diese Proteine waren nicht länger in der Plasmamembran verankert, sondern innerhalb der Zelle zu finden. Bei RDGC-L^{C7A} war immer noch deutlich die Plasmamembran markiert, was bei RDGC-L^{C5A} nicht der Fall war. Bei RDGC-L^{MUT} war die Plasmamembran ebenfalls nicht markiert, was darauf hindeutet, dass die Mutation von Cys7 allein nicht zur vollständigen Translokation aus der Membran heraus ausreicht.

Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass die Membranverankerung von RDGC-M und RDGC-L durch Palmitoylierung des N-Terminus der beiden Proteine gewährleistet wird.

3.2.7 Subzelluläre Fraktionierung aller RDGC-Varianten in S2-Zellen

Für die subzelluläre Fraktionierung in den S2-Zellen wurden S2-Zellen transient transfiziert, die Proteinexpression induziert und eine Fraktionierung wie in 0 beschrieben durchgeführt. Die Fraktionen wurden anschließend auf einem Westernblot mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen. Im Überstand waren lösliche Anteile zu finden, während in der Pelletfraktion membrangebundene Proteine dargestellt wurden. Es wurden alle sieben RDGC-Varianten exprimiert und fraktioniert (s. Abbildung 3.27 A). Um die Verteilung in den beiden Fraktionen quantitativ erfassen zu können, wurden Überstand und Pellet als prozentualer Anteil des Gesamtproteins dargestellt (s. Abbildung 3.27 B). Während RDGC-M und RDGC-L zu ca. 75 % im Pellet und damit in der Membranfraktion zu finden waren, führte die Mutation der potentiellen Palmitoylierungsstellen zu einer Verschiebung der Verteilung in Richtung löslicher Fraktion. Bei RDGC-S zeigte sich in diesem Experiment eine Gleichverteilung zwischen den Fraktionen.

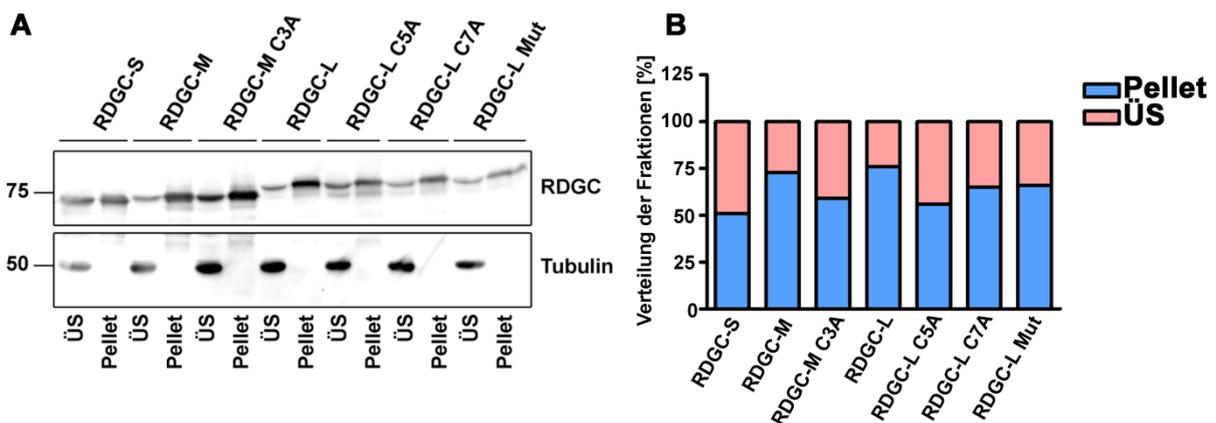


Abbildung 3.27 Subzelluläre Fraktionierung aller RDGC-Varianten aus S2-Zellen. A) zeigt den Westernblot der subzellulären Fraktionierung aller RDGC-Isoformen aus S2-Zellen. Neben der Detektion von RDGC mit dem α -RDGC-Antikörper wurde Tubulin als Ladekontrolle und zur Bestätigung einer erfolgreichen Fraktionierung verwendet. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenstandards sind links gezeigt. B) zeigt die dazugehörige Quantifizierung. Es wurde die prozentuale Verteilung zwischen Überstand (rot) und Pellet (blau) aufgetragen.

Um eine statistische Auswertung der Verteilung durchführen zu können, wurde die Fraktionierung vier- bis sechsmal wiederholt. Dazu wurde RDGC-S als Beispiel für die lösliche

Ergebnisse

Variante, RDGC-L für die membranständige Variante und RDGC-L^{MUT} als Beispiel für die mutierte Palmitoylierungsstelle verwendet.

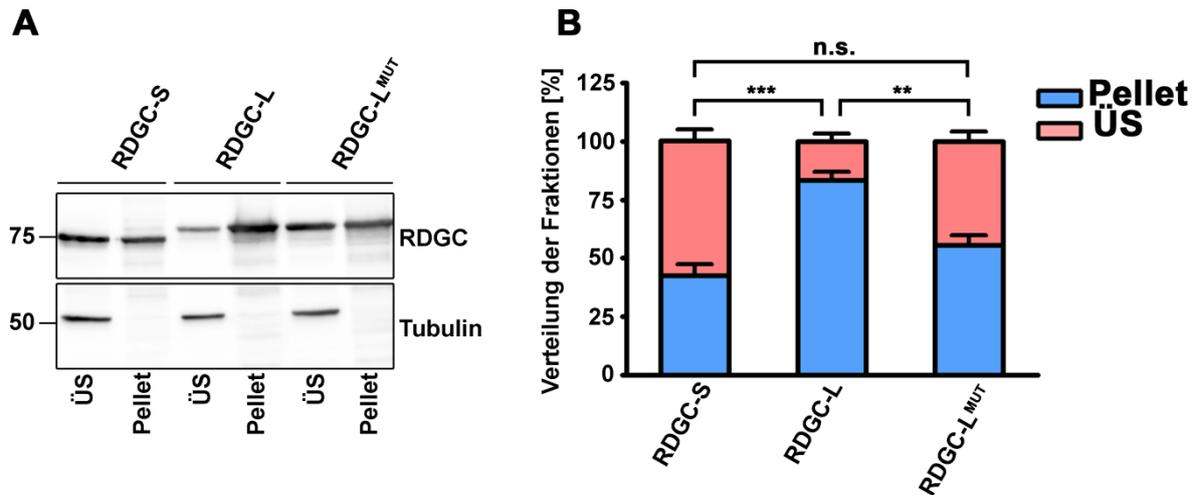


Abbildung 3.28 Subzelluläre Fraktionierung von RDGC-S, -L und -L^{MUT} aus S2-Zellen. A) zeigt einen exemplarischen Westernblot der subzellulären Fraktionierung. RDGC wurde mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen, die Kontrolle Tubulin wurde mit dem α -Tubulin-Antikörper nachgewiesen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenstandards sind links gezeigt. B) zeigt die Quantifizierung der subzellulären Fraktionierung mit dem prozentualen Anteil an löslichem (rot) und membrangebundenem (blau) Anteil. Es wurden n=4-6 Wiederholungen durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem one-way-ANOVA Test und der Bonferroni-Korrektur ermittelt mit $P > 0,025$ n.s., $P < 0,025$ *, $P < 0,005$ **, $P < 0,0005$ ***.

Wie Abbildung 3.28 zeigt, war RDGC-S zu ca. 40 % in der Membranfraktion zu finden. Im Gegensatz dazu war RDGC-L zu 85 % in der Membranfraktion zu finden. In RDGC-L^{MUT} waren nur noch ca. 55 % des Proteins in der Pelletfraktion nachweisbar. Tubulin diente als Kontrolle dafür, dass keine löslichen Proteine im Pellet vorlagen und so das Ergebnis verfälscht wurde. Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen den beiden Fraktionen als Anteil der Gesamtmenge der entsprechenden Isoform angegeben. Es zeigte sich sowohl zwischen RDGC-S und RDGC-L als auch zwischen RDGC-L und RDGC-L^{MUT} ein signifikanter Unterschied des Anteils im Pellet. Beim Vergleich zwischen RDGC-S und RDGC-L^{MUT} konnte dagegen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung festgestellt werden.

3.2.8 Nachweis der Palmitoylierung von RDGC durch Acyl-Biotin-Exchange Experimente

Um die Palmitoylierung von RDGC-M und RDGC-L in der Fliege nachzuweisen, wurde ein Acyl-Biotin-Exchange Experiment durchgeführt. Dabei werden schlussendlich acylierte Cysteine markiert.

Dazu wurde RDGC aus *rdgC-Myc/TM3*-Fliegen über einen an Protein G-Beads gekoppelten α -Myc-Antikörper präzipitiert. Es wurde ein Lysepuffer mit 50 mM N-Ethylmaleimid verwendet um freie Cysteine zu blockieren. Im nächsten Schritt folgte eine Spaltung der Thioestergruppen durch Hydroxylamin (HAM) wodurch vorhandene Palmitoylierungen zerstört wurden. Die so frei gewordenen Thiolgruppen wurden mit biotin-BMCC markiert. Die

Ergebnisse

markierten Proteine wurden von den Beads gelöst und einem Westernblot zugeführt. Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte mit Hilfe von HRP-gekoppeltem Streptavidin.

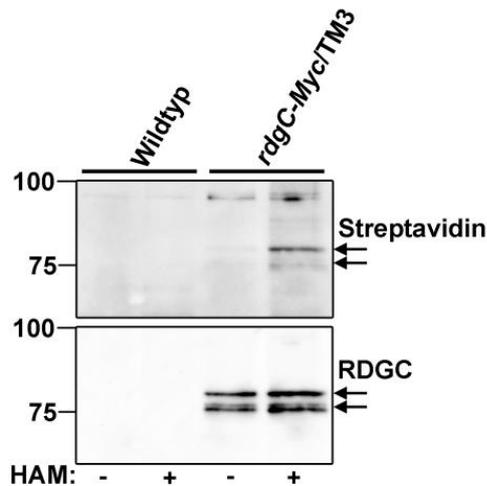


Abbildung 3.29 Biochemischer Nachweis der Palmitoylierung von RDGC. Aus Wildtyp und *rdgC-Myc/TM3* Kopfextrakten wurde RDGC präzipitiert und acylierte Cysteine durch Biotinylierung markiert. Der Nachweis der Biotinylierung erfolgte mit HRP-gekoppeltem Streptavidin. Als Kontrolle dafür, dass die markierten Proteine RDGC waren, diente der α -RDGC-Antikörper. Größe (in kDa) und Position des molekularen Gewichtsmarkers sind links gezeigt. Die Zugabe von Hydroxylamin (HAM) zur Abspaltung der Palmitoylierung ist mit +/- gekennzeichnet. Extrakte ohne HAM dienten als Negativkontrolle. Pfeile zeigen Banden, die in beiden Nachweisen gefunden werden.

Wie Abbildung 3.29 zeigt, konnte in den Präzipitaten aus *rdgC-Myc/TM3*-Fliegen auf der Höhe von ca. 80 kDa mit dem HRP-gekoppelten Streptavidin eine Bande nachgewiesen werden. Diese Bande war nicht in den Proben zu finden, in denen keine Hydroxylamin-Behandlung durchgeführt wurde. Auch in den Proben, die mit wildtypischen Fliegen durchgeführt wurden war keine entsprechende Bande zu finden. Zur Kontrolle, dass tatsächlich biotinyliertes RDGC detektiert wurde, wurden dieselben Extrakte mit dem α -RDGC-Antikörper detektiert. Es zeigte sich, dass die mit dem Straptavidin gefundene Bande dem RDGC-L entsprach. Auf der Höhe von 75 kDa zeigte sich mit dem Streptavidin ebenfalls eine, wenn auch deutlich schwächere, Bande. Diese Bande könnte RDGC-M entsprechen. Da der Nachweis mit dem α -RDGC-Antikörper keine Unterscheidung zwischen RDGC-M und -S zulässt, kann die schwächere Bande im Nachweis mit Streptavidin nicht eindeutig einer der beiden kleineren Isoformen zugeordnet werden.

3.2.9 Rekombinante Expression von RDGC in Sf9-Zellen

Klonierung und Expression von RDGC-S und RDGC-L in Sf9-Zellen

Um genauer zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Isoformen unterschiedliche enzymatische Eigenschaften besitzen, sollte ein *in vitro*-Assay durchgeführt werden. Dazu sollten die drei Isoformen rekombinant exprimiert werden.

Da eine Expression in S2-Zellen bereits gezeigt werden konnte, wurde zunächst versucht die Proteine aus diesen Zellen aufzureinigen. Es zeigte sich jedoch, dass weder die Aufreinigung

Ergebnisse

mit Ni-NTA-Agarosebeads gegen den His-Tag noch mit Hilfe eines V5-Antikörpers gegen den V5-Tag erfolgreich war. Deswegen wurden als Beispiel für eine lösliche Variante RDGC-S und für eine membrangebundene Variante RDGC-L in Sf9-Zellen exprimiert.

Da beide Varianten bereits im pMT-V5/His A-Vektor vorlagen, wurden diese Klone als Templat für die PCR zum Einfügen passender Schnittstellen verwendet. Es wurden die Schnittstellen XhoI und KpnI eingeführt und das Produkt in den pFastBac B-Vektor kloniert.

Die ligierten Produkte wurden in *E. coli XL1 blue*-Zellen transformiert und mit Hilfe von LB-Agarplatten mit Ampicillin auf eine positive Ligation selektiert. Es wurde je ein positiver Klon für beide Varianten sequenziert und in kompetente MAX Efficiency® DH10Bac™ (ThermoFisher) transformiert und so in die Bacmid-DNA integriert. Die so generierte Virus-DNA wurde in Sf9-Zellen transfiziert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 48 h bei 27 °C. Um den so gewonnenen Virustiter (P1) zu isolieren, wurden die Zellen mit dem Medium vom Boden abgelöst, die Zellen bei Raumtemperatur für 5 min und 500 x g abzentrifugiert und der Virustiter im Überstand dunkel bei 4 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 20 µl SDS-Extraktionspuffer aufgenommen, per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem α-RDGC-Antikörper nachgewiesen.

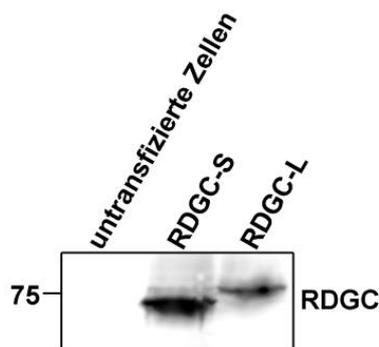


Abbildung 3.30 Nachweis der Expression von RDGC aus Sf9-Zellen. Zum Nachweis der erfolgreichen Expression von RDGC-S und -L in Sf9-Zellen wurden die Proteine aus Sf9-Zellen auf eine PVDF-Membran geblottet. Das Protein wurde mit dem α-RDGC-Antikörper nachgewiesen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind links gezeigt.

Mit diesem Westernblot (s. Abbildung 3.30) wurde die erfolgreiche Expression von RDGC-S und RDGC-L in Sf9-Zellen nachgewiesen.

Aufreinigung der getaggtten Proteine

Zur Aufreinigung von RDGC-S und -L wurden jeweils 2×10^6 Zellen/ml in 40 ml Grace's Insect Medium mit FCS ausgesät, über Nacht adaptiert und anschließend mit 1,6 ml P3 inokuliert. Als Negativkontrolle für weitere Versuche wurde ein Ansatz ohne Inokulum angesetzt. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mit dem Medium abgenommen, die Zellen pelletiert (RT, 1000 x g, 2 min) und mit 5 ml PBS (pH=7,4) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4 ml Lysepuffer aufgenommen und mit dem FastPrep-24 Homogenisator aufgeschlossen (3 x 20 s, 6,5 m/s). Zu jedem Zellaufschluss wurden 200 µl Ni-NTA-Agarosebeads zugegeben und für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Beads wurden 3 x mit je 1 ml TXWP gewaschen und mit 3 x 50 µl

Ergebnisse

Elutionspuffer für 10 min eluiert. Bei allen Schritten wurden Aliquots abgenommen und per SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen. Ein Teil wurde nach der Elektrophorese mit kolloidalem Coomassie angefärbt.

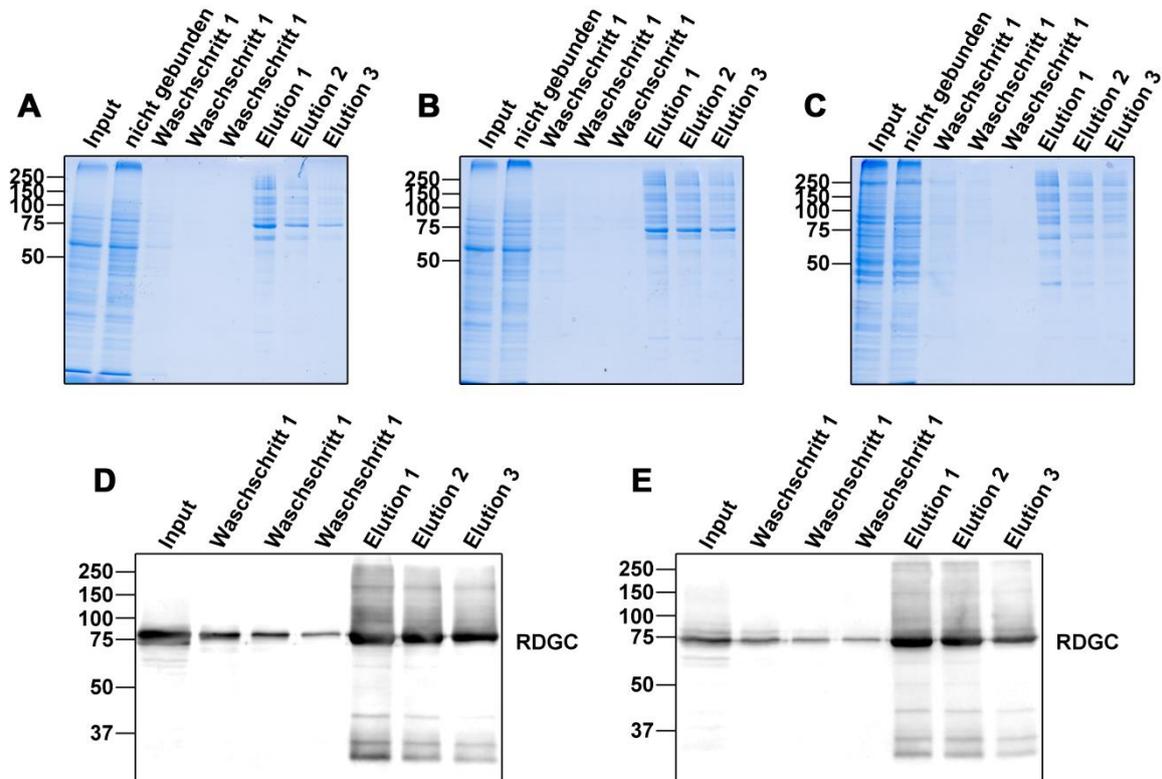


Abbildung 3.31 Nachweis der Aufreinigung von RDGC aus Sf9-Zellen. A) und D) zeigen das Coomassie-gefärbte SDS-Gel sowie den zugehörigen Westernblot der Aufreinigung von RDGC-L aus Sf9-Zellen. B) und E) zeigen entsprechend dazu das Coomassie-gefärbte Gel und den Westernblot für RDGC-S aus Sf9-Zellen. C) zeigt das Coomassie-Gel der untransfizierten Negativkontrolle. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind jeweils links gezeigt.

Bei der Aufreinigung der beiden RDGC-Isoformen aus Sf9-Zellen konnte in beiden Fällen deutlich angereichert das entsprechende Protein nachgewiesen werden. In beiden Fällen war ein deutlicher Hintergrund entsprechend den Proteinbanden in der Negativkontrolle zu finden. Es konnte nicht sauber aufgereinigt werden.

Die Elutionsfraktionen wurden für alle drei Transfektionen gepoolt und anschließend der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt (s. Tabelle 3.3)

Tabelle 3.3 Proteingehalt nach Aufreinigung aus Sf9-Zellen

	Proteingehalt [$\mu\text{g/ml}$]
RDGC-L	900 $\mu\text{g/ml}$
RDGC-S	1400 $\mu\text{g/ml}$
Negativkontrolle	800 $\mu\text{g/ml}$

Phosphatase-Assay mit rekombinant exprimierten Phosphatasen

Um eine Aktivität der rekombinant exprimierten Phosphatasen RDGC-S und RDGC-L nachzuweisen, wurde ein Phosphatase-Assay wie bereits beschrieben (Lee und Montell 2001) durchgeführt. Der Assay wurde in einem Calcium- und Calmodulin-haltigen Puffer mit dem Pseudosubstrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) durchgeführt. Da sich nach 1 h kein Farbumschlag messen lies, wurde der Assay über Nacht bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 410 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine kommerzielle λ -Phosphatase mitgeführt. Um auszuschließen, dass die gemessene Aktivität von zusätzlich isolierten Phosphatasen kam, wurden präzipitierte Proteine aus untransfizierten Sf9-Zellen mitgeführt.

Tabelle 3.4 Extinktionen aus Phosphatase-Assay

	Extinktion t=0	Extinktion t= 1 h	Extinktion t= 16 h
ohne Protein	0	0	0
RDGC-S	0,016	0,016	0,104
RDGC-L	0,008	0,010	0,110
untransfiziert	0,014	0,014	0,102
λ-Phosphatase	0,015	0,654	3,148

Wie Tabelle 3.4 zeigt, konnte nach einer Inkubationszeit von t= 1 h nur in der Positivkontrolle mit der λ -Phosphatase das Substrat umgesetzt und eine Extinktionsänderung gemessen werden. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Ansätze weitere 15 h bei 30 °C inkubiert. Es zeigte sich sowohl für RDGC-S als auch für RDGC-L eine schwache Zunahme der Extinktion bei 410 nm. Da sich ein vergleichbarer Anstieg auch in den Proben aus untransfizierten Zellen zeigte, war diese Aktivität unspezifisch und als Hintergrund präzipitierten Phosphatasen zuzuordnen. Es konnte für keine der beiden RDGC-Varianten eine Aktivität festgestellt werden.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der RDGC-Isoformen

3.3.1 Die Rolle der unterschiedlichen RDGC-Isoformen bei der Dephosphorylierung von RH1

RDGC war bereits als Phosphatase des Hauptrhodopsins RH1 bekannt. Bislang war der Nachweis der Phosphorylierung von RH1 nur mit Hilfe von radioaktiv markiertem Phosphat, welches den Fliegen zugefüttert wird nachweisbar. Da dieser Prozess zum einen sehr aufwendig und zum anderen durch die Radioaktivität auch mit einem Gefahrenpotential verbunden ist, wurde hier mit zwei anderen Methoden gearbeitet. Im Zuge dieser Arbeit wurden direkt die Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von RH1 nachgewiesen und ein Assay zur Detektion der Hyperphosphorylierung von RH1 etabliert.

Identifikation von Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Rh1

Zur Identifikation der Phosphorylierungsstellen in Rh1 wurden wildtypische Fliegen verwendet, die zunächst 15 min blau belichtet wurden um möglichst viel Rhodopsin in phosphoryliertes Metarhodopsin umzuwandeln (O'Tousa et al. 1985). Dann wurden 300 Köpfe in Extraktionspuffer mit Digitonin homogenisiert und für 1 h mit Protein A/G-beads gekoppeltem 4C5-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2 x SDS-LP bei Raumtemperatur eluiert, mittels SDS-PAGE auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Zur Kontrolle wurde ein Anteil der Proben ebenfalls auf einem 12 %-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und dem polyklonalen RH1-Antikörper nachgewiesen (s. Abbildung 3.32 B).

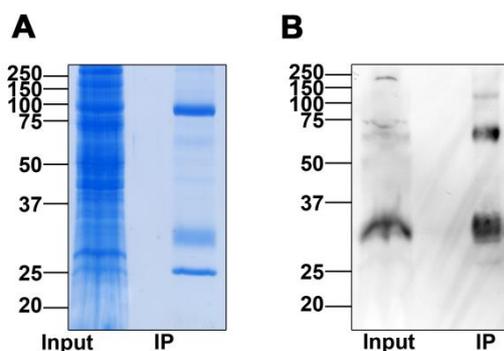


Abbildung 3.32 Immunpräzipitiertes RH1 aus wildtypischen Fliegen. Es wurden die Köpfe von 300 blau belichteten Wildtypen homogenisiert, RH1 mit dem 4C5-Antikörper immunpräzipitiert und auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt. A) zeigt beispielhaft ein Coomassie gefärbtes Gel. B) zeigt den zugehörigen Westernblot, der mit dem polyklonalen RH1-Antikörper inkubiert wurde. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind jeweils links angegeben. Im Input wurden auf dem Coomassie-gefärbten Gel 5 Kopfüquivalente und auf dem WB 2 Kopfüquivalente aufgetragen. Für die IP Fraktion wurden entsprechend 250 respektive 20 Kopfüquivalente aufgetragen.

Die entsprechende Bande auf dem Coomassie-Gel (s. Abbildung 3.32, A) wurde ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse an das Modul der Core Facility der

Ergebnisse

Universität Hohenheim weitergegeben. Dort wurde ein Trypsin-Verdau durchgeführt und die so entstandenen Peptide im Massenspektrometer untersucht.

Es wurden zwei C-terminale phosphorylierte Peptide gefunden. Für beide Peptide wurden Fragmentierungsspektren aufgenommen (s. Abbildung 3.33). Die beiden Peptide zeigten eine 100-%ige Sequenzübereinstimmung mit dem Rhodopsin1 aus *Drosophila melanogaster*. In allen drei Fragmentierungsspektren zeigte sich eine hohe Sequenzabdeckung mit dem Peptid über die γ - und die b-Serie.

Ergebnisse

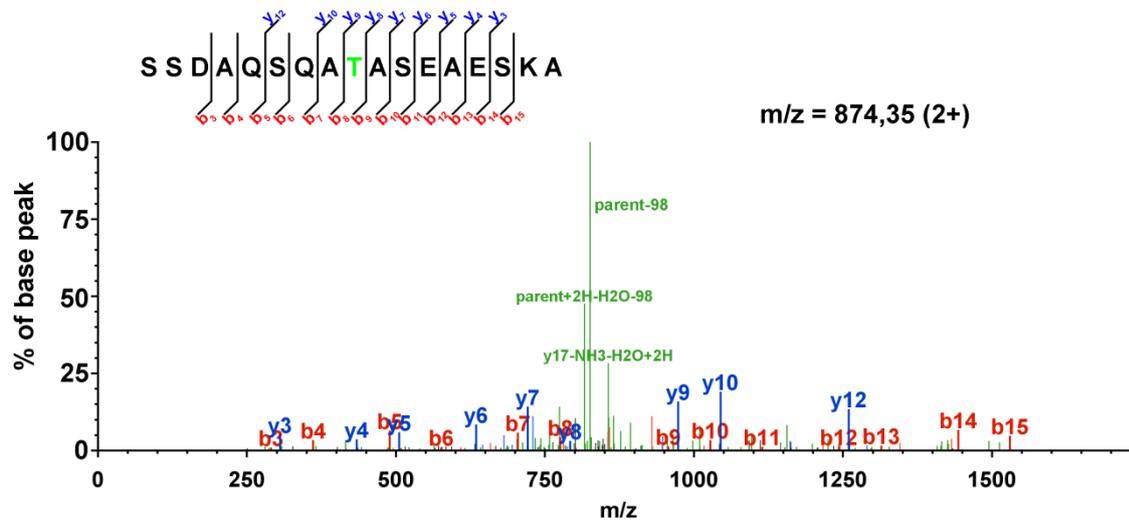
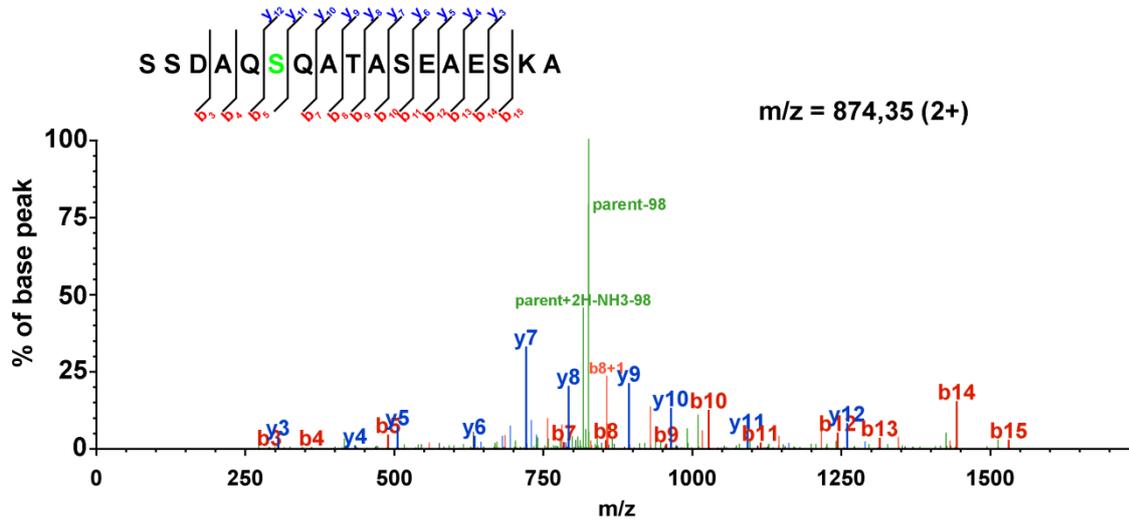
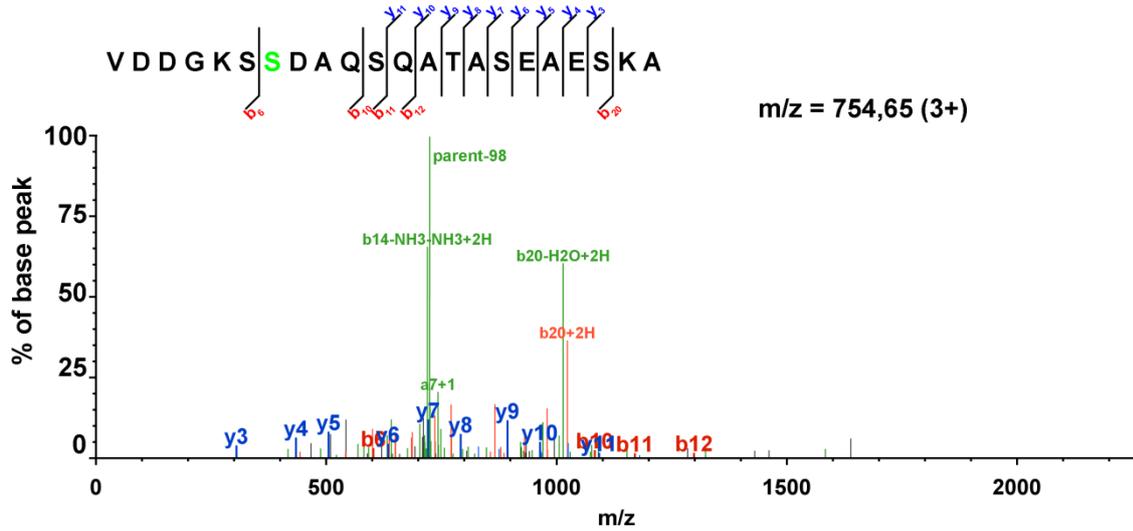


Abbildung 3.33 Fragmentierungsspektren für die C-terminalen Phosphorylierungsstellen in RH1. In rot wurden die Peaks die den Fragmenten der b-Serie entsprechen dargestellt, blau zeigt die Peaks der Fragmente der y-Serie. Grüne Peaks entsprachen dem Neutralverlust des Ursprungspeptids. -98 entspricht dabei der molekularen Masse der abgespaltenen Phosphatgruppe. Das zum Fragmentierungsspektrum gehörige RH1-Peptid ist oberhalb des entsprechenden Spektrums dargestellt und die gefundene phosphorylierte Aminosäure grün markiert.

Ergebnisse

Die potentiellen Phosphorylierungsstellen, die für das fragmentierte Peptid gefunden wurden, waren in jedem entsprechenden Fragmentierungsspektrum im Peptid grün gekennzeichnet. Es konnten die Phosphorylierungsstellen Serin358, Serin362 und Threonin365 im C-Terminus von RH1 gefunden werden. Eine schematische Darstellung des RH1 mit den gefundenen Phosphorylierungsstellen ist in Abbildung 3.34 gezeigt.

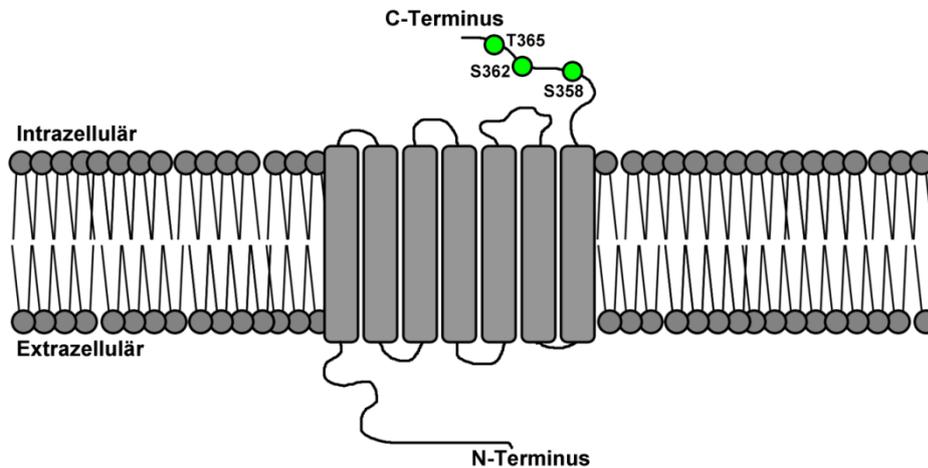


Abbildung 3.34 Schematische Darstellung von RH1 mit den gefundenen Phosphorylierungsstellen. Die grauen Kreise mit den angefügten Linien sollen den Bilayer der Membran darstellen. Die hellgrauen Rechtecke bilden schematisch die sieben Transmembrandomänen des RH1 und sind über cytosolische und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. N- und C-Terminus des Proteins wurden genauso wie der intra- und der extrazelluläre Bereich angegeben. Die gefundenen Phosphorylierungsstellen wurden grün dargestellt und mit der entsprechenden Aminosäure im Einbuchstabencode sowie der Position im Protein gekennzeichnet.

Assay zum Nachweis der Hyperphosphorylierung von RH1

Der kommerziell erhältliche RH1-Antikörper 4C5 hat sein Epitop im C-Terminus des RH1, während ein polyklonaler RH1-Antikörper die Sequenz der Aminosäuren 237-258 erkennt. Da die Phosphorylierungsstellen von RH1 in dessen C-Terminus liegen (Vinós et al. 1997), wurde die Vermutung aufgestellt, dass das Epitop des 4C5-Antikörpers im Falle einer Hyperphosphorylierung von RH1 sterisch gehindert ist. Um zunächst die Lage des Epitops zu bestätigen wurden Extrakte aus wildtypischen Fliegen mit solchen aus einer *rh1*^{A356}-Fliege verglichen, die ein an Position 356 C-terminal trunkiertes RH1 exprimiert. Zudem wurde eine Fliege mitgeführt, die ein RH1 exprimiert, bei dem alle putativen Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ausgetauscht waren (*rh1*^{CT S>A}). Als Negativkontrolle wurde die Rhodopsin-Nullmutante *ninaE*¹⁷ mitgeführt. Während der polyklonale Antikörper außer in der Nullmutante in allen Fliegen RH1 erkennt, kann der 4C5-Antikörper lediglich im Wildtyp RH1 nachweisen (s. Abbildung 3.35). Somit kann die Lage des Epitops des 4C5-Antikörpers bestätigt werden.

Ergebnisse

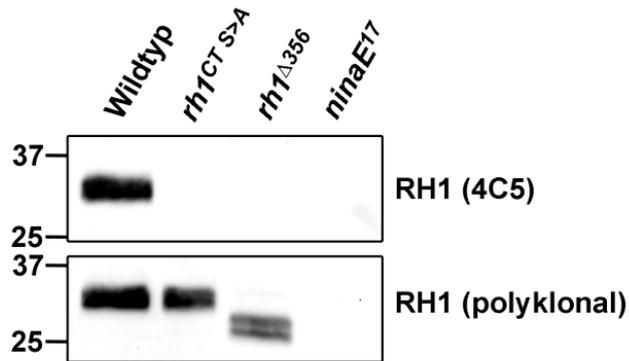


Abbildung 3.35 Überprüfung der Lage des Epitops des 4C5-Antikörpers. Es wurden je 3 Kopfüquivalente der unterschiedlichen Mutanten aufgetragen. Die Nullmutante *ninaE17* diente als Negativkontrolle. Der polyklonale RH1-Antikörper wurde zum Nachweis der RH1-Expression unabhängig vom intakten Epitop des 4C5-Antikörpers verwendet. Es wurden je Spur drei Kopfüquivalente aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind links gezeigt.

Um zu überprüfen, ob eine Hyperphosphorylierung von RH1 eine Auswirkung auf die Bindefähigkeit des 4C5-Antikörpers hat, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurden *rdgC³⁰⁶*-Fliegen in unterschiedlichen Lichtbedingungen verwendet. Wildtyp-Fliegen sowie RH1-Nullmutante Fliegen (*ninaE17*) dienten als Kontrollen.

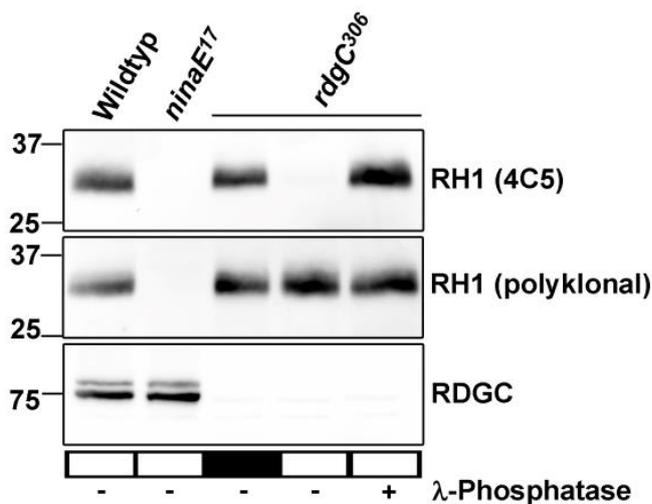


Abbildung 3.36 4C5-Signal als Nachweis für Hyperphosphorylierung von RH1. Während in dunkel gehaltenen *rdgC³⁰⁶*-Fliegen ein deutliches Signal mit dem 4C5-Antikörper zeigen, kann in Mutanten, die 1 h belichtet wurden und in denen RH1 daher hyperphosphoryliert vorliegt, kein Signal mehr nachgewiesen werden. Eine Behandlung der Extrakte aus belichteten Fliegen mit λ -Phosphatase führt dazu, dass der 4C5-Antikörper RH1 wieder nachweisen kann. Belichtete Wildtyp- und *ninaE17*-Fliegen dienten als Kontrollen. Der polyklonale RH1-Antikörper diente als Ladekontrolle für RH1. Die RDGC-Expression wurde mit dem α -RDGC-Antikörper nachgewiesen. Die Behandlung mit λ -Phosphatase wurde mit +/- gezeigt. Pro Spur wurden 3 Kopfüquivalente aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurde links dargestellt.

Wie Abbildung 3.36 zeigt, war in dunkel gehaltenen *rdgC³⁰⁶*-Fliegen mit dem 4C5-Antikörper ein Signal wie in belichteten Wildtypen zu sehen. Da die Mutanten nicht nur im Dunkeln gehalten, sondern auch im Dunkeln geschlüpft waren, konnte keine RH1-Phosphorylierung stattfinden und der 4C5-Antikörper daher zur Detektion verwendet werden. In Wildtypen kommt es bei Belichtung zwar zu einer Phosphorylierung, nicht aber zu einer

Ergebnisse

Hyperphosphorylierung von RH1, weswegen auch hier ein Signal detektiert werden konnte. In belichteten *rdgC³⁰⁶*-Mutanten konnte der 4C5-Antikörper kein Signal detektieren. Um zu zeigen, dass das fehlende Signal auf eine Hyperphosphorylierung von RH1 in diesen Fliegen zurückzuführen ist, wurden Extrakte aus Köpfen belichteter *rdgC³⁰⁶*-Fliegen mit λ -Phosphatase inkubiert. In diesen Extrakten konnte mit dem 4C5 ein Signal detektiert werden. Da die Dephosphorylierung dazu führte, dass der 4C5-Antikörper das RH1 wieder detektieren konnte, lag die mangelnde Bindungsfähigkeit des 4C5-Antikörpers tatsächlich an der Hyperphosphorylierung von RH1.

Um den 4C5-Antikörper für einen quantitativen Assay verwenden zu können, musste eine Abhängigkeit zwischen der Menge an hyperphosphoryliertem RH1 und der Stärke des Signals nachgewiesen werden. Dazu wurden Extrakte von belichteten *rdgC³⁰⁶*-Fliegen mit Extrakten aus belichteten wildtypischen Fliegen in unterschiedlichem Verhältnis gemischt, per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem 4C5-Antikörper nachgewiesen.

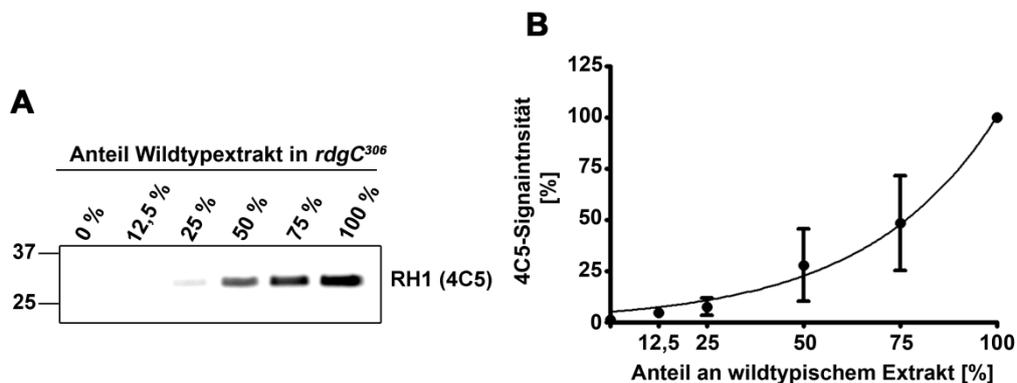


Abbildung 3.37 Abhängigkeit des 4C5-Signals von der RH1-Hyperphosphorylierung. Es wurden in unterschiedlichen Anteilen Kopfextrakte aus 1 h belichteten Wildtypen und *rdgC³⁰⁶*-Fliegen mit dem 4C5-Antikörper auf eine Hyperphosphorylierung untersucht. In A) wurde ein exemplarischer Westernblot dargestellt. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurden links gezeigt. B) zeigt die zugehörige Quantifizierung. Der Standardfehler SEM wurde aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Wie Abbildung 3.37 zeigt, war mit sinkendem Gehalt an *rdgC³⁰⁶*-Extrakt und dem damit einhergehenden geringer werdenden Anteil an hyperphosphoryliertem RH1 ein zunehmendes Rhodopsin-Signal zu verzeichnen. Der Zusammenhang war exponentiell ansteigend. Eine mögliche Erklärung ist, dass hyperphosphorylierte RH1-Moleküle aus *rdgC³⁰⁶*-Fliegen die Bindungsstellen des 4C5-Antikörpers blockieren und so zu einer sterischen Hinderung führen.

Hyperphosphorylierung von RH1 in den *rdgC*-Mutanten

Da ein Zusammenhang zwischen dem Anteil an hyperphosphoryliertem RH1 und der Signalstärke gezeigt wurde, konnte der 4C5-Antikörper für den Nachweis der Hyperphosphorylierung von Rh1 verwendet werden. Da in der *rdgC*-Nullmutante RH1-Hyperphosphorylierung zu beobachten war, sollte die Untersuchung der unterschiedlichen

Ergebnisse

rdgC-Mutanten neue Erkenntnisse dazu liefern, welche der Isoformen für die Dephosphorylierung verantwortlich sind.

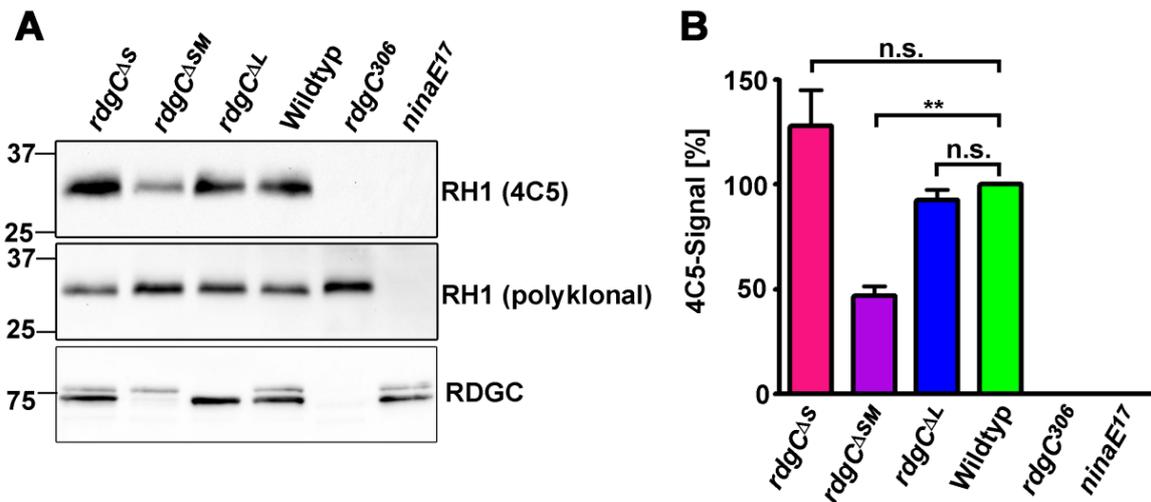


Abbildung 3.38 Rh1-Hyperphosphorylierung in den verschiedenen *rdgC*-Mutanten. Für den Nachweis der Hyperphosphorylierung wurden Fliegen über Nacht dunkel gehalten, für 1 h im Hellen inkubiert und von den daraus gewonnenen Extrakten je 3 Kopfüquivalente pro Spur aufgetragen. A) zeigt einen exemplarischen Westernblot. Der Nachweis für die Hyperphosphorylierung erfolgte mit dem 4C5-Antikörper, die nicht-phosphospezifische Ladekontrolle erfolgte mit dem polyklonalen RH1-Antikörper. Zum Nachweis der unterschiedlichen Zusammensetzung der RDGC-Isoformen in den Mutanten wurde der α -RDGC-Antikörper verwendet. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurde links dargestellt. B) Für die Quantifizierung wurde das 4C5-Signal auf das polyklonale RH1-Signal normiert und als prozentualer Anteil bezogen auf den Wildtyp angegeben. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte aus 8-10 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem ANOVA Test und dem Dunnett's-Test ermittelt. Dabei galt $P > 0,05$ n.s., $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ ** und $P < 0,001$ ***.

Dazu wurden alle untersuchten Fliegen über Nacht im Dunkeln inkubiert und im Anschluss für eine Stunde weiß belichtet. Das Signal des 4C5-Antikörpers wurde auf das Signal des polyklonalen Antikörpers normiert und das Signal aus Wildtypen als 100 % festgelegt. *rdgC^{ΔL}*-Fliegen zeigten ein wildtypisches Signal, was ein Hinweis darauf war, dass RDGC-L für eine korrekte Dephosphorylierung nicht essentiell ist. In *rdgC^{ΔS}*-Fliegen, in denen kein RDGC-S und stark reduziert RDGC-M exprimiert wurde, kam es zu einer leichten Hyperphosphorylierung, die aber nicht mit der Hyperphosphorylierung in den Nullmutanten vergleichbar war. Im Gegensatz dazu war in *rdgC^{ΔS}*-Fliegen, in denen zwar kein RDGC-S, dafür aber stark erhöht RDGC-M exprimiert wurde keine Hyperphosphorylierung nachweisbar. Berücksichtigt man den Gehalt an RDGC in *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen (s. Abbildung 3.10), zeigt sich dort insgesamt eine stark reduzierte Menge an RDGC, was der Grund für die leichte Hyperphosphorylierung sein könnte.

Die Rolle von RDGC beim PDA

In weißäugigen Fliegen kommt es bei der Stimulation mit blauem Licht zur Ausprägung eines so genannten „Prolonged Depolarizing Afterpotential“ (PDA). Während nach einem Orangelichtimpuls das Ruhepotential wieder erreicht wird, kommt es während des PDAs nur zu einer sehr geringen Repolarisierung. Grund dafür ist, dass das Gleichgewicht von Rhodopsin zu Metarhodopsin auf 30:70 verschoben wird. Das so entstandene Metarhodopsin wird von

Ergebnisse

Arrestin2 gebunden. Da für die Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin ein Lichtimpuls von ~ 566 nm (orange) benötigt wird, akkumuliert bei Belichtung mit blauem Licht das Metarhodopsin. Da das in der Zelle vorhandene Arrestin2 nicht ausreicht, um diese Menge an Metarhodopsin zu binden, kommt es zu einer andauernden Aktivierung der Phototransduktionskaskade (Dolph et al. 1993; LeVine et al. 1990). Werden Fliegen mit mehreren Blaulichtstimuli in geringer Intensität belichtet, kommt es in unterschiedlichen Mutanten zu einem früheren oder auch späteren Eintritt in das PDA.

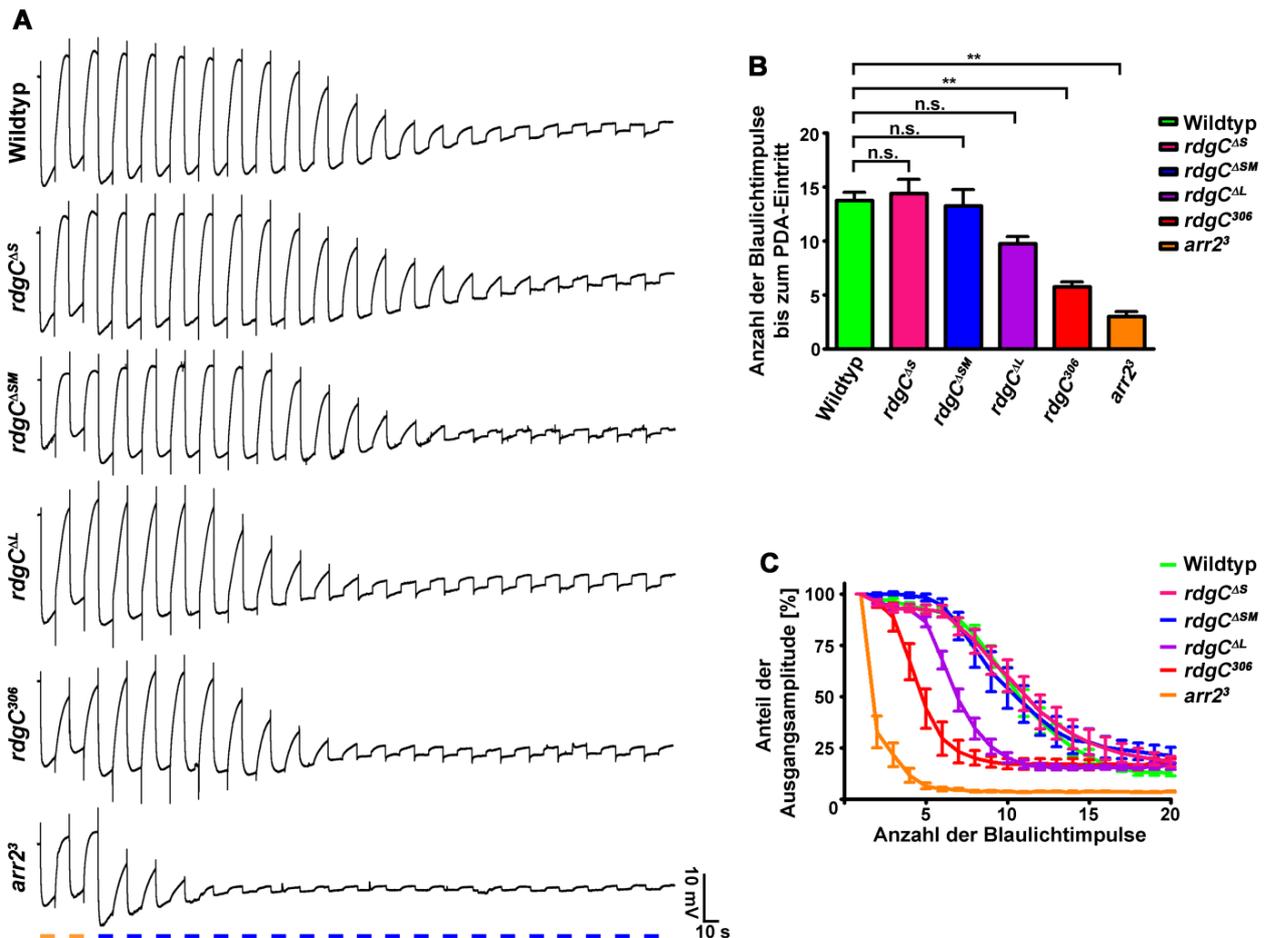


Abbildung 3.39 PDA in verschiedenen $rdgC$ -Mutanten. Die untersuchten Fliegen wurden bis zum Schlüpfen im Dunkeln gehalten und anschließend einen Tag im Dunkeln inkubiert bevor sie gemessen wurden. A) zeigt exemplarisch die Elektretinogramme (ERGs) der untersuchten Fliegen. Über die beiden Orangeflichtimpulse zu Beginn wurde eine replizierbare Ausgangsbedingung für alle Fliegen geschaffen. Es folgten 20 Blaulichtimpulse für je 10 s mit 10 sekündiger Dunkelpause zwischen den Impulsen. B) Quantifizierung des Eintritts in das PDA. Als Eintrittsmoment wurde der Stimulus gewählt, bei dem kein „on“-Transient mehr gemessen werden konnte. Es wurden für jeden Genotyp 8 Fliegen untersucht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler und die Signifikanz wurde mit dem Dunnett's Test ermittelt. Dabei gilt $P > 0,05$ n.s., $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ ** und $P < 0,001$ ***. C) zeigt den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Blaulichtimpulse und der zugehörigen Amplitude angegeben als prozentualer Anteil der Amplitude, die durch den ersten Blaulichtimpuls hervorgerufen wurde.

In diesem Versuchsaufbau wurden einen Tag alte Fliegen verwendet, die im Dunkeln geschlüpft waren. Um bei allen untersuchten Fliegen einen gleichen Ausgangszustand mit der

Ergebnisse

maximalen Menge an Rhodopsin zu erhalten, wurden der eigentlichen PDA-Messung zwei intensive Orangelichtimpulse (ca. 20 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) vorgeschaltet. Die anschließende Messung mit blauem Licht wurde in 20 Impulsen mit einer Intensität von $\sim 2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ durchgeführt. Als Eintritt in das PDA wurde die letzte ERG-Antwort angesehen, die noch einen „on“-Transienten aufwies. Neben dem Zeitpunkt des Eintretens der PDAs wurde zum Zeitpunkt jedes Lichtimpulses die maximale Amplitude gemessen. Um die Amplituden aller untersuchten Fliegen vergleichen zu können und messungsbedingte Unterschiede zu eliminieren, wurde eine Normierung auf die durch den ersten Blaulichtimpuls hervorgerufene Amplitude durchgeführt.

Es wurden Wildtypen, sowie die Mutanten *rdgC^{ΔS}*, *rdgC^{ΔSM}* und *rdgC^{ΔL}* und zur Kontrolle *rdgC³⁰⁶* sowie *arr2³*-Mutanten untersucht. *arr2³*-Mutanten sind Arrestin2-Nullmutanten, für die bereits in einem vergleichbaren Versuchsaufbau gezeigt wurde, dass das PDA früher als im Wildtyp erreicht wird (Vinós et al. 1997). In *rdgC³⁰⁶*-Mutanten kommt es ebenfalls zu einem früheren Eintritt in das PDA als in Wildtypen. Grund dafür ist die Hyperphosphorylierung von Rhodopsin in Abwesenheit von RDGC. Hyperphosphoryliertes RH1 bildet sehr stabile, nicht spaltbare Komplexe mit Arrestin2. Daher steht in den *rdgC*-Nullmutanten im Verhältnis weniger Arrestin2 zur Deaktivierung von Metarhodopsin zur Verfügung als in Wildtypen.

In *rdgC^{ΔS}*- sowie in *rdgC^{ΔL}*-Mutanten konnte kein Unterschied zu wildtypischen Fliegen festgestellt werden (s. Abbildung 3.39). Im Unterschied dazu wurde bei *rdgC^{ΔSM}*-Mutanten ein signifikant früheres Erreichen des PDAs festgestellt als in Wildtypen. Bei der Betrachtung der Abnahme in der Amplitude der einzelnen Blaulichtimpulse, zeigte sich ein vergleichbares Bild. Während auch hier die *rdgC^{ΔS}*- und *rdgC^{ΔL}*-Mutanten einen Kurvenverlauf wie im Wildtyp zeigten, war die Abnahme in *rdgC^{ΔSM}*-Mutanten schneller als in wildtypischen Fliegen. Weder die Abnahme der Amplitude noch der Eintritt in das PDA waren so schnell wie in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten. Diese Erkenntnis passte zu der vorherigen Erkenntnis, dass es in den *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen zu einer Hyperphosphorylierung kommt, die allerdings nicht so stark wie in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten ausfällt.

Retinadegeneration in den *rdgC*-Mutanten

Neben der Rolle beim PDA, spielt die Hyperphosphorylierung von Rhodopsin auch eine Rolle bei der Degeneration von Photorezeptorzellen. Diese Degeneration kommt dadurch zustande, dass in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten Rhodopsin und Arrestin2 sehr stabile Komplexe bilden, die nicht mehr abgebaut werden können. Diese Komplexe akkumulieren in den Photorezeptorzellen und initiieren dort die Apoptose dieser Zellen (Alloway et al. 2000). Zum Nachweis der Degeneration wurden mehrere Parameter untersucht.

Ein einfach durchzuführendes, nicht-invasives Experiment ist die Beobachtung der tiefen Pseudopupille im Komplexauge. Dabei handelt es sich um eine virtuelle Überlagerung der Rhabdomere verschiedener Ommatidien. Als Folge der Superposition dieser Rhabdomere wird in einem definierten Abstand ein trapezoidales Muster sichtbar, das dem der Rhabdomere eines Ommatidiums entspricht. Dieses Muster kann mit Hilfe antidromischer Belichtung aufgenommen werden (Franceschini und Kirschfeld, 1971).

Ergebnisse

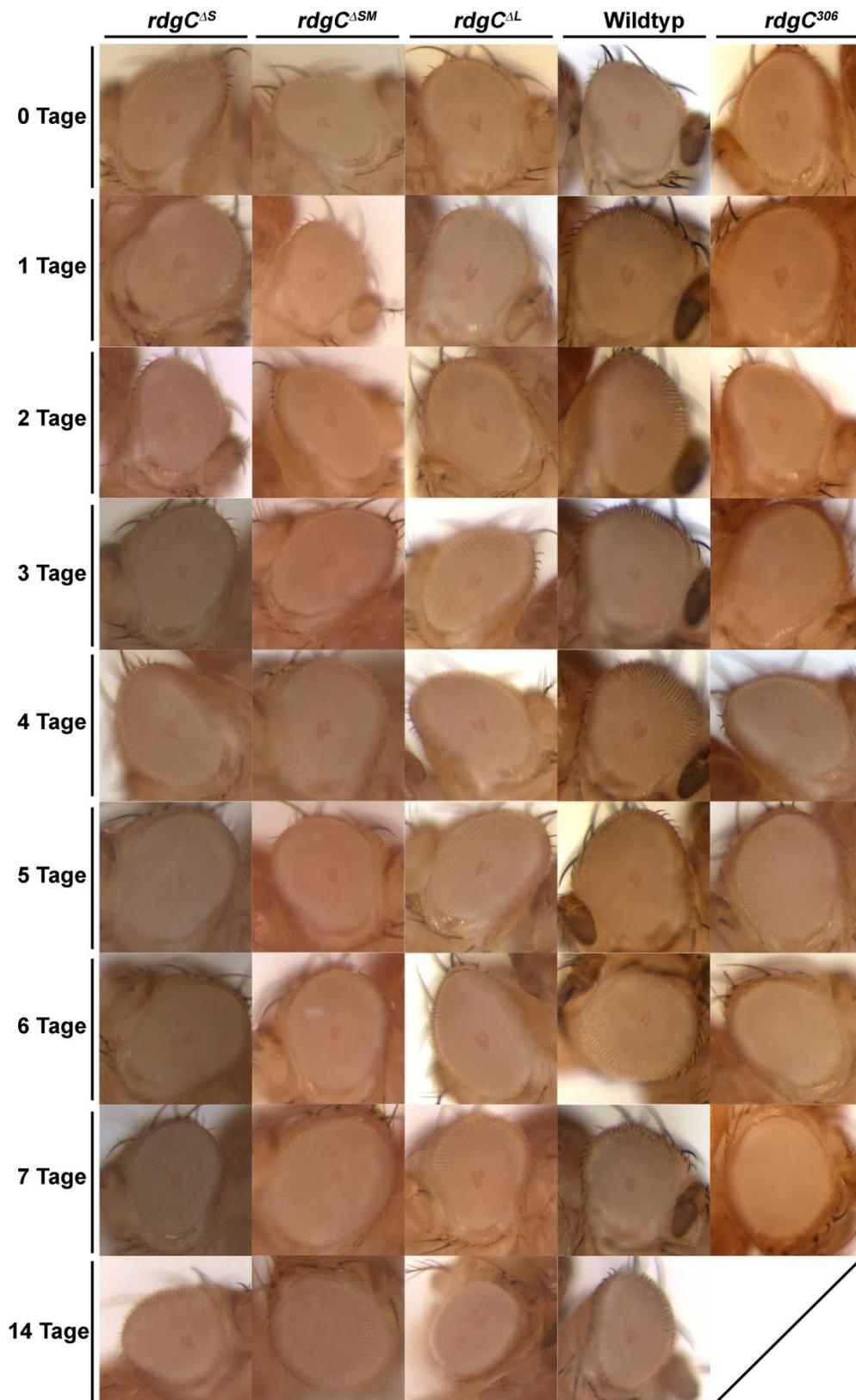


Abbildung 3.40 Untersuchung der tiefen Pseudopupille in den *rdgC*-Mutanten. Alle untersuchten Fliegen wurden bis zum Schlüpfen im Dunkeln gehalten und anschließend für die angegebene Anzahl an Tagen in einem 12 h-hell/dunkel-Zyklus gehalten. Die Detektion der tiefen Pseudopupille erfolgte mit einem Binokular. Es ist beispielhaft je eine Fliege für jeden Genotyp und jeden Zeitpunkt gezeigt.

Ergebnisse

Zum Nachweis der tiefen Pseudopupille wurden die zu untersuchenden Fliegen in einem 12 h-hell/dunkel-Zyklus gehalten. Es wurden für jeden Zeitpunkt mindestens 10 Fliegen auf eine intakte tiefe Pseudopupille untersucht (s. Abbildung 3.40). In allen untersuchten Mutanten war zu Beginn der Untersuchung eine eindeutige Pseudopupille nachweisbar. Während *rdgC³⁰⁶*-Mutanten bereits nach 5 Tagen eine reduzierte Pseudopupille zeigten, war sowohl in Wildtypen als auch in den Mutanten mit verändertem RDGC-Muster in den ersten 7 Tagen kein Verlust der tiefen Pseudopupille sichtbar. Da in den *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen mit dem 4C5-Antikörper eine leichte RH1-Hyperphosphorylierung nachgewiesen wurde, wurde die tiefe Pseudopupille in Wildtypen und den Mutanten für weitere 7 Tage im 12 h-hell/dunkel-Zyklus untersucht. Dabei zeigte keine der Mutanten eine Abweichung zum Wildtyp. Es konnten in allen untersuchten Genotypen nach 14 Tagen vereinzelt Fliegen ohne Pseudopupille gefunden werden. Für jeden Genotyp wurden zu jedem Zeitpunkt mindestens 12 Fliegen im Hinblick auf eine vorhandene tiefe Pseudopupille untersucht (s. Abbildung 3.41)

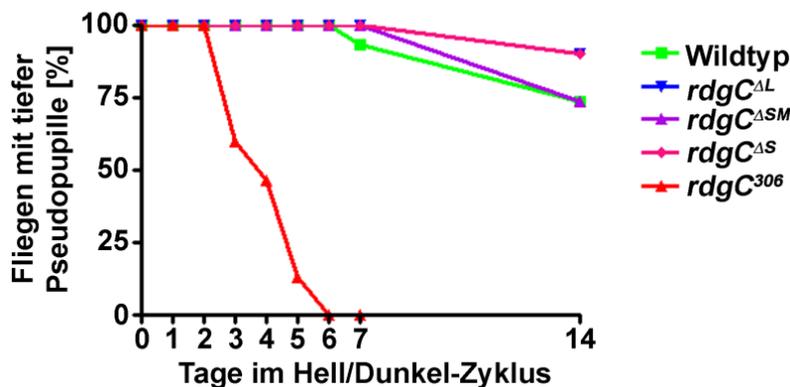


Abbildung 3.41 Quantifizierung der tiefen Pseudopupille in den *rdgC*-Mutanten. Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 12 Fliegen jedes Genotyps untersucht. Es wurden alle bisher untersuchten *rdgC*-Mutanten verwendet. Während sowohl Wildtyp-Fliegen als auch die Mutanten *rdgC^{ΔL}*, *rdgC^{ΔSM}* und *rdgC^{ΔS}* in den ersten sieben Tagen keinen Verlust der tiefen Pseudopupille zeigten, konnte in *rdgC³⁰⁶*-Fliegen bereits nach 6 Tagen keine tiefe Pseudopupille mehr nachgewiesen werden.

Da die tiefe Pseudopupille allein lediglich einen Hinweis auf Degeneration gibt, wurden zusätzlich dazu für dieselben Zeitpunkte wie bei der Pseudopupille Cryoschnitte der unterschiedlichen Mutanten angefertigt und mit Hilfe von Fluoreszenzfärbung analysiert. Dazu wurden die Schnitte mit Phalloidin zur Färbung des F-Aktins in den Rhabdomeren und DAPI zur Färbung der Zellkerne inkubiert und in Abbildung 3.42 dargestellt.

Ergebnisse

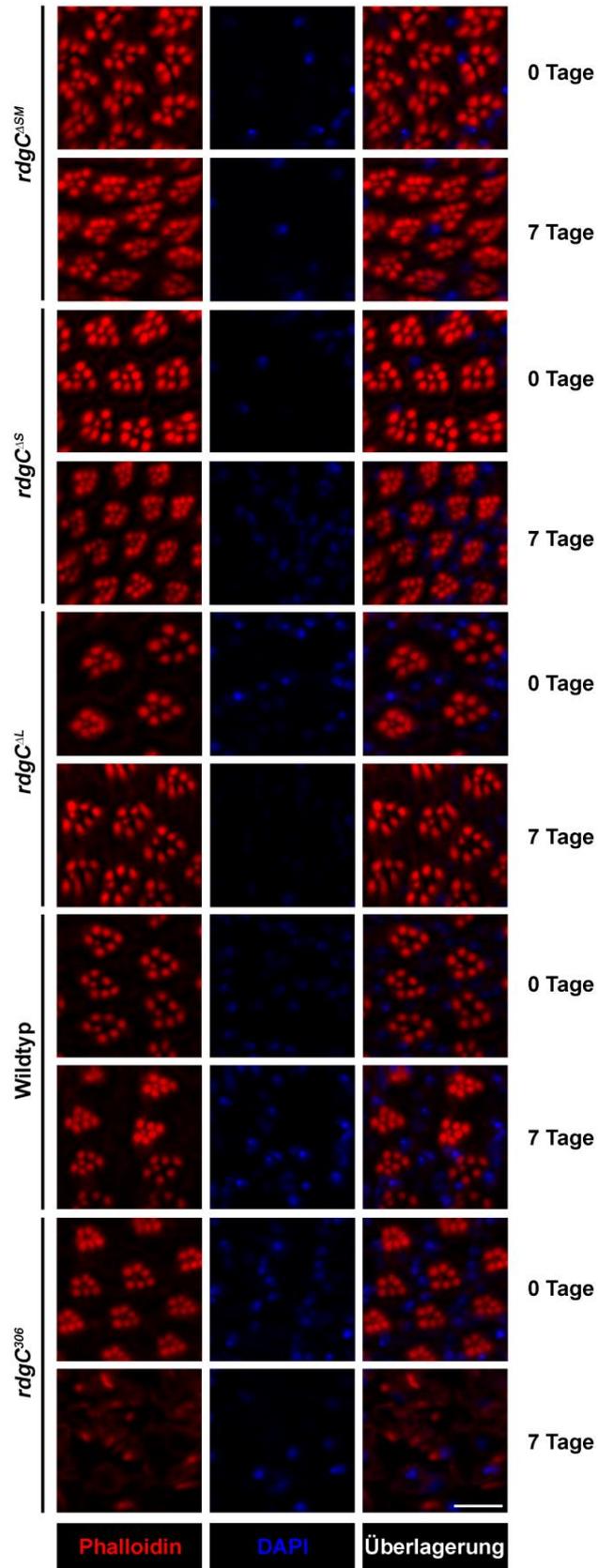


Abbildung 3.42 Nachweis der Degeneration in den *rdgC*-Mutanten über Fluoreszenzfärbung. Die untersuchten Fliegen wurden bis zum Schlüpfen im Dunkeln gehalten und für null oder 7 Tage in einem 12 h-hell/dunkel-Zyklus gehalten. Die Rhabdomere wurden mit Phalloidin (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Ergebnisse

Dabei zeigte sich dasselbe Bild wie bei der Betrachtung der tiefen Pseudopupille in den unterschiedlichen Mutanten. Im Einzelnen bedeutete das, dass in Wildtypen sowohl in frisch geschlüpften Fliegen als auch nach 7 Tagen im 12 h-hell/dunkel-Zyklus die Strukturen erhalten blieben. In den *rdgC³⁰⁶*-Mutanten war nach 7 Tagen keine Rhabdomerstruktur mehr nachweisbar. Sowohl in der *rdgC^{ΔS}*-, der *rdgC^{ΔSM}*- als auch in der *rdgC^{ΔL}*-Mutante konnten keine Anzeichen einer Degeneration gefunden werden. Um auszuschließen, dass es durch die unvollständige Hyperphosphorylierung zu einer langsameren Degeneration der Photorezeptorzellen kommt, wurden in der *rdgC^{ΔSM}*-Mutante wie bei der Untersuchung der tiefen Pseudopupille auch, nach 14 Tagen Cryoschnitte angefertigt und mit Phalloidin und DAPI gefärbt.

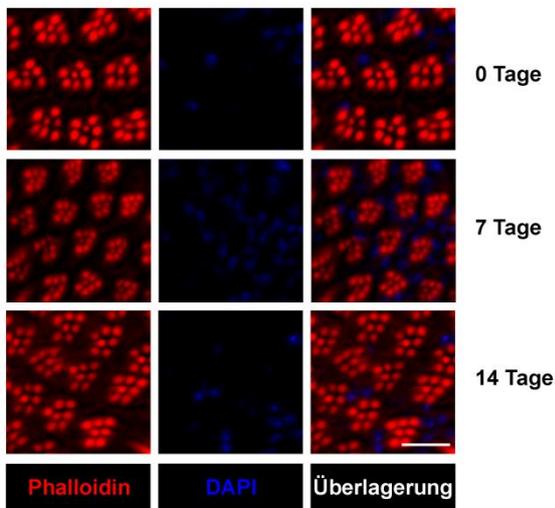


Abbildung 3.43 Fluoreszenzfärbung von Cryoschnitten von *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen nach 0, 7 und 14 Tagen im 12 h-hell/dunkel-Zyklus. Die Rhabdomere wurden mit Phalloidin (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Auch hier zeigten sich keine Anzeichen für eine Degeneration. Die Struktur der Rhabdomere war durchgehend gut erkennbar.

Die Tatsache, dass es in *rdgC^{ΔS}*- und *rdgC^{ΔL}*-Mutanten nicht zu einer Degeneration kommt, deckt sich mit der Erkenntnis, dass es in diesen Fliegen anders als in der *rdgC³⁰⁶*-Mutante nicht zu einer Hyperphosphorylierung des RH1 kommt. Die *rdgC^{ΔSM}*-Mutante zeigte eine milde Hyperphosphorylierung des RH1, in den folgenden Experimenten aber keine Degeneration. Daraus lässt sich schließen, dass die leichte Hyperphosphorylierung nicht ausreicht, um im beobachteten Zeitraum zu einer Degeneration zu führen.

3.3.2 Einfluss von RDGC auf die Dephosphorylierung von TRP

Neben der Rolle in der Dephosphorylierung von RH1 ist seit kürzerem bekannt, dass RDGC auch den Ionenkanal TRP dephosphoryliert (Voolstra et al. 2017; Katz et al. 2017). Dabei spielt RDGC eine besondere Rolle bei der lichtabhängigen Dephosphorylierung der Stelle S936. Während in Wildtypen TRP-S936 im Dunkeln phosphoryliert und nach Belichtung dephosphoryliert vorliegt, kommt es in *rdgC³⁰⁶*-Fliegen lichtunabhängig zu einer konstitutiven Phosphorylierung von S936.

Dephosphorylierung von TRP-pS936 in den unterschiedlichen Mutanten

Im Folgenden sollte der Einfluss der verschiedenen RDGC-Isoformen auf die Dephosphorylierung von TRP-S936 untersucht werden. Dazu wurden Fliegen über Nacht hell bzw. dunkel gehalten und am folgenden Tag für 1 h der entgegengesetzten Lichtbedingung ausgesetzt. Anschließend wurden Proteinextrakte aus den Köpfen hergestellt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Westernblot auf PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit den Antikörpern α -TRP, α -TRP-pS936 und α -RDGC (s. Abbildung 3.44).

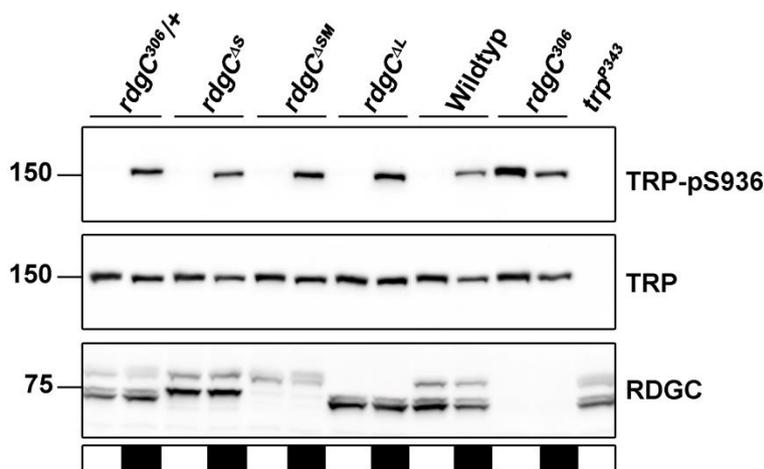


Abbildung 3.44 Phosphorylierung an TRP-S936 in den *rdgC*-Mutanten nach 1 h Belichtung oder Dunkeladaption. Es wurden Fliegen untersucht, die über Nacht dunkel gehalten oder weiß belichtet wurden und im Anschluss für 1 h in der entgegengesetzten Lichtbedingung gehalten wurden. Es wurden je Spur 3 Kopfüquivalente aufgetragen und mit dem α -TRP-pS936-Antikörper inkubiert. Die *rdgC³⁰⁶*-Mutante zeigte als einzige untersuchte Mutante lichtunabhängig ein starkes Signal mit dem α -TRP-pS936-Antikörper während alle anderen untersuchten Fliegen nur nach Inkubation im Dunkeln ein phosphospezifisches Signal zeigten. Der α -TRP- und der α -RDGC-Antikörper wurden als Kontrollen verwendet. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurden links dargestellt.

Während es in den *rdgC³⁰⁶*-Mutanten sowohl im Dunkeln als auch bei Belichtung zu einer starken Phosphorylierung an S936 kam, zeigten die drei Mutanten *rdgC^{ΔS}*, *rdgC^{ΔSM}* und *rdgC^{ΔL}* diesen Phänotyp nicht. In *rdgC^{ΔL}*-Fliegen zeigte sich wie in den *rdgC^{ΔS}*-Fliegen eine starke Phosphorylierung an S936 in dunkel gehaltenen Fliegen. Bei Belichtung konnte keine Phosphorylierung an dieser Stelle nachgewiesen werden. Das Fehlen einer RDGC-Isoform führt nicht dazu, dass die lichtabhängige Dephosphorylierung von TRP an S936 beeinträchtigt wird. In der *rdgC^{ΔSM}*-Fliege, in der der Gesamtgehalt an RDGC stark reduziert war, konnte ebenfalls kein Defekt in der lichtabhängigen Dephosphorylierung festgestellt werden. Das eine

Ergebnisse

Reduktion der absoluten Menge an RDGC nicht dazu führt, dass TRP-S936 im Hellen phosphoryliert vorliegt zeigten auch die Extrakte aus *rdgC³⁰⁶/+-*Fliegen.

Untersuchung der Kinetik der Dephosphorylierung von TRP an der Stelle S936

Ein anderer Aspekt bezüglich der funktionellen Analyse der RDGC ist die Kinetik der Dephosphorylierung des TRP-Kanals. Um einen möglichen Einfluss des Fehlens einer oder mehrerer Isoformen von RDGC auf die Kinetik der Dephosphorylierung zu finden, wurden mit den verschiedenen Mutanten Zeitreihen durchgeführt. Dazu wurden über Nacht dunkel gehaltene Fliegen unterschiedlich langen Lichtimpulsen ausgesetzt. Direkt im Anschluss an die Belichtung wurden die Fliegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wie in 2.16.1 beschrieben zu Extrakten verarbeitet. Die Extrakte wurden parallel auf zwei SDS-Gelen aufgetrennt und nach dem Westernblot mit dem α -TRP oder dem α -TRP-pS936-Antikörper inkubiert.

Anschließend wurde das TRP-S936-Signal auf das TRP-Signal normiert. Um die Zeitreihen der unterschiedlichen Mutanten vergleichen zu können, wurde das Signal im Dunkeln als 100 % festgelegt, und die anderen Zeitpunkte in Relation dazu gesetzt.

Ergebnisse

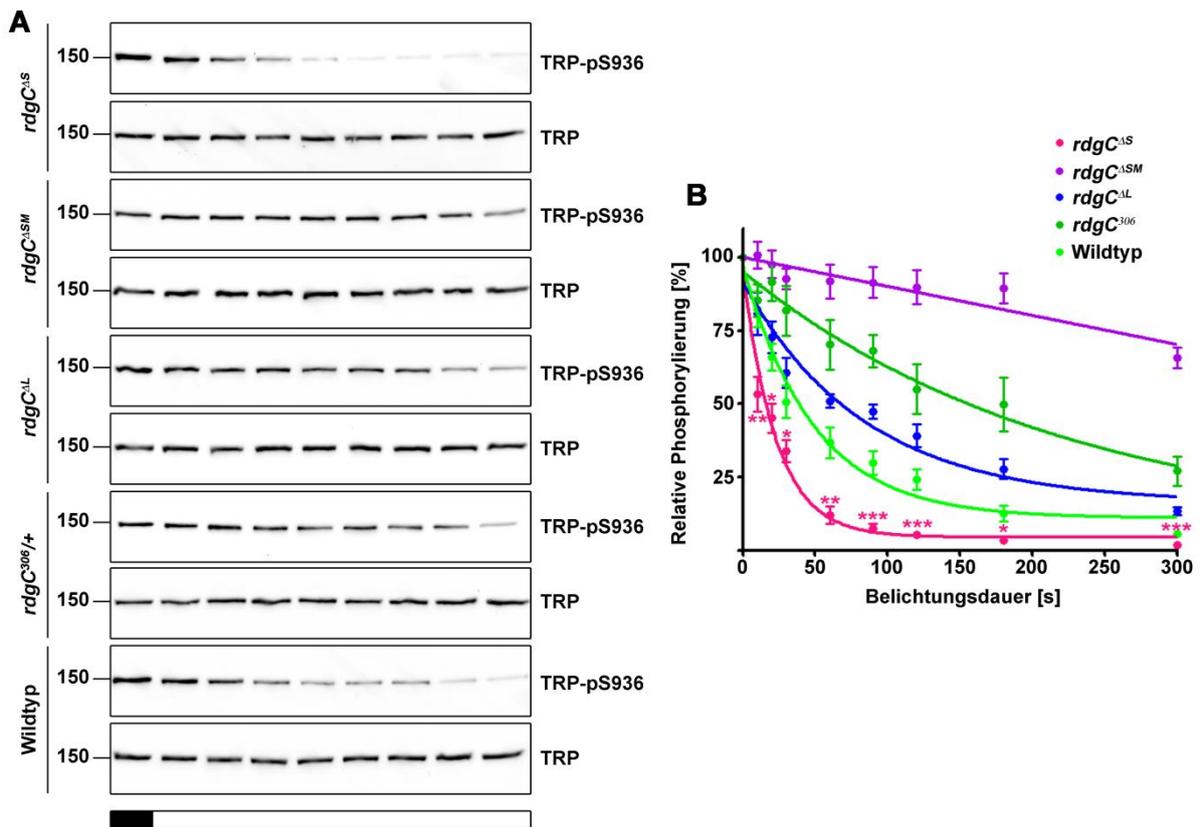


Abbildung 3.45 Kinetik der Dephosphorylierung von TRP an S936 in verschiedenen *rdgC*-Mutanten. A) zeigt exemplarisch für jede untersuchte Mutante einen Westernblot der Zeitreihe. Inkubiert wurde mit dem α -TRP-pS936-Antikörper. Außerdem ist für jeden Genotyp der zugehörige parallel ausgeführte Westernblot mit dem α -TRP-Antikörper für die Normierung des Signals gezeigt. Es wurden je Spur 3 Kopfüquivalente aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers ist links dargestellt. B) zeigt die quantitative Analyse der Experimente aus A), wobei die Mittelwerte aus 5-7 Wiederholungen aufgetragen wurden und für jeden Genotyp eine nicht-lineare Regression angelegt wurde. Fehlerbalken zeigen SEM aus 5-7 Wiederholungen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's T-Test zwischen Wildtyp und *rdgC^{ΔS}* durchgeführt. Dabei gilt $P > 0,05$ n.s., $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ ** und $P < 0,001$ ***.

Wie Abbildung 3.45 zeigt, kommt es in wildtypischen Fliegen innerhalb der 300 sekundigen Belichtung zu einer Reduktion des TRP-pS936-Signals auf ca. 10 % des Ausgangswertes. Fliegen, die nur ein intaktes Allel des *rdgC*-Gens tragen, zeigten hingegen eine verlangsamte Kinetik der Dephosphorylierung und erreichten auch nach 5 min noch 25 % des Ausgangswertes. Die Menge an RDGC hat einen direkten Einfluss auf die Kinetik der Dephosphorylierung. Weniger RDGC bedeutet eine langsamere Dephosphorylierung.

In *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen zeigte sich eine stark verlangsamte Kinetik der Dephosphorylierung von TRP-pS936. In dieser Fliege war der Gesamtgehalt an RDGC auf ca. 20 % des RDGC-Gehalts in Wildtypen reduziert. Da die Kinetik der Dephosphorylierung direkt mit dem Gehalt an RDGC zusammenhängt, ist möglicherweise nicht der Verlust der beiden kleineren Isoformen, sondern die Reduktion des RDGC-Gehalts an sich für die verlangsamte Dephosphorylierung an S936 verantwortlich. Die *rdgC^{ΔL}*-Fliegen zeigten eine leicht verlangsamte Kinetik. Da in diesen Fliegen der Gehalt an RDGC ebenfalls leicht reduziert war (~75 % des Wildtyps), nicht aber in dem Maße wie in *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen, erklärt auch hier die reduzierte RDGC-Menge den leichten Phänotyp.

Ergebnisse

Ein völlig unerwartetes Bild zeigte sich bei der Betrachtung der *rdgC^{Δ5}*-Mutante. Sie zeigte einen signifikant schnelleren Verlauf der Dephosphorylierung als wildtypische Fliegen. Bei einem Blick auf den Gesamtgehalt an RDGC in dieser Mutante zeigte sich, dass dieser mit ca. 85 % nicht größer als in Wildtypen war. Auffällig war allerdings, dass in dieser Mutante die Expression von RDGC-M im Vergleich zu Wildtypen erhöht war (s. Abbildung 3.10). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass RDGC-M *in vivo* eine höhere katalytische Aktivität der Dephosphorylierung von TRP-pS936 aufweist als RDGC-S.

3.3.3 Funktionelle Analyse einer *rh1>rdgC-S*-Fliege

Die *rh1>rdgC-S*-Fliege wurde in den vorangegangenen Untersuchungen nicht mitgeführt. Diese Fliege exprimiert in einem *rdgC*-nullmutanten Hintergrund RDGC-S unter der Kontrolle des *rh1*-Promotors. Da RDGC-S nicht unter seinem nativen Promotor exprimiert wird, kommt es zu einer Überexpression des Proteins im Vergleich zu Wildtyp-Fliegen. Daher wurde diese Fliege im Zuge dieser Arbeit gesondert untersucht.

Um abschätzen zu können, wie stark die Überexpression von RDGC-S in homozygoten und heterozygoten Mutanten ist, wurden Extrakte der Fliegen hergestellt, auf einem 10%-SDS Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und RDGC zuletzt mit dem α -RDGC-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle und für die Normierung wurde TRP ebenfalls detektiert.

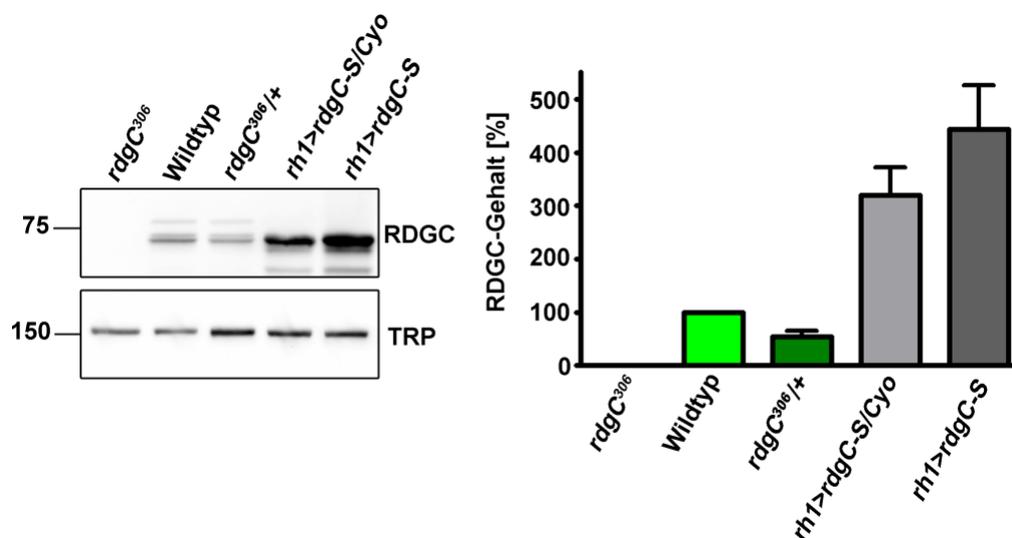


Abbildung 3.46 RDGC-Gehalt in *rh1>rdgC-S*-Fliegen. Neben den zu untersuchenden homozygoten und heterozygoten *rh1>rdgC-S*-Fliegen wurden zur Kontrolle Wildtypen sowie *rdgC³⁰⁶/+* und *rdgC³⁰⁶*-Mutanten mitgeführt. RDGC wurde mit dem α -RDGC-Antikörper und TRP als Ladekontrolle mit dem α -TRP-Antikörper nachgewiesen. Es wurden je 3 Kopfüquivalente pro Spur aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers sind links gezeigt. B) Die Mittelwerte und jeweiligen SEM wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Für eine statistische Auswertung wurden 5-6 Wiederholungen durchgeführt.

Um die Löslichkeit des überexprimierten RDGC-S mit dem nativen RDGC-S vergleichen zu können, wurde untersucht, ob die starke Überexpression von RDGC-S einen Einfluss auf die Lokalisation hat. Dazu wurde sowohl mit den heterozygoten, als auch mit homozygoten

Ergebnisse

Mutanten eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Aufgetrennt wurde auf einem 10 % SDS-Gel und der anschließende Westernblot mit einem α -RDGC-, α -Tubulin- und α -TRP-Antikörper inkubiert.

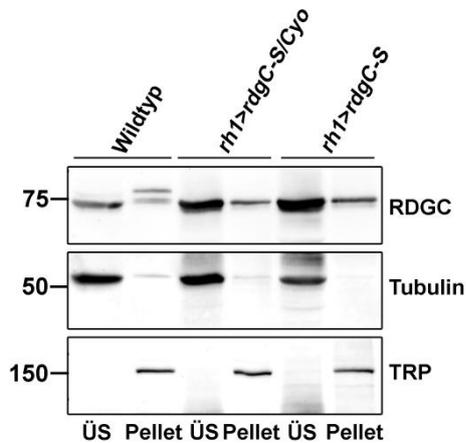


Abbildung 3.47 Subzelluläre Fraktionierung von *rh1>rdgC-S* Fliegen. Es wurden neben den homozygoten *rh1>rdgC-S*-Mutanten auch heterozygote Mutanten und Wildtypen untersucht, um überexprimiertes und natives RDGC zu vergleichen. Als Kontrolle für Membranproteine wurde TRP und als Kontrolle für die löslichen Proteine Tubulin detektiert. Es wurden pro Spur 6 Kopfüquivalente aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurde links gezeigt.

Wie Abbildung 3.47 zeigt, war RDGC-S in beiden Mutanten, wie in der wildtypischen Kontrolle auch vermehrt in der löslichen Fraktion zu finden. Da sowohl die heterozygote als auch die homozygote Expression von *rh1>rdgC* im nullmutanten Hintergrund stattfindet, wird in diesen Fliegen weder RDGC-M noch RDGC-L exprimiert.

RDG-M und -L konnten in der Kontrolle in Wildtyp-Fliegen in der löslichen Fraktion kaum nachgewiesen werden. Grund dafür war, dass das RDGC-Signal in den *rh1>rdgC*-Fliegen so stark war, dass der schwache Anteil an RDGC-M und -L im Überstand nicht sichtbar gemacht werden konnte ohne das Signal in den transgenen Fliegen zu übersättigen. Tubulin als Kontrolle für die löslichen Proteine war nur im Überstand zu finden, wohingegen TRP als membrangebundenes Protein nur in der Pelletfraktion detektierbar war. Die Überexpression scheint also keinen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation zu haben.

Eine etwaige Retinadegeneration in *rh1>rdgC-S*-Fliegen wurde mit Hilfe von Cryoschnitten und Fluoreszenzfärbungen mit Phalloidin und DAPI untersucht. Dazu wurden dunkel geschlüpfte Fliegen direkt nach dem Schlüpfen und nach 7 Tagen in einem 12 h-hell/dunkel-Zyklus untersucht. Neben den im weiteren Verlauf verwendeten heterozygoten Mutanten wurden auch die homozygoten Fliegen im Hinblick auf die Degeneration mitgeführt.

Wie Abbildung 3.48 zeigt, war die Rhabdomerstruktur in der homozygoten sowie in der heterozygoten Mutante sowohl in frisch geschlüpfen Fliegen als auch nach 7 Tagen im hell/dunkel-Zyklus intakt. Es lag kein Hinweis auf eine Degeneration vor. Somit lässt sich die Retinadegeneration, die durch den Verlust von RDGC hervorgerufen wird, durch die photorezeptorspezifische Expression von RDGC-S alleine retten.

Ergebnisse

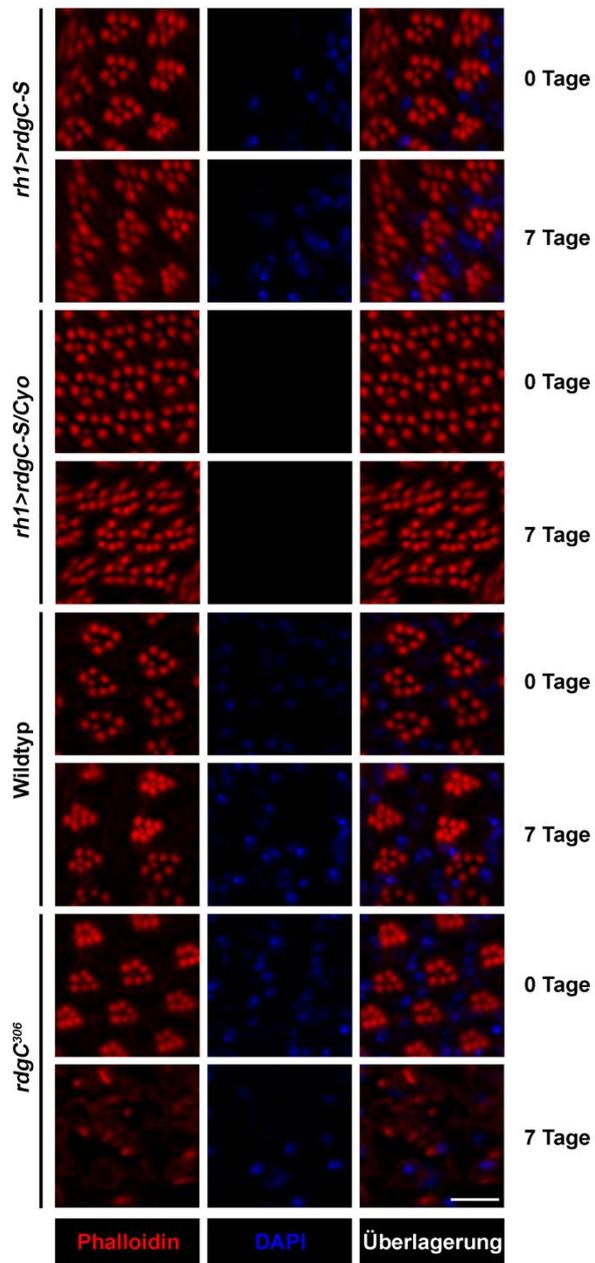


Abbildung 3.48 Analyse der Degeneration nach 0 und 7 Tagen im hell/dunkel-Zyklus durch Fluoreszenzfärbung von Cryoschnitten in *rh1>rdgC-S*-Fliegen. Es wurden 0 und 7 Tage im 12 h-hell/dunkel-Zyklus gehaltene Fliegen untersucht. Die Rhabdomere wurden mit Phalloidin (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Neben der funktionellen Analyse im Zusammenhang mit der Dephosphorylierung von RH1 wurde in den *rh1>rdgC-S*-Fliegen die Dephosphorylierung von TRP nach einer Stunde Belichtung oder Dunkelheit untersucht (s. Abbildung 3.49)

Ergebnisse

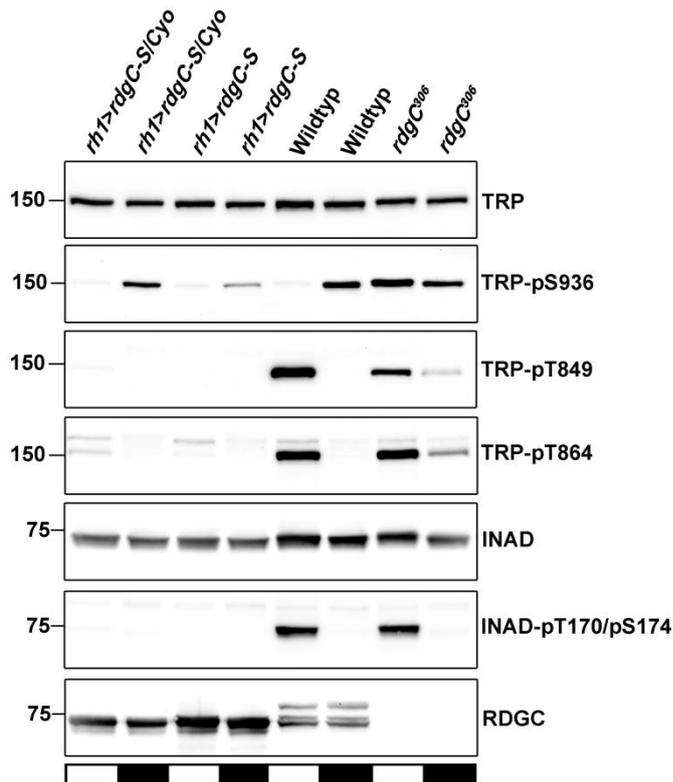


Abbildung 3.49 Lichtabhängige Dephosphorylierung von TRP und INAD in *rh1>rdgC-S* Fliegen. Es wurden jeweils 3 Kopfüquivalente von jedem Genotyp aufgetragen. Neben der Dephosphorylierung an der RDGC-spezifischen Stelle TRP-pS936 wurde auch die lichtabhängige Dephosphorylierung der Stellen TRP-pT849 und TRP-p864 sowie die INAD-Phosphorylierungsstellen INAD-pT170/pS174 untersucht. Während die *rdgC³⁰⁶*-Mutante nur an der Stelle TRP-S936 vom Wildtyp abweicht, indem lichtunabhängig nicht dephosphoryliert wird, führt die Überexpression von RDGC-S zu einer Dephosphorylierung an allen untersuchten TRP-Phosphorylierungsstellen. Die Überexpression führt außerdem sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten Fliegen dazu, dass INAD, welches gar kein Substrat der RDGC ist, lichtunabhängig dephosphoryliert wird. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers ist links gezeigt.

Das Gesamt-TRP-Signal war in den homo- sowie heterozygoten *rh1>rdgC* vergleichbar mit dem in Wildtypen oder auch in *rdgC³⁰⁶*. In Wildtyp-Fliegen lag TRP-S936 erwartungsgemäß im Dunkeln phosphoryliert und im Hellen dephosphoryliert vor. Im Gegensatz dazu lag in *rdgC³⁰⁶*-Fliegen auch im Hellen eine Phosphorylierung an TRP-S936 vor.

Während bei den *rh1>rdgC-S* Fliegen an der Stelle TRP-S936 sowohl im Dunkeln als auch bei Belichtung kein Signal detektierbar war, zeigten transgene Fliegen, die nur ein Allel besaßen (*rh1>rdgC/Cyo*) im dunklen Zustand ein schwaches Signal. Da die Dephosphorylierung in diesen Mutanten so stark und auch nur eingeschränkt lichtabhängig war, wurden andere bekannte Phosphorylierungsstellen zusätzlich untersucht. Für die Phosphorylierungsstellen T864 und T849 der TRP-Kanals war ein phosphospezifischer Antikörper vorhanden (Voolstra et al., 2013), weswegen diese Stellen untersucht wurden. Wie in Wildtypen zu sehen war, werden diese beiden Stellen im Hellen phosphoryliert und im Dunkeln dephosphoryliert, was auch in *rdgC³⁰⁶*-Mutanten der Fall war. Für die *rh1>rdgC-S* Fliegen konnte bereits bei nur einem Allel (*rh1>rdgC-S/Cyo*) weder im Hellen noch im Dunkeln eine Phosphorylierung an diesen beiden Stellen des TRP-Kanals nachgewiesen werden. Die Überexpression von RDGC-S führte dazu, dass es zu einer unspezifischen Dephosphorylierung kam. Selbst die

Ergebnisse

Phosphorylierungsstellen T170/S174 in INAD, die normalerweise nicht durch RDGC dephosphoryliert werden, lagen sowohl im Hellen als auch im Dunkeln dephosphoryliert vor.

Da heterozygote *rh1>rdgC-S*-Fliegen (*rh1>rdgC-S/Cyo*) nach einstündiger Dunkeladaptation eine gewisse Phosphorylierung von TRP-S936 zeigten, wurde in diesen Fliegen die Kinetik der Dephosphorylierung an TRP-S936 untersucht. Um die Kinetik der Mutanten mit der im Wildtyp vergleichen zu können, wurden Start- und Endpunkt der Zeitreihen verglichen (s. Abbildung 3.50).

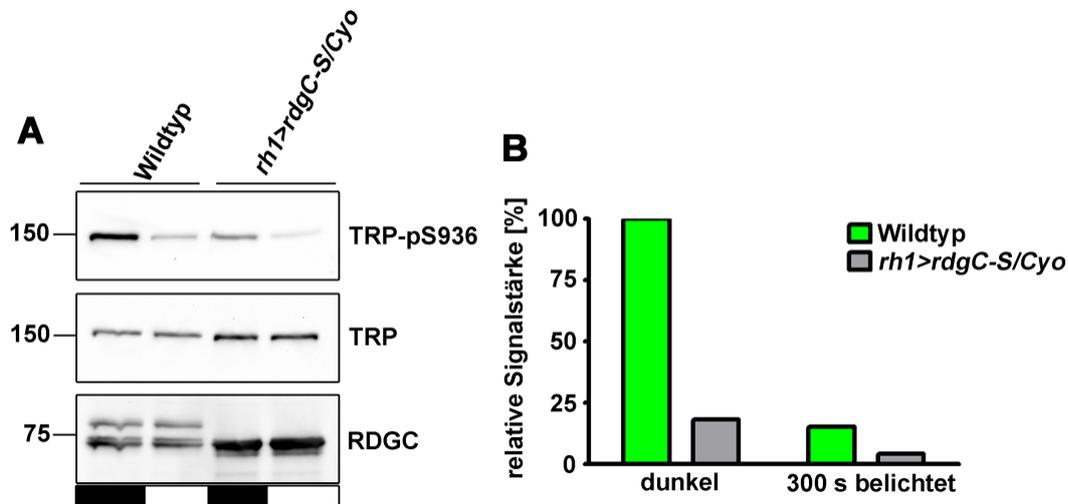


Abbildung 3.50 Vergleich der Phosphorylierung von TRP-S936 nach bestimmten Zeitpunkten. A) zeigt den Westernblot aus Extrakten von Wildtypen und *rh1>rdgC-S/Cyo* Fliegen nach Inkubation im Dunkeln (schwarzer Balken) und mit anschließender Belichtung für 5 min (weißer Balken). Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers wurde links dargestellt. B) Es wurde das Signal des α -TRP-pS936-Antikörpers auf das entsprechende α -TRP Signal normiert. Das Signal dunkel gehaltener Wildtypen wurde als 100 % festgelegt und die anderen normierten Werte dazu in Relation gesetzt.

Es zeigte sich in den Mutanten sowohl im Dunkeln (18 % des Signals im Wildtyp) als auch nach 5 minütiger Belichtung (26 % des Signals im Wildtyp) ein deutlich schwächeres Signal. Dennoch wurde die Kinetik der Dephosphorylierung innerhalb von 5 min untersucht (s. Abbildung 3.51 A).

Ergebnisse

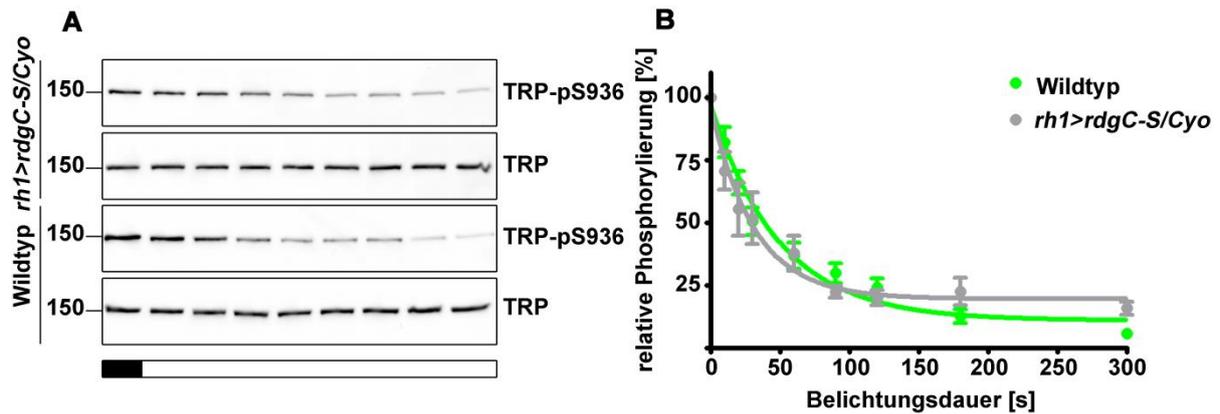


Abbildung 3.51 Kinetik der Dephosphorylierung von TRP an der Stelle S936 in Wildtypen und *rh1>rdgC-S/Cyo*-Fliegen. A) zeigt exemplarisch für die untersuchte Mutante und den Wildtyp einen Westernblot inkubiert mit dem α -TRP-pS936-Antikörper sowie den zugehörigen parallel ausgeführten Westernblot mit dem α -TRP-Antikörper für die Normierung des Signals. Es wurden je Spur 3 Kopfüquivalente aufgetragen. Größe (in kDa) und Position des molekularen Größenmarkers ist links gezeigt. B) zeigt die quantitative Analyse der Experimente aus A), wobei die Mittelwerte aus 5-6 Wiederholungen aufgetragen wurden und für jeden Genotyp eine nicht-lineare Regression angelegt wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der unterschiedlichen Zeitpunkte.

Um eine Aussage über die Kinetik treffen zu können, wurde für den Wildtyp und die *rh1>rdgC-S/Cyo*-Fliegen das Signal im Dunkeln als 100 % festgelegt und die Mittelwerte der restlichen Zeitpunkte dazu in Relation gesetzt (s. Abbildung 3.51 B). Es wurden 5-6 Wiederholungen der Zeitreihe durchgeführt. Obwohl RDGC-S überexprimiert wird, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kinetik von Wildtyp und transgenen Fliegen. Im Vergleich dazu konnten Fliegen, die RDGC-M überexprimieren eine schnellere Dephosphorylierungskinetik aufweisen. Dieses Ergebnis passt zu den bisherigen Erkenntnissen, dass RDGC-M eine höhere katalytische Aktivität für die Dephosphorylierung von TRP-S936 hat als RDGC-S.

4 Diskussion

4.1 Drei Isoformen von RDGC

In *Drosophila melanogaster* codiert das Gen *rdgC* für die Phosphatase „retinal degeneration C“. Dieses Gen wird in vier unterschiedliche mRNA-Varianten transkribiert (s. Abbildung 1.5). Bislang war bekannt, dass drei dieser mRNA-Varianten für ein 84,9 kDa großes Protein codieren, während die vierte mRNA-Variante (*rdgC-RB*) für ein kleineres 75,5 kDa großes Protein codiert (Flybase). Eine Überprüfung von wildtypischem RDGC per Westernblot-Analyse und Nachweis mit einem α -RDGC-Antikörper zeigte bereits in der Literatur, dass neben den beiden erwarteten Proteinbanden ein drittes RDGC-Protein existiert (Lee und Montell 2001). Die Herkunft der dritten RDGC-Isoform war bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit wurden die drei Isoformen ihrer Größe entsprechend als RDGC-L, RDGC-M und RDGC-S bezeichnet. Es zeigte sich, dass *rdgC-M* und *rdgC-S* eine gemeinsame Startstelle für die Transkription nutzen. *RdgC-L* besitzt zwei Transkriptionsstartstellen (TSS), die beide 5' der TSS von *rdgC-S* und *rdgC-M* liegen.

Aus der Literatur (Steele und O'Tousa 1990) war bekannt, dass RDGC neben der Expression in den Komplexaugen und den Ozellen auch in den Pilzkörpern im Gehirn von *Drosophila melanogaster* RDGC exprimiert wird. Die Untersuchung der gewebespezifischen Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen zeigte, dass RDGC-S und RDGC-M weitestgehend spezifisch in den Augen exprimiert werden. Im Gegensatz dazu lässt sich RDGC-L sowohl im Auge als auch im verbliebenen Kopfgewebe nachweisen. Die TSS von *rdgC-S* und *rdgC-M* scheint also vorwiegend in den Augen exprimiert zu werden, während es für die unterschiedliche Lokalisation von RDGC-L die beiden TSS benötigt. Eine TSS ist möglicherweise für die Expression im Auge und die andere für die Expression in den Pilzkörpern verantwortlich. Um diese Annahme zu bestätigen müsste der 5'-Bereich der mRNA in den Augen sowie in den Pilzkörpern sequenziert werden.

Da RDGC-S und RDGC-M dieselbe TSS nutzen, entsteht für beide Isoformen eine einzige Vorläufer-mRNA. Aufgrund von alternativem Spleißen entstehen daraus die beiden Protein-Isoformen. Um die reife *rdgC-M* mRNA zu generieren, wird das erste Exon so in das zweite Exon gespleißt, dass das Startcodon für *rdgC-S* entfernt wird. Für *rdgC-S* kommt es zu einem alternativen Spleißen, bei dem RDGC-M nicht translatiert werden kann, da es dort nach 22 Aminosäuren zu einem Stopcodon kommt. Für die *rdgC-M* mRNA wird im ersten Exon die Spleißdonorstelle GU verwendet, während für die Generierung der reifen *rdgC-S* mRNA die alternative Spleißdonorstelle GC genutzt wird. GU ist eine besonders häufig verwendete Spleißdonorstelle (Stryer 1990), wohingegen GC eine selten genutzte Stelle ist, die im humanen Genom zu weniger als 1 % auftritt (Bursat et al. 2001). Die Spleißakzeptorstelle ist in beiden Fällen AG. Da es bei der Verwendung von GC als Donorstelle häufig zu einer Fehlpaarung zwischen der Base C und A anstelle der Base U mit A kommt, werden Proteine, die aus solchen mRNAs entstehen häufig schwach exprimiert (Thanaraj und Clark 2001). Im

Fall der RNA der kurzen und mittleren *rdgC*-Varianten ist dies jedoch nicht der Fall. Die Analyse der mRNA durch Kolonie-PCR zeigt, dass in wildtypischen Fliegen mehr *rdgC-S* mRNA als *rdgC-M* mRNA gebildet wird. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch im Expressionsmuster auf Proteinebene wieder, da unter wildtypischen Bedingungen deutlich mehr RDGC-S als RDGC-M exprimiert wird.

Im 5'-Bereich von *rdgC-RB* wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems eine 21 Bp große Deletion eingeführt. Diese Fliege wurde als *rdgC^{ΔS}* bezeichnet. Aufgrund dieser Deletion wurde sowohl das erste Exon als auch die Spleißdonorstelle von *rdgC-S* zerstört, weswegen kein RDGC-S exprimiert wurde. In Folge des fehlenden RDGC-S wurde in dieser Fliege deutlich mehr RDGC-M als in Wildtyp-Fliegen exprimiert. Diese Erkenntnis deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von RDGC-S und RDGC-M hin. Dadurch, dass keine *rdgC-S* mRNA gespleißt wird, wird möglicherweise die gesamte Vorläufer-mRNA in *rdgC-M* mRNA prozessiert. Dadurch, dass mehr *rdgC-M* mRNA als in Wildtyp-Fliegen transkribiert wird, kommt es zu einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Expression an RDGC-M.

Bei den beiden RDGC-Homologen im Menschen, PPEF1 und PPEF2 kommt es zu einem ähnlichen Phänomen. Über alternatives Spleißen werden aus PPEF1 fünf Transkripte und aus PPEF2 zwei Transkripte generiert. Alle daraus resultierenden Proteine besitzen sowohl eine katalytische Domäne als auch EF-Hände.

4.2 RDGC-M und -L sind über Palmitoylierungen in der Membran verankert

Die mit Hilfe eines Computerprogramms (NBA-Palm) vorhergesagten Palmitoylierungen an RDGC-M und RDGC-L konnten sowohl durch die Untersuchung in S2-Zellen (s. Abbildung 3.26) als auch direkt in *Drosophila melanogaster* (s. Abbildung 3.29) gezeigt werden. Für die S2-Zellen konnte immunocytochemisch gezeigt werden, dass die wildtypischen Isoformen RDGC-M und RDGC-L in der Plasmamembran verankert sind. Die Mutagenese potentieller Palmitoylierungsstellen in den N-Termini wurden so mutiert, dass eine Palmitoylierung nicht mehr möglich war. Diese mutierten Varianten konnten bei der immunocytochemischen Analyse über die gesamte Zelle im Cytosol nachgewiesen werden. In den Fliegen wurde die Palmitoylierung über ein Acyl-Biotin-Exchange Experiment nachgewiesen. Dabei wurden zunächst freie Cysteine blockiert, die Palmitoylierungen entfernt und anschließend mit Biotin markiert. Für RDGC-L konnte so eindeutig eine Palmitoylierung gezeigt werden. Da RDGC-M und RDGC-S auf Grund ihres ähnlichen Laufverhaltens nicht eindeutig voneinander getrennt werden können, ist nicht klar ob die zweite nachgewiesene Bande bei der eine Palmitoylierung gefunden wurde RDGC-M oder RDGC-S entspricht. Auf Grund der Erkenntnisse aus der Untersuchung in S2 Zellen liegt die Vermutung nahe, dass es sich um RDGC-M handelt. Während RDGC-M und RDGC-L so über angeheftete Palmitoylierungsanker in der Membran verankert werden, wird RDGC-S nicht palmitoyliert und ist im Cytosol lokalisiert.

Die Membranverankerung über post-translational angefügte Fettsäure-Acylierung im N-terminus wurde bereits für andere PPEFs gezeigt. In *Caenorhabditis elegans* konnte eine PPEF

(CePPEF) nachgewiesen werden, die über eine Myristoylierung an Gly2 sowie eine Palmitoylierung an Cys3 in der Membran verankert ist (Ramulu und Nathans 2001). Wird CePPEF in Zellkultur (293-Zellen) exprimiert, führt die Mutation der Palmitoylierungs- oder Myristoylierungsstelle genauso wie die Mutation beider Stellen dazu, dass das zuvor in der Membran lokalisierte Protein im Cytoplasma lokalisiert war. Die Isolierung von PPEFs verschiedener Kinetoplastea (*Leishmania major* und *Trypanosoma brucei*) zeigte ebenfalls eine Acylierung des N-Terminus (Mills et al. 2007). Dabei kommt es sowohl zur Myristoylierung als auch zur Palmitoylierung. Für LmPPEF wurde gezeigt, dass die Mutation von Gly2 zu Alanin eine Myristoylierung und die Mutation von Cys3 zu Serin eine Palmitoylierung verhindert. Die Mutation der beiden Acylierungsstellen führt zu einer Änderung der Lokalisation aus der Membran hin zum Cytosol (Mills et al. 2007).

Untersucht man die Sequenz der humanen PPEF1 mit Hilfe des Vorhersageprogramms NBA-PALM, wird auch dort eine potentielle Palmitoylierung an Cys3 vorhergesagt. Zudem wird eine Myristoylierung an Gly2 sowohl in PPEF1 und PPEF2 (human) vorausgesagt. Obwohl für keine der PPEF1-Isoformen eine subzelluläre Lokalisation untersucht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier die Fettsäure-Acylierung für eine Membranverankerung verantwortlich sein könnte.

Es scheint so, als ob die Acylierung des N-Terminus zur Verankerung in der Membran ein typisches Prinzip für die Klasse der PPEFs ist. Wie die Analyse der RDGC-Isoformen zeigt, ist eine Palmitoylierung aber nicht für alle Isoformen zwingend notwendig.

4.3 Lokalisation der unterschiedlichen RDGC-Varianten.

Es war bereits aus der Literatur bekannt, dass RDGC-L auch in Fliegen ohne Augen (*sine oculis1*) zu finden ist, während die beiden kleineren Varianten, die hier als RDGC-S und -M bezeichnet wurden, in diesen Fliegen nicht zu finden sind (Lee und Montell 2001). Dieses Erkenntnis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es wurde zudem bereits gezeigt, dass RDGC in den Pilzkörpern, den Ozellen und der Retina von *Drosophila melanogaster* exprimiert wird (Steele et al. 1992).

Die genaue Lokalisation in den Sehzellen wurde bislang nicht gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in den Rhabdomeren als auch im Cytoplasma ein RDGC-Signal nachgewiesen werden. In den vorherigen Experimenten konnte für RDGC-M und RDGC-L eine Membranassoziation über einen Palmitoylierungsanker nachgewiesen werden. Es lag daher die Vermutung nahe, dass diese beiden Isoformen in den Membranen der Rhabdomere lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu ist RDGC-S löslich und daher vermutlich für das Signal im Zellkörper verantwortlich. Da RDGC-S an der Dephosphorylierung von RH1 und TRP beteiligt ist, muss es zumindest anteilig in den Rhabdomeren lokalisiert sein. Es gibt in den Rhabdomeren auch einen Anteil an löslichen Proteinen, weswegen es sein kann, dass ein Teil des Signals in den Rhabdomeren ebenfalls von RDGC-S kommt. Dies ist bereits für andere lösliche Proteine bekannt. Die visuellen Arrestine zeigen beispielsweise ein solches Verhalten

(Kiselev et al. 2000) bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation. Arrestin2 ist im Dunkeln nicht in der Membranfraktion zu finden. Das entsprechende Signal wird hauptsächlich im Cytosol nachgewiesen, wobei ein Teil auch in den Rhabdomeren sichtbar ist. Dadurch wird nachgewiesen, dass lösliche Proteine auch in den Rhabdomern ein Signal aufweisen können.

Eine subzelluläre Fraktionierung der unterschiedlichen RDGC-Isoformen zeigte keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Isoformen zu den löslichen oder den membrangebundenen Proteinen. Es zeigte sich allerdings, dass RDGC-S eher löslich war während RDGC-M und -L eher mit der Membran assoziiert waren. Diese Erkenntnis passt zu den Ergebnissen aus der immunocytochemischen Analyse der Sehzellen. Um RH1 und TRP dephosphorylieren zu können, muss RDGC in den Rhabdomeren lokalisiert sein. Der Anteil im Zellkörper unterliegt möglicherweise dem Abbau oder dem Recycling und wird dazu aus der Membran gelöst. Hierbei handelt es sich allerdings lediglich um eine Hypothese, die nicht bewiesen werden konnte.

4.4 Rekombinant exprimiertes RDGC zur Untersuchung der katalytischen Aktivität

Für die Untersuchung der katalytischen Aktivität von RDGC wurden exemplarisch für eine lösliche und eine membrangebundene Variante RDGC-S und RDGC-L in Sf9-Zellen überexprimiert. RDGC wurde bereits in Sf9-Zellen exprimiert (Lee und Montell 2001), wobei nicht klar ist, welche der Isoformen exprimiert wurde.

Bei der Aufreinigung der beiden Isoformen konnten distinkte Banden auf der entsprechenden Höhe, allerdings mit relativ viel Hintergrund, gefunden werden. Der Hintergrund entsprach dem Bandenmuster, das bei der Aufreinigung von untransfizierten Zellen gefunden wurde.

Bei der Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford wurde für die Extrakte der transfizierten sowie der untransfizierten Sf9-Zellen ein ähnlicher Gehalt festgestellt.

Die Überprüfung der Aktivität der rekombinanten Proteine erfolgte mit einem Phosphatase-Assay. Dabei wurde derselbe Puffer wie bei Lee und Montell (2001) verwendet. Diese konnten im Zuge ihrer Arbeit eine unterschiedliche Aktivität zwischen wildtypischem und mutiertem rekombinant exprimiertem RDGC innerhalb von einer Stunde zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine λ -Phosphatase als Positivkontrolle und ein Ansatz ohne Enzym als Negativkontrolle mitgeführt. Die λ -Phosphatase zeigte eine starke Aktivität nach einer Stunde, wohingegen kein anderer Ansatz eine Aktivität aufwies. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 16 h zeigte bei beiden rekombinant exprimierten Isoformen eine schwache Aktivität. Dieselbe Aktivität konnte allerdings auch in den Extrakten aus untransfizierten Sf9-Zellen nachgewiesen werden und war daher vermutlich auf die Aktivität einer unspezifisch mitpräzipitierten Phosphatase zuzuordnen.

Die von Lee und Montell (2001) beschriebene Aktivität wurde lediglich als Relation zwischen zwei rekombinant exprimierten Proteinen, nicht aber als absolute Aktivität angegeben. Außerdem wurden weder eine Negativ- noch eine Positivkontrolle mitgeführt. Da pNPP ein unspezifisches Substrat für Phosphatasen ist, könnte die von Lee und Montell (2001) gemessene Aktivität ebenfalls auf unspezifisch mitpräzipitierte Phosphatasen zurückzuführen sein.

Da keines der rekombinant exprimierten Proteine aktiv war, konnten keine Untersuchungen im Hinblick auf Substratspezifität und Enzymkinetik durchgeführt werden.

4.5 Identifikation von drei C-terminalen Phosphorylierungsstellen in RH1

Bei Belichtung mit blauem Licht, wird in *Drosophila melanogaster* die größtmögliche Menge an Metarhodopsin im Vergleich zu Rhodopsin generiert (Ostroy und Pak 1974). Obwohl bereits seit langem bekannt ist, dass die Phosphorylierung von RH1 im C-Terminus stattfindet (Vinòs et al., 1997), konnten die genauen Phosphorylierungsstellen noch nicht ermittelt werden. Bei der Untersuchung einer Fliege, deren RH1 C-terminal trunziert ist (*Rh1^{Δ356}*) konnte keine Phosphorylierung im Rhodopsin nachgewiesen werden. In dieser Fliege wurden die letzten 18 Aminosäuren und damit alle potentiellen Phosphorylierungsstellen entfernt. In Folge dieser Erkenntnis wurde eine Fliege generiert, in der die fünf C-terminalen Serine (357, 358, 362, 367 und 371) zu Alanin sowie das Threonin (365) zu Valin mutiert wurden (Kiselev et al. 2000). In dieser Fliege ist eine Phosphorylierung nicht mehr möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in blau belichteten Fliegen drei Stellen im C-Terminus von Rhodopsin 1 phosphoryliert vorliegen.

Alle drei Phosphorylierungsstellen wurden in Peptiden gefunden, die mit einer 100 %igen Sequenzabdeckung dem RH1 zugeordnet werden konnten. Für die beiden Stellen S362 und T365 konnte eindeutig über die γ - und die β -Serie des Fragmentierungsspektrums eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese beiden Serien zeigen die Fragmente des untersuchten Peptids einmal von N-Terminus (β -Serie) und vom C-Terminus (γ -Serie) an. Je mehr Teile einer Serie im Fragmentierungsspektrum gefunden werden, desto eindeutiger ist die Zuordnung zum untersuchten Peptid.

Bei der Stelle S358 konnte bei der Fragmentierung die Phosphorylierungsstelle nur in einem Fragment der γ -Serie gefunden werden. Da in dem Fragmentierungsspektrum die gefundenen Peaks eindeutig den entsprechenden Serien zugeordnet werden konnten, war die Stelle dennoch gut als Phosphorylierungsstelle nachweisbar.

Somit konnte in Wildtyp Fliegen bei Belichtung mit Blaulicht eine Phosphorylierung an den drei C-terminalen Stellen S358, S362 und T365 nachgewiesen werden.

4.6 Hyperphosphorylierung von RH1 und Retinadegeneration

In den *rdgC*-Nullmutanten kommt es aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung durch RDGC zu einer Hyperphosphorylierung von RH1 (Vinós et al. 1997). Dabei ist bislang nicht klar, ob die Hyperphosphorylierung dadurch zustande kommt, dass in mehr RH1-Molekülen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Phosphorylierungsstellen S358, S362 und T365 phosphoryliert sind oder ob zusätzliche Stellen phosphoryliert werden. Als weitere Stellen kommen S357, S387 und S371 in Frage. In einer Masterarbeit an diesem Institut (Banjuk 2014) konnten die zusätzlichen Stellen S357 und S367 in blau belichteten *rdgC³⁰⁶*-Mutanten gefunden werden. Allerdings waren die zugehörigen Fragmentierungsspektren der massenspektrometrischen Analyse nicht eindeutig. Die Vermutung liegt aber nahe, dass die Hyperphosphorylierung von RH1 in *rdgC*-Nullmutanten eher auf die Verwendung zusätzlicher Phosphorylierungsstellen zurückzuführen ist.

Für den Nachweis der Hyperphosphorylierung von RH1 wurde der kommerziell erhältliche 4C5-Antikörper verwendet. Dieser erkennt sowohl das unphosphorylierte RH1 in Extrakten aus dunkel gehaltenen *rdgC³⁰⁶*-Mutanten als auch das phosphorylierte RH1 in belichteten Wildtypen. In belichteten *rdgC³⁰⁶*-Mutanten, in denen RH1 wie bereits beschrieben hyperphosphoryliert vorliegt detektiert der 4C5-Antikörper kein Signal. Der Grund für die Selektivität gegenüber hyperphosphoryliertem RH1 ist wahrscheinlich eine sterische Hinderung, da die zusätzlichen phosphorylierten Stellen das Epitop des Antikörpers blockieren.

Es zeigte sich bei der Untersuchung der RH1-Hyperphosphorylierung in Mutanten mit unterschiedlicher RDGC-Zusammensetzung, dass RDGC-L nicht zwingend notwendig für die Dephosphorylierung von RH1 ist. In der *rdgC^{4L}*-Fliege, die kein RDGC-L exprimiert, konnte mit dem 4C5-Antikörper keine Hyperphosphorylierung gefunden werden. In *rdgC^{4S}*-Fliegen kompensiert die Überexpression von RDGC-M das Fehlen von RDGC-S, womit ebenfalls keine Hyperphosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Einzig in *rdgC^{4SM}*-Fliegen, die kein RDGC-S und nur sehr stark reduziert RDGC-M exprimieren, konnte eine leichte Hyperphosphorylierung von Rh1 gezeigt werden. Es zeigte sich zwischen den *rdgC^{4SM}*-Fliegen und den Wildtyp-Fliegen ein signifikanter Unterschied im Signal des 4C5-Antikörpers, wobei das Signal nicht so stark abgeschwächt war wie in den *rdgC³⁰⁶*-Mutanten.

Mit der Hyperphosphorylierung von Rh1 einhergehend ist eine Degeneration der Retina im Komplexauge (Alloway et al. 2000). Dabei führt die Hyperphosphorylierung von RH1 dazu, dass stabile Komplexe mit Arrestin2 entstehen (Kristaponyte et al. 2012; Vinós et al. 1997). Diese stabilen Komplexe werden mittels Endozytose internalisiert (Alloway et al. 2000), wobei die Endozytose der Komplexe kritisch für das Einleiten der Apoptose ist. Dies wurde anhand von *shibire*-Mutanten gezeigt, die eine Mutation im Endozytose-Weg aufweisen (van der Bliek und Meyerowitz 1991). Es ist zudem bereits bekannt, dass in *sh^{1ts1}::;dgC³⁰⁶*-Doppelmutanten die Degeneration nach 4 Tagen zumindest partiell gerettet wird (Kiselev et al. 2000). Das Rhodopsin aus den stabilen Komplexen kann nicht wie normal über das Lysosom abgebaut

werden. Stattdessen akkumulieren die Komplexe im späten Endosom und führen damit zur Apoptose und zur Degeneration der Photorezeptorzellen (Chinchore et al. 2009).

Die Untersuchung der tiefen Pseudopupille in *rdgC³⁰⁶*-Fliegen in dieser Arbeit zeigte bereits innerhalb von 6 Tagen eine vollständige Retinadegeneration, was bei der Überprüfung nach sieben Tagen im Hell-Dunkel Zyklus auch auf immunocytochemischer Ebene bestätigt werden konnte. Da in *rdgC^{AL}*- und *rdgC^{AS}*-Fliegen keine Hyperphosphorylierung zu sehen war, entsprach die Erkenntnis, dass dort keine Retinadegeneration zu finden war den Erwartungen. In *rdgC^{ASM}*-Fliegen zeigte sich in den ersten sieben Tagen im Hell-Dunkel Zyklus weder bei der Untersuchung der tiefen Pseudopupille noch bei der immunocytochemischen Untersuchung eine Degeneration der Retina. Da mit dem 4C5-Antikörper allerdings eine leichte Hyperphosphorylierung im Vergleich zu Wildtyp-Fliegen gefunden wurde, wurde vermutet, dass es zu einer langsameren Retinadegeneration in diesen Mutanten kommt. Diese Hypothese konnte mit keiner der beiden Methoden verifiziert werden. Es zeigte sich, dass das Fehlen von RDGC-S und RDGC-M zwar zu einer leichten Hyperphosphorylierung von Rh1 führt, auf diese Weise aber noch ausreichend RH1-Dephosphorylierung stattfindet um eine Retinadegeneration auch in einem längeren Zeitraum zu verhindern.

Die Überexpression der kurzen Isoform RDGC-S unter der Kontrolle des Rh1-Promotors reicht ebenfalls aus, um eine lichtabhängige retinale Degeneration innerhalb von 7 Tagen zu verhindern. Dabei waren sowohl ein als auch zwei Allele des Transgens unter Kontrolle des Rh1-Promotors in der Lage den Phänotyp der *rdgC³⁰⁶*-Mutante auszugleichen.

Auf diese Weise konnte nicht festgestellt werden, welche der drei Isoformen für die Rh1-Dephosphorylierung verantwortlich ist. Es ist möglich, dass in *rdgC^{ASM}*-Fliegen nicht das Fehlen von RDGC-S und RDGC-M, sondern der dadurch entstandene geringe RDGC-Gesamtgehalt für die Hyperphosphorylierung verantwortlich ist. Es scheint so, als ob alle RDGC-Isoformen in der Lage sind, RH1 zu dephosphorylieren und es daher nicht zu einer lichtabhängigen retinalen Degeneration führt, wenn einzelne Isoformen fehlen.

4.7 Die Rolle von RDGC bei der Dephosphorylierung von TRP

In der Literatur sind andere Phosphatasen bekannt, die in mehreren Isoformen exprimiert werden und die in Folge dessen unterschiedliche katalytische Aktivitäten besitzen. So wird die humane Phosphatidsäure Phosphatase Typ2 in drei Isoformen exprimiert, wobei ihre katalytische Aktivität für die Dephosphorylierung von Phosphatidsäure zu Diacylglycerol für die verschiedenen Isoformen unterschiedlich hoch ist (Hooks et al. 1998). Daher ist es wahrscheinlich, dass die drei Isoformen von RDGC ebenfalls unterschiedliche katalytische Aktivitäten haben.

In *Drosophila melanogaster* sind im C-Terminus des TRP-Kannels 27 Phosphorylierungsstellen bekannt. Von diesen Phosphorylierungsstellen sind 14 bei Belichtung phosphoryliert während eine (S936) vorwiegend im Dunkeln phosphoryliert wird (Voolstra et al. 2010; Voolstra et al.

2013). Eine aktuelle Arbeit unserer Arbeitsgruppe machte TRP an der Stelle S936 als Zielsequenz der Phosphatase RDGC aus. In *rdgC*-Nullmutanten zeigt der TRP-Kanal an S936 dauerhafte Phosphorylierung (Voolstra et al. 2017). Es ist bereits seit sehr langer Zeit bekannt, dass Phosphoprotein Phosphatasen häufig mehrere unterschiedliche Substrate dephosphorylieren (Sundarajan und Sarma 1958) und somit ist es nicht überraschend, dass RDGC neben Rhodopsin auch der Ionenkanal TRP Substrat nutzt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der Dephosphorylierung von TRP-pS936 in Mutanten mit unterschiedlicher RDGC-Ausstattung untersucht. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Mutanten S936 nach einer Stunde Belichtung wie im Wildtyp dephosphoryliert wird. Es braucht also nicht alle drei RDGC-Isoformen um eine Dephosphorylierung von TRP an S936 sicherzustellen.

Die Untersuchung der Kinetik der lichtabhängigen Dephosphorylierung zeigte dabei ein anders Bild. Während *rdgC^{ΔL}*-Fliegen eine wildtypische Kinetik der Dephosphorylierung von TRP-pS936 zeigten, war in *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen die Dephosphorylierung deutlich langsamer. Da Fliegen mit nur einem intakten wildtypischen *rdgC*-Allel ebenfalls eine langsamere Kinetik zeigten, war dieser Phänotyp in den *rdgC^{ΔSM}*-Fliegen wahrscheinlich dem reduzierten Gesamtgehalt an RDGC zuzuschreiben.

Unerwarteterweise zeigten *rdgC^{ΔS}*-Fliegen eine signifikant schnellere Phosphorylierung von TRP-pS936. Da es in dieser Fliege zu einer Überexpression von RDGC-M, nicht aber zu einer Erhöhung des gesamt-RDGC-Gehalts kommt, liegt die schnellere Dephosphorylierung wahrscheinlich daran, dass RDGC-M eine größere katalytische Aktivität im Vergleich zu RDGC-S hat.

Die Untersuchung einer Fliege, die im *rdgC*-Nullmutanten Hintergrund RDGC-S überexprimiert, zeigt, dass dort lichtunabhängig ein geringeres TRP-pS936-Signal zu sehen war. Selbst in dunkel gehaltenen Fliegen konnte nur eine sehr schwache Phosphorylierung von TRP an S936 nachgewiesen werden. Obwohl RDGC eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration benötigt und daher nur bei Belichtung aktiv ist, reicht für das überexprimierte RDGC-S die Ca^{2+} -Konzentration im Dunkeln für eine Aktivität der Phosphatase aus. Möglicherweise besitzt RDGC auch eine basale Aktivität ohne Ca^{2+} , was in Fliegen mit wildtypischem RDGC-Gehalt nicht auffällt, in den *rh1>rdgC-S* Fliegen durch die starke Überexpression aber dazu führt, dass sich eine Dephosphorylierung von TRP-pS936 mit dem entsprechenden Antikörper nachweisen lässt.

Im Hinblick auf die Kinetik der Dephosphorylierung zeigte sich aber keine Abweichung von Wildtyp-Fliegen. Die Überexpression von RDGC-S reicht aus, um den Phänotyp der *rdgC*-Nullmutante im Hinblick auf die Dephosphorylierung von TRP-pS936 zu retten, nicht aber einen Phänotyp wie in der *rdgC^{ΔS}*-Fliege zu erzeugen.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an RDGC dafür sorgt, dass eine Assoziation des N-Terminus mit der katalytischen Domäne verhindert wird

(Lee und Montell 2001). Diese Interaktion ist wahrscheinlich mit verantwortlich für die Regulation der katalytischen Aktivität von RDGC. Da die unterschiedlichen Isoformen sich im N-Terminus unterscheiden, könnte dies der Grund für eine potentiell höhere katalytische Aktivität von RDGC-M im Vergleich zu RDGC-S bei der Dephosphorylierung von TRP an S936 sein. Die unterschiedliche Aktivität von RDGC-S und -M könnte auch in der Lokalisation der beiden Isoformen begründet sein. Während RDGC-S löslich vorliegt und zunächst zu den membrangebundenen TRP-Kanälen diffundieren muss, verankert die Palmitoylierung von RDGC-M dieses in der Membran. Dadurch entsteht eine räumliche Nähe, die die Geschwindigkeit der TRP-Dephosphorylierung durch RDGC-M erhöhen könnte. Das Prinzip der Erhöhung der Geschwindigkeit eines Prozesses durch räumliche Nähe der einzelnen Komponenten wird in der Phototransduktionskaskade bereits durch Bindung der wichtigsten Elemente wie TRP, PLC β und der ePKC an das INAD-Gerüstprotein angewandt (Hardie und Raghu 2001).

4.8 Überexpression von RDGC-S führt zu unspezifischer Dephosphorylierung

Die Überexpression von Proteinen *in vivo* kann dazu führen, dass unspezifische Signalwege aktiviert oder unspezifische Substrate verwendet werden (Prelich 2012). Beispielsweise führt die Überexpression von *hairy* in *Drosophila melanogaster* dazu, dass dieses Protein an der Determinierung des Geschlechts beteiligt ist, obwohl es bei der Expression in nativen Mengen nicht an diesem Prozess beteiligt ist (Parkhurst et al. 1990).

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von RDGC-S im *rdgC*-Nullmutanten Hintergrund ebenfalls zu einer unspezifischen Funktion führt, wurden weitere Phosphorylierungen untersucht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in *rdgC*-Nullmutanten die Phosphorylierung von TRP an anderen lichtabhängigen Phosphorylierungsstellen nicht betroffen ist. Dazu wurden die beiden Stellen TRP-pT849 und -pT864 untersucht (Bartels, 2016). In diesen beiden Stellen kommt es sowohl in Wildtyp-Fliegen als auch in *rdgC*³⁰⁶-Mutanten bei Belichtung zu einer Phosphorylierung und im Dunkeln zu einer Dephosphorylierung. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung in Fliegen nach 1 h Belichtung oder Dunkelheit untersucht. Dabei konnte die Dephosphorylierung in Wildtypen und *rdgC*³⁰⁶-Fliegen bestätigt werden. Die Überexpression von RDGC-S führte dazu, dass unabhängig von der Lichtbedingung keine Phosphorylierung dieser beiden Stellen gefunden wurden. Dabei reichte bereits ein Allel des Transgens aus, um diesen Phänotyp auszulösen. Im Gegensatz zu der Stelle S936, bei der keine vollständige Dephosphorylierung im Dunkeln, also der falschen Lichtbedingung vorliegt, konnte in den *rh1>rdgC-S*-Fliegen an den Stellen T849 und T864 des TRP Kanals bei Belichtung gar kein Signal mehr nachgewiesen werden. Der Grund für die vollständige Dephosphorylierung von TRP-pT849 und -pT864 ist, dass RDGC im Hellen aktiv ist und daher aktiv das falsche Substrat dephosphoryliert.

Diskussion

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von RDGC-S nicht nur dazu führt, dass in einem bekannten Substrat eine andere Stelle dephosphoryliert wird, sondern auch ein unspezifisches Substrat dephosphoryliert, wurde die Phosphorylierung des Gerüstproteins INAD an den beiden Stellen T170 und S174 überprüft. Wie erwartet war die lichtabhängige Phosphorylierung von INAD in der *rdgC³⁰⁶*-Mutante genauso wie in Wildtyp-Fliegen. Bei Belichtung liegt eine Phosphorylierung vor, während die beiden Stellen im Dunkeln dephosphoryliert vorliegen. In den *rh1>rdgC-S* Fliegen ist für beide Stellen lichtunabhängig kein Signal detektierbar. Die Überexpression von RDGC-S führt dazu, dass sowohl unspezifische Stellen als auch ein unspezifisches Substrat verwendet werden.

5 Literaturverzeichnis

Alloway, P. G.; Howard, L.; Dolph, P. J. (2000): The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. In: *Neuron* 28 (1), S. 129–138.

Balemans, Dafne; Boeckstaens, Guy E.; Talavera, Karel; Wouters, Mira M. (2017): Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 312 (6), G635-G648. DOI: 10.1152/ajpgi.00401.2016.

Bagnjuk K. (2015): Die Rolle der Phosphatase RDGC bei der Dephosphorylierung von Rhodopsin und TRP in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit, Universität Hohenheim.

Barford, D. (1996): Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. In: *Trends in biochemical sciences* 21 (11), S. 407–412.

Bartels, J.-P. (2015): Untersuchung der lichtabhängigen Phosphorylierung des TRP-Kanals von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Hohenheim.

Bassett, Andrew R.; Tibbit, Charlotte; Ponting, Chris P.; Liu, Ji-Long (2013): Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. In: *Cell reports* 4 (1), S. 220–228. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.06.020.

Burset, M.; Seledtsov, I. A.; Solovyev, V. V. (2001): SpliceDB. Database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. In: *Nucleic acids research* 29 (1), S. 255–259.

Camps, M.; Nichols, A.; Arkinstall, S. (2000): Dual specificity phosphatases. A gene family for control of MAP kinase function. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (1), S. 6–16.

Cassill, J. A.; Whitney, M.; Joazeiro, C. A.; Becker, A.; Zuker, C. S. (1991): Isolation of *Drosophila* genes encoding G protein-coupled receptor kinases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24), S. 11067–11070.

Cerny, Alexander C.; Altendorfer, André; Schopf, Krystina; Baltner, Karla; Maag, Nathalie; Sehn, Elisabeth et al. (2015): The GTP- and Phospholipid-Binding Protein TTD14 Regulates Trafficking of the TRPL Ion Channel in *Drosophila* Photoreceptor Cells. In: *PLoS genetics* 11 (10), e1005578. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005578.

Chinchore, Yashodhan; Mitra, Amitavo; Dolph, Patrick J. (2009): Accumulation of rhodopsin in late endosomes triggers photoreceptor cell degeneration. In: *PLoS genetics* 5 (2), e1000377. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000377.

Chyb, S.; Raghu, P.; Hardie, R. C. (1999): Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. In: *Nature* 397 (6716), S. 255–259. DOI: 10.1038/16703.

- Cioffi, Donna L.; Lowe, Kevin; Alvarez, Diego F.; Barry, Christina; Stevens, Troy (2009): TRP on the lung endothelium. Calcium channels that regulate barrier function. In: *Antioxidants & redox signaling* 11 (4), S. 765–776. DOI: 10.1089/ars.2008.2221.
- Cosens, D. J.; Manning, A. (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. In: *Nature* 224 (5216), S. 285–287.
- Delgado, Ricardo; Muñoz, Yorka; Peña-Cortés, Hugo; Giavalisco, Patrick; Bacigalupo, Juan (2014): Diacylglycerol activates the light-dependent channel TRP in the photosensitive microvilli of *Drosophila melanogaster* photoreceptors. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (19), S. 6679–6686. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0513-14.2014.
- Dolph, P. J.; Ranganathan, R.; Colley, N. J.; Hardy, R. W.; Socolich, M.; Zuker, C. S. (1993): Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5116), S. 1910–1916.
- Fagerberg, Linn; Hallström, Björn M.; Oksvold, Per; Kampf, Caroline; Djureinovic, Dijana; Odeberg, Jacob et al. (2014): Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (2), S. 397–406. DOI: 10.1074/mcp.M113.035600.
- Franceschini, N.; Kirschfeld, K. (1971): Pseudopupil phenomena in the compound eye of *Drosophila*. *Kybernetik*. 1971 9(5):195-82.
- Frye, M. A.; Dickinson, M. H. (2001): Fly flight. A model for the neural control of complex behavior. In: *Neuron* 32 (3), S. 385–388.
- Gasteiger, Elisabeth; Gattiker, Alexandre; Hoogland, Christine; Ivanyi, Ivan; Appel, Ron D.; Bairoch, Amos (2003): ExPASy. The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic acids research* 31 (13), S. 3784–3788.
- Gratz, Scott J.; Cummings, Alexander M.; Nguyen, Jennifer N.; Hamm, Danielle C.; Donohue, Laura K.; Harrison, Melissa M. et al. (2013): Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. In: *Genetics* 194 (4), S. 1029–1035. DOI: 10.1534/genetics.113.152710.
- Gratz, Scott J.; Harrison, Melissa M.; Wildonger, Jill; O'Connor-Giles, Kate M. (2015): Precise Genome Editing of *Drosophila* with CRISPR RNA-Guided Cas9. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1311, S. 335–348. DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9_22.
- Gratz, Scott J.; Ukken, Fiona P.; Rubinstein, C. Dustin; Thiede, Gene; Donohue, Laura K.; Cummings, Alexander M.; O'Connor-Giles, Kate M. (2014): Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. In: *Genetics* 196 (4), S. 961–971. DOI: 10.1534/genetics.113.160713.
- Hardie, R. C.; Raghu, P. (2001): Visual transduction in *Drosophila*. In: *Nature* 413 (6852), S. 186–193. DOI: 10.1038/35093002.

Hardie, Roger C. (2012): Polarization vision. *Drosophila* enters the arena. In: *Current biology : CB* 22 (1), R12-4. DOI: 10.1016/j.cub.2011.11.016.

Hardie, Roger C.; Franze, Kristian (2012): Photomechanical responses in *Drosophila* photoreceptors. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6104), S. 260–263. DOI: 10.1126/science.1222376.

Hooks, S. B.; Ragan, S. P.; Lynch, K. R. (1998): Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. In: *FEBS letters* 427 (2), S. 188–192.

Huang, Jiehong; Liu, Che-Hsiung; Hughes, Simon A.; Postma, Marten; Schwiening, Christof J.; Hardie, Roger C. (2010): Activation of TRP channels by protons and phosphoinositide depletion in *Drosophila* photoreceptors. In: *Current biology : CB* 20 (3), S. 189–197. DOI: 10.1016/j.cub.2009.12.019.

Ji, Yuhuan; Leymarie, Nancy; Haeussler, Dagmar J.; Bachschmid, Marcus M.; Costello, Catherine E.; Lin, Cheng (2013): Direct detection of S-palmitoylation by mass spectrometry. In: *Analytical chemistry* 85 (24), S. 11952–11959. DOI: 10.1021/ac402850s.

Kahn, E. S.; Matsumoto, H. (1997): Calcium/calmodulin-dependent kinase II phosphorylates *Drosophila* visual arrestin. In: *Journal of neurochemistry* 68 (1), S. 169–175.

Katz, Ben; Minke, Baruch (2009): *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 3, S. 2. DOI: 10.3389/neuro.03.002.2009.

Katz, Ben; Voolstra, Olaf; Tzadok, Hanan; Yasin, Bushra; Rhodes-Modrov, Elisheva; Bartels, Jonas-Peter et al. (2017): The latency of the light response is modulated by the phosphorylation state of *Drosophila* TRP at a specific site. In: *Channels (Austin, Tex.)* 11 (6), S. 678–685. DOI: 10.1080/19336950.2017.1361073.

Kirschfeld K. (1967). The projection of the optical environment on the screen of the rhabdomere in the compound eye of the *Musca*. *Exp. Brain Res.* 3, 248-270.

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*. In: *Neuron* 28 (1), S. 139–152.

Kiselev, A.; Subramaniam, S. (1997): Studies of Rh1 metarhodopsin stabilization in wild-type *Drosophila* and in mutants lacking one or both arrestins. In: *Biochemistry* 36 (8), S. 2188–2196. DOI: 10.1021/bi9621268.

Kondo, Shu; Ueda, Ryu (2013): Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. In: *Genetics* 195 (3), S. 715–721. DOI: 10.1534/genetics.113.156737.

Kristaponyte, Inga; Hong, Yuan; Lu, Haiqin; Shieh, Bih-Hwa (2012): Role of rhodopsin and arrestin phosphorylation in retinal degeneration of *Drosophila*. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (31), S. 10758–10766. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0565-12.2012.

- Kyte, J.; Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. In: *Journal of molecular biology* 157 (1), S. 105–132.
- Lee, Jeong-Soo; Kwak, Su-Jin; Kim, Jungeun; Kim, Ae-Kyeong; Noh, Hae Min; Kim, Jin-Soo; Yu, Kweon (2014): RNA-guided genome editing in *Drosophila* with the purified Cas9 protein. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 4 (7), S. 1291–1295. DOI: 10.1534/g3.114.012179.
- Lee, S. J.; Montell, C. (2001): Regulation of the rhodopsin protein phosphatase, RDGC, through interaction with calmodulin. In: *Neuron* 32 (6), S. 1097–1106.
- Lee, Seung-Jae; Montell, Craig (2004): Suppression of constant-light-induced blindness but not retinal degeneration by inhibition of the rhodopsin degradation pathway. In: *Current biology : CB* 14 (23), S. 2076–2085. DOI: 10.1016/j.cub.2004.11.054.
- Lee, Seung-Jae; Xu, Hong; Montell, Craig (2004): Rhodopsin kinase activity modulates the amplitude of the visual response in *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (32), S. 11874–11879. DOI: 10.1073/pnas.0402205101.
- Leung, Hung-Tat; Tseng-Crank, Julie; Kim, Eunju; Mahapatra, Cecon; Shino, Shikoh; Zhou, Ying et al. (2008): DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in *Drosophila* photoreceptors. In: *Neuron* 58 (6), S. 884–896. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.05.001.
- Lev, Shaya; Katz, Ben; Tzarfaty, Vered; Minke, Baruch (2012): Signal-dependent hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate without activation of phospholipase C. Implications on gating of *Drosophila* TRPL (transient receptor potential-like) channel. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (2), S. 1436–1447. DOI: 10.1074/jbc.M111.266585.
- LeVine, H.; Smith, D. P.; Whitney, M.; Malicki, D. M.; Dolph, P. J.; Smith, G. F. et al. (1990): Isolation of a novel visual-system-specific arrestin. An in vivo substrate for light-dependent phosphorylation. In: *Mechanisms of development* 33 (1), S. 19–25.
- Liu, Che-Hsiung; Satoh, Akiko K.; Postma, Marten; Huang, Jiehong; Ready, Donald F.; Hardie, Roger C. (2008): Ca²⁺-dependent metarhodopsin inactivation mediated by calmodulin and NINAC myosin III. In: *Neuron* 59 (5), S. 778–789. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.07.007.
- Lu, Haiqin; Leung, Hung-Tat; Wang, Ning; Pak, William L.; Shieh, Bih-Hwa (2009): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila* photoreceptors. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (17), S. 11100–11109. DOI: 10.1074/jbc.M806956200.
- Mills, Elena; Price, Helen P.; Johner, Andrea; Emerson, Jenny E.; Smith, Deborah F. (2007): Kinetoplastid PPEF phosphatases. Dual acylated proteins expressed in the endomembrane system of *Leishmania*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 152 (1), S. 22–34. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2006.11.008.
- Minke, B.; Wu, C.; Pak, W. L. (1975): Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. In: *Nature* 258 (5530), S. 84–87.

- Minke, Baruch (2012): The history of the prolonged depolarizing afterpotential (PDA) and its role in genetic dissection of *Drosophila* phototransduction. In: *Journal of neurogenetics* 26 (2), S. 106–117. DOI: 10.3109/01677063.2012.666299.
- Montell, Craig (2005): *Drosophila* TRP channels. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 451 (1), S. 19–28. DOI: 10.1007/s00424-005-1426-2.
- Montell, Craig (2012): *Drosophila* visual transduction. In: *Trends in neurosciences* 35 (6), S. 356–363. DOI: 10.1016/j.tins.2012.03.004.
- Montell, Craig; Rubin, Gerald M. (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. In: *Neuron* 2 (4), S. 1313–1323. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90069-X.
- Mumby, M. C.; Walter, G. (1993): Protein serine/threonine phosphatases. Structure, regulation, and functions in cell growth. In: *Physiological reviews* 73 (4), S. 673–699. DOI: 10.1152/physrev.1993.73.4.673.
- Olsen, Jesper V.; Godoy, Lyris M. F. de; Li, Guoqing; Macek, Boris; Mortensen, Peter; Pesch, Reinhold et al. (2005): Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4 (12), S. 2010–2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.
- Ostroy, S.E., Pak W.L. (1974): Protein and electroretinogram changes in the alleles of the *norp AP12* *Drosophila* phototransduction mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 368(): 259-268.
- O'Tousa, J. E.; Baehr, W.; Martin, R. L.; Hirsh, J.; Pak, W. L.; Applebury, M. L. (1985): The *Drosophila* *ninaE* gene encodes an opsin. In: *Cell* 40 (4), S. 839–850.
- Pak W.L. (1979). Study of photoreceptor function using *Drosophila* mutants. *Neurogenetics: Genetic Approaches to the Nervous System* Breakfield X, editor., ed67-99Amsterdam: Elsevier.
- Park, Soo-Yeon; Seo, Jaesung; Choi, Hyo-Kyoung; Oh, Hye-Jeong; Guk, Garam; Lee, Yoo-Hyun et al. (2017): Protein serine/threonine phosphatase PPEF-1 suppresses genotoxic stress response via dephosphorylation of PDCD5. In: *Scientific reports* 7, S. 39222. DOI: 10.1038/srep39222.
- Parkhurst, S. M.; Bopp, D.; Ish-Horowicz, D. (1990): X:A ratio, the primary sex-determining signal in *Drosophila*, is transduced by helix-loop-helix proteins. In: *Cell* 63 (6), S. 1179–1191.
- Pollock, J. A.; Benzer, S. (1988): Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. In: *Nature* 333 (6175), S. 779–782. DOI: 10.1038/333779a0.
- Port, Phillip; Chen, Hui-Min; Lee, Tzumin; Bullock, Simon L. (2014): Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29), E2967-76. DOI: 10.1073/pnas.1405500111.

- Postma, M.; Oberwinkler, J.; Stavenga, D. G. (1999): Does Ca²⁺ reach millimolar concentrations after single photon absorption in *Drosophila* photoreceptor microvilli? In: *Biophysical journal* 77 (4), S. 1811–1823. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77026-8.
- Prelich, Gregory (2012): Gene overexpression. Uses, mechanisms, and interpretation. In: *Genetics* 190 (3), S. 841–854. DOI: 10.1534/genetics.111.136911.
- Ramulu, P.; Nathans, J. (2001): Cellular and subcellular localization, N-terminal acylation, and calcium binding of *Caenorhabditis elegans* protein phosphatase with EF-hands. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 25127–25135. DOI: 10.1074/jbc.M011712200.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Ranganathan, R.; Harris, G. L.; Stevens, C. F.; Zuker, C. S. (1991): A *Drosophila* mutant defective in extracellular calcium-dependent photoreceptor deactivation and rapid desensitization. In: *Nature* 354 (6350), S. 230–232. DOI: 10.1038/354230a0.
- Ren, Xingjie; Sun, Jin; Housden, Benjamin E.; Hu, Yanhui; Roesel, Charles; Lin, Shuailiang et al. (2013): Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (47), S. 19012–19017. DOI: 10.1073/pnas.1318481110.
- Reuss, H.; Mojet, M. H.; Chyb, S.; Hardie, R. C. (1997): In vivo analysis of the *drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. In: *Neuron* 19 (6), S. 1249–1259.
- Schillo M. (2001). Deaktivierung und Regeneration des G-Protein gekoppelten Rezeptors Rhodopsin im Komplexauge von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Schopf, Krystina; Huber, Armin (2017): Membrane protein trafficking in *Drosophila* photoreceptor cells. In: *European journal of cell biology* 96 (5), S. 391–401. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.11.002.
- Sebo, Zachary L.; Lee, Han B.; Peng, Ying; Guo, Yi (2014): A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. In: *Fly* 8 (1), S. 52–57. DOI: 10.4161/fly.26828.
- Sherman, P. M.; Sun, H.; Macke, J. P.; Williams, J.; Smallwood, P. M.; Nathans, J. (1997): Identification and characterization of a conserved family of protein serine/threonine phosphatases homologous to *Drosophila* retinal degeneration C. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21), S. 11639–11644.
- Shevchenko, A.; Loboda, A.; Ens, W.; Schraven, B.; Standing, K. G. (2001): Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. In: *Electrophoresis* 22 (6), S. 1194–1203. DOI: 10.1002/1522-268322:6<1194::AID-ELPS1194>3.0.CO;2-A.

- Stavenga, Doekele G.; Arikawa, Kentaro (2008): One rhodopsin per photoreceptor. Iro-C genes break the rule. In: *PLoS biology* 6 (4), e115. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060115.
- Stavenga, Doekele G.; Hardie, Roger C. (2011): Metarhodopsin control by arrestin, light-filtering screening pigments, and visual pigment turnover in invertebrate microvillar photoreceptors. In: *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 197 (3), S. 227–241. DOI: 10.1007/s00359-010-0604-7.
- Steele, F.; O'Tousa, J. E. (1990): Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila* rdgC mutant. In: *Neuron* 4 (6), S. 883–890.
- Steele, F. R.; Washburn, T.; Rieger, R.; O'Tousa, J. E. (1992): *Drosophila* retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. In: *Cell* 69 (4), S. 669–676.
- Stryer, L. (1990): Biochemie. Spektrum der Wissenschaft-Vertragsgesellschaft. ISBN 3-89330-690-0.
- Sundarajan, T. A.; Sarma, P. S. (1958): Action of proteolytic enzymes on dephosphorized casein. In: *Enzymologia* 20 (2), S. 57–61.
- Thanaraj, T. A.; Clark, F. (2001): Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. In: *Nucleic acids research* 29 (12), S. 2581–2593.
- van der Blik, A. M.; Meyerowitz, E. M. (1991): Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. In: *Nature* 351 (6325), S. 411–414. DOI: 10.1038/351411a0.
- Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007): TRP channels. In: *Annual review of biochemistry* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Venken, Koen J. T.; Schulze, Karen L.; Haelterman, Nele A.; Pan, Hongling; He, Yuchun; Evans-Holm, Martha et al. (2011): MiMIC. A highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. In: *Nature methods* 8 (9), S. 737–743.
- Vinós, J.; Jalink, K.; Hardy, R. W.; Britt, S. G.; Zuker, C. S. (1997): A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5326), S. 687–690.
- Voolstra, Olaf; Bartels, Jonas-Peter; Oberegelsbacher, Claudia; Pfannstiel, Jens; Huber, Armin (2013): Phosphorylation of the *Drosophila* transient receptor potential ion channel is regulated by the phototransduction cascade and involves several protein kinases and phosphatases. In: *PLoS one* 8 (9), e73787. DOI: 10.1371/journal.pone.0073787.
- Voolstra, Olaf; Beck, Katherina; Oberegelsbacher, Claudia; Pfannstiel, Jens; Huber, Armin (2010): Light-dependent phosphorylation of the *drosophila* transient receptor potential ion channel. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (19), S. 14275–14284. DOI: 10.1074/jbc.M110.102053.

- Voolstra, Olaf; Rhodes-Mordov, Elisheva; Katz, Ben; Bartels, Jonas-Peter; Oberegelsbacher, Claudia; Schotthöfer, Susanne Katharina et al. (2017): The Phosphorylation State of the Drosophila TRP Channel Modulates the Frequency Response to Oscillating Light In Vivo. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37 (15), S. 4213–4224. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3670-16.2017.
- Wang, Tao; Montell, Craig (2007): Phototransduction and retinal degeneration in Drosophila. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454 (5), S. 821–847. DOI: 10.1007/s00424-007-0251-1.
- Wolff T., Ready D. F. (1993). *Pattern formation in the Drosophila retina*. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Vol. 2 Pp. 1277-1325.
- Xue, Yu; Chen, Hu; Jin, Changjiang; Sun, Zhirong; Yao, Xuebiao (2006): NBA-Palm. Prediction of palmitoylation site implemented in Naïve Bayes algorithm. In: *BMC bioinformatics* 7, S. 458. DOI: 10.1186/1471-2105-7-458.
- Xue, Zhaoyu; Wu, Menghua; Wen, Kejia; Ren, Menda; Long, Li; Zhang, Xuedi; Gao, Guanjun (2014): CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in Drosophila. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 4 (11), S. 2167–2173. DOI: 10.1534/g3.114.014159.
- Yau, King-Wai; Hardie, Roger C. (2009): Phototransduction motifs and variations. In: *Cell* 139 (2), S. 246–264. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.029.
- Yu, Zhongsheng; Chen, Hanqing; Liu, Jiyong; Zhang, Hongtao; Yan, Yan; Zhu, Nannan et al. (2014): Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the Drosophila genome. In: *Biology open* 3 (4), S. 271–280. DOI: 10.1242/bio.20147682.
- Yu, Zhongsheng; Ren, Mengda; Wang, Zhanxiang; Zhang, Bo; Rong, Yikang S.; Jiao, Renjie; Gao, Guanjun (2013): Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in Drosophila. In: *Genetics* 195 (1), S. 289–291. DOI: 10.1534/genetics.113.153825.
- Zuker, C. S. (1996): The biology of vision of Drosophila. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2), S. 571–576.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Aufbau des <i>Drosophila</i> -Komplexauges.	7
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade..	8
Abbildung 1.3 Die von einer Phosphatase katalysierte Hydrolysereaktion.....	10
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Aufbaus von PPEFs.	10
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des <i>rdgC</i> Genlokus, seiner Transkripte und vorhergesagten Proteinvarianten.	12
Abbildung 1.6 Rhodopsin1 Gleichgewicht in <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Abbildung 1.7 Die Familie der TRP-Kanäle.....	17
Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des CRiSPR-Cas9 Systems.....	19
Abbildung 2.1 Transmissionsspektren der verwendeten Farbfilter.	39
Abbildung 2.2 Validierung der Linearität des α -RDGC-Antikörpers.....	58
Abbildung 3.1 Ein Westernblot von <i>Drosophila</i> -Kopffextrakten mit α -RDGC-Antikörper zeigt drei Proteinvarianten.	71
Abbildung 3.2 Agarosegel der Kolonie-PCR mit <i>rdgC-RB</i> in TOPO-TA.	72
Abbildung 3.3 <i>rdgC-M</i> und <i>rdgC-S</i> sind Spleißvarianten aus <i>rdgC-RB</i>	73
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der verschiedenen RDGC-Isoformen.....	73
Abbildung 3.5 Nachweis der Insertion des Myc-Tags.	76
Abbildung 3.6 IP mit α -Myc-Antikörper aus <i>rdgC-Myc/TM3</i> -Fliegen.	77
Abbildung 3.7 Fragmentierungsspektrum des präzipitierten und tryptisch verdauten RDGC-Myc.....	78
Abbildung 3.8 Ein-Kopf-Westernblot Screening nach mutierten Fliegen mit verändertem Expressionsmuster.	79
Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der MiMIC Integrationsstellen.	81
Abbildung 3.10 RDGC-Gehalt in verschiedenen Mutanten.	82
Abbildung 3.11 Sequenzierung von genomischer DNA aus <i>rdgC^{ΔS}</i> - und <i>rdgC^{ΔSM}</i> -Fliegen.....	83
Abbildung 3.12 Kolonie-PCR aus Klonen mit ursprünglicher cDNA aus <i>rdgC^{ΔSM}</i> -Fliegen.	84
Abbildung 3.13 Kolonie PCR aus Klonen mit ursprünglicher cDNA aus <i>rdgC^{ΔS}</i> -Fliegen.....	84
Abbildung 3.14 Vergleich verschiedener Mengen an <i>rh1>rdgC-S</i> -Fliegen mit Wildtyp-Fliegen.	85
Abbildung 3.15 Gewebespezifische Lokalisation der RDGC-Isoformen.....	87
Abbildung 3.16 Schematische Darstellung der MiMIC-Integrationsstellen.....	88
Abbildung 3.17 Subzelluläre Lokalisation von RDGC im Dunkeln und nach 1 h Belichtung... ..	89
Abbildung 3.18 Subzelluläre Lokalisation von RDGC nach 16 h Belichtung.....	90
Abbildung 3.19 Subzelluläre Fraktionierung von RDGC aus Wildtypen und <i>rdgC^{ΔS}</i> -Fliegen. ..	91
Abbildung 3.20 Quantifizierung der subzellulären Fraktionierung der unterschiedlichen RDGC Isoformen.	91
Abbildung 3.21 Fraktionierung von RDGC in <i>rdgC^[MI00126-GFSTF.1]</i> -Fliegen.	92
Abbildung 3.22 Subzelluläre Fraktionierung mit 8 M Harnstoff	94
Abbildung 3.23 Hydrophathie-Blots für die drei RDGC-Isoformen.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.24 Aminosäuresequenzen der N-Termini wildtypischer und mutierter Isoformen.	97
Abbildung 3.25 Expression aller wildtypischen und mutierten Isoformen in S2-Zellen.	97
Abbildung 3.26 Immunocytochemie transient transfizierter S2-Zellen.	98
Abbildung 3.27 Subzelluläre Fraktionierung aller RDGC-Varianten aus S2-Zellen.	99
Abbildung 3.28 Subzelluläre Fraktionierung von RDGC-S, -L und -L ^{MUT} aus S2-Zellen.	100
Abbildung 3.29 Biochemischer Nachweis der Palmitoylierung von RDGC.	101
Abbildung 3.30 Nachweis der Expression von RDGC aus Sf9-Zellen.	102
Abbildung 3.31 Nachweis der Aufreinigung von RDGC aus Sf9-Zellen.	103
Abbildung 3.32 Immunpräzipitiertes RH1 aus wildtypischen Fliegen.	105
Abbildung 3.33 Fragmentierungsspektren für die C-terminalen Phosphorylierungsstellen in RH1.	107
Abbildung 3.34 Schematische Darstellung von RH1 mit den gefundenen Phosphorylierungsstellen.	108
Abbildung 3.35 Überprüfung der Lage des Epitops des 4C5-Antikörpers.	109
Abbildung 3.36 4C5-Signal als Nachweis für Hyperphosphorylierung von RH1.	109
Abbildung 3.37 Abhängigkeit des 4C5-Signals von der RH1-Hyperphosphorylierung.	110
Abbildung 3.38 Rh1-Hyperphosphorylierung in den verschiedenen <i>rdgC</i> -Mutanten.	111
Abbildung 3.39 PDA in verschiedenen <i>rdgC</i> -Mutanten.	112
Abbildung 3.40 Untersuchung der tiefen Pseudopupille in den <i>rdgC</i> -Mutanten.	115
Abbildung 3.41 Quantifizierung der tiefen Pseudopupille in den <i>rdgC</i> -Mutanten.	116
Abbildung 3.42 Nachweis der Degeneration in den <i>rdgC</i> -Mutanten über Fluoreszenzfärbung.	117
Abbildung 3.43 Fluoreszenzfärbung von Cryoschnitten von <i>rdgC^{ASM}</i> -Fliegen nach 0, 7 und 14 Tagen im 12 h-hell/dunkel-Zyklus.	118
Abbildung 3.44 Phosphorylierung an TRP-S936 in den <i>rdgC</i> -Mutanten nach 1 h Belichtung oder Dunkeladaption.	119
Abbildung 3.45 Kinetik der Dephosphorylierung von TRP an S936 in verschiedenen <i>rdgC</i> -Mutanten.	121
Abbildung 3.46 RDGC-Gehalt in <i>rh1>rdgC-S</i> -Fliegen.	122
Abbildung 3.47 Subzelluläre Fraktionierung von <i>rh1>rdgC-S</i> Fliegen.	123
Abbildung 3.48 Analyse der Degeneration nach 0 und 7 Tagen im hell/dunkel-Zyklus durch Fluoreszenzfärbung von Cryoschnitten in <i>rh1>rdgC-S</i> -Fliegen.	124
Abbildung 3.49 Lichtabhängige Dephosphorylierung von TRP und INAD in <i>rh1>rdgC-S</i> Fliegen.	125
Abbildung 3.50 Vergleich der Phosphorylierung von TRP-S936 nach bestimmten Zeitpunkten.	126
Abbildung 3.51 Kinetik der Dephosphorylierung von TRP an der Stelle S936 in Wildtypen und <i>rh1>rdgC-S/Cyo</i> -Fliegen.	127

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Å	Angström
ACN	Acetonitril
ad	zu
AF488	Alexa-Fluor488
AGC	automatic gain control
Ala	Alanin
ANOVA	analysis of variance
APMSF	4-Amindinophenylmethylsulfonyl fluorid
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA
CID	sollision induced dissociation
cm	Zentimeter
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	double-stranded DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum
GDP	Guanin-Diphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gRNA	guide RNA
GTP	Guanin-Triphosphat
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
HAc	Essigsäure
HAM	Hydroxylamin
HCD	high energy collision dissociation

Abkürzungsverzeichnis

HDR	homology directed repair
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- enansulfonsäure
HRP	horse raddish peroxidase
hPa	Hektopascal
IAA	Iodacetamid
IC	Immuncytochemie
INAD	Inactivation no afterpotential D
IP	Immunpräzipitation
IP₃	Inositol-1,3,5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
λ	Wellenlänge
LB	lysogeny broth
M	Metarhodopsin
M	Molar
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
Mg²⁺	Magnesium
MIT	Maximale Injektionszeit
MiMIC	Minos mediated integration cassette
MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholin)propansulfonsäure
MPP	Mg ²⁺ -abhängige Phosphatasen
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
Na⁺	Natrium
NHEJ	non-homologous end-joining
Ni	Nickel
NINAC	Neither inactivation nor activation C
nm	nanometer
PAM	Protospacer adjacent motif
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Prolonged depolarizing afterpotential
PDCP5	Programmed Cell Death 5
PEN/STREP	Penicillin/Streptavidin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaque-forming unit(s)

Abkürzungsverzeichnis

PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLCβ	Phospholipase C β
PPEF	Proteinphosphatasen mit EF-Händen
ppm	parts per mmillion
PPP	Phosphoproteinphosphatasen
PUFA	poly unsaturated fatty acid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RH	Rhodopsin
RDGC	Retinal degeneration C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error oft he mean
Ser	Serin
ssDNA	singe-stranded DNA
ssODN	single-stranded Oligonukleotide
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TRP	Transient receptor potential
TRPL	Transient receptor potenital-like
TSS	Transkriptionsstartstelle
Tyr	Tyrosin
TXEP	Triton-X100 Extraktionspuffer
TXWP	Triton-X100 Waschpuffer
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
W	Watt
WB	Westernblot
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β - DGalactopyranosid
Üs	Überstand
°C	Grad Celcius

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Armin Huber für die Vergabe meines interessanten Dissertationsthemas, die Betreuung während der Labor- aber auch der Schreibzeit und dem stets offenen Ohr bei allen anfallenden Fragen bedanken.

Ich möchte mich zudem bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hanke für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein riesen Dank gilt außerdem Dr. Olaf Voolstra, der mir stets eine besonders große Unterstützung bei anfallenden Problemen und Fragen war. Genauso dankbar bin ich für die technischen Assistenten Frank, Christine und Petra, die im Laboralltag stets eine große Stütze waren. Den restlichen Mitarbeitern des Instituts für Biosensorik und der Service Einheit Massenspektrometrie danke ich für das angenehme Arbeitsklima, dass die Arbeit in den vergangenen Jahren sehr angenehm gestaltet hat. Dabei geht ein besonders großer Anteil meines Danks an meine „Leidensgenossin“ Krystina, mit der die Höhen der Arbeit besonders spaßig und die Tiefen deutlich leichter waren.

Danke auch an Berit Würz, die sich auf die Suche nach den Rechtschreibfehlern in dieser Arbeit gemacht hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich für die Unterstützung durch meine Familie bedanken. Dabei vor allem meinem Dad, ohne den ich diesen Schritt gar nicht gegengen wäre und meinem Mann, der ganz genau weiß wieso.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität zum Dr. rer. nat.

- 1.) Bei der eingereichten Dissertation zum Thema „Funktionelle Charakterisierung der Phosphatase RDGC in *Drosophila melanogaster* Photorezeptorzellen.“ handelt es sich um meine eigenständig webrachte Leistung.
- 2.) Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
- 3.) Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder-beratung in Anspruch genommen.
- 4.) Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstaatlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ebersbach an der Fils, 12.02.2018