

**Untersuchung der lichtabhängigen  
Phosphorylierung des TRP-Kanals von  
*Drosophila melanogaster***

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

Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim

Institut für Physiologie  
Fachgebiet Biosensorik

Vorgelegt von:  
Jonas-Peter Bartels

Flensburg  
2015

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Armin Huber
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Wolfgang Hanke
Eingereicht am:	16.10.2015
Mündliche Prüfung am:	28.04.2016

Die vorliegende Arbeit wurde am 10.12.2015 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

## Veröffentlichungen

Ein Teil dieser Arbeit wurde an folgenden Stellen bereits veröffentlicht.

### Artikel:

Voolstra, O., **Bartels, J.-P.**, Oberegelsbacher, C., Pfannstiel, J., Huber, A., 2013. Phosphorylation of the *Drosophila* transient receptor potential ion channel is regulated by the phototransduction cascade and involves several protein kinases and phosphatases. PLoS ONE 8 (9), e73787.

### Kongressbeiträge:

Voolstra, Olaf; **Bartels, Jonas**; Oberegelsbacher, Claudia; Pfannenstiel, Jens; Huber, Armin. Identifikation and charakterisation of transient receptor potential (TRP) phosphorylation sites. In: 22th European *Drosophila* Research Conference (EDRC), Lissabon, Sept. 21-24.

**Jonas-Peter Bartels**, Olaf Voolstra, and Armin Huber (2012). The *Drosophila* TRP ion channel is light-dependently phosphorylated by several kinases. Auf der 35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Dresden, 21.-24. März, 2012

**Jonas-Peter Bartels**, Susanne Schotthöfer, Armin Huber, and Olaf Voolstra (2013). Kinases and phosphatases of the *Drosophila* TRP ion channel. In: International Joint Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) and the German Society for Developmental Biology (GfE), Heidelberg, März 20 -23, 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summery</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Die visuelle Signaltransduktionskaskade von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>5</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Das <i>Drosophila melanogaster</i> Komplexauge</b> .....	<b>5</b>
3.1.2	Die Phototransduktion von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
<b>3.2</b>	<b>Der TRP-Kanal</b> .....	<b>9</b>
3.2.1	Die Phosphorylierung des TRP-Kanals .....	10
<b>3.3</b>	<b>Das Elektretinogramm (ERG)</b> .....	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>Kinasen und Phosphatasen</b> .....	<b>14</b>
3.4.1	Kinasen .....	14
3.4.2	Phosphatasen .....	16
<b>3.5</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Material</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Chemikalien</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2</b>	<b>Verbrauchsmaterial</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Nährmedien für <i>Drosophila</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Verwendete <i>Drosophila melanogaster</i>-Stämme</b> .....	<b>27</b>
<b>4.6</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>34</b>
<b>4.7</b>	<b>Kits</b> .....	<b>35</b>
<b>4.8</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Bakterienstämme</b> .....	<b>35</b>
<b>4.10</b>	<b>Medien und Agarplatten für Bakterien</b> .....	<b>36</b>
<b>4.11</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>36</b>
4.11.1	Vektorprimer .....	36
4.11.2	Primer für die Sequenzierung der <i>trp</i> -Fragmente .....	37
4.11.3	Mutagenese Primer .....	37
<b>4.12</b>	<b>Vektoren</b> .....	<b>37</b>
<b>4.13</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>39</b>
4.13.1	Allgemeine Geräte.....	39
4.13.2	Elektrophysiologie .....	40
<b>4.14</b>	<b>Datenbanken</b> .....	<b>41</b>
<b>4.15</b>	<b>Software</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>42</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>5.1 Biochemische Methoden</b> .....	<b>42</b>
5.1.1 Proteinextrakt-Herstellung aus <i>Drosophila melanogaster</i> -Köpfen.....	42
5.1.1.1 Herstellung eines definiert belichteten Kopfextraktes.....	42
5.1.1.2 Herstellung eines definiert unbelichteten Kopfextraktes.....	42
5.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
5.1.3 Western Blot-Analyse.....	43
5.1.3.1 Westernblotting (Semi Dry).....	44
5.1.3.2 Westernblotting (Tankblotting).....	44
5.1.4 Immunopräzipitation aus <i>Drosophila melanogaster</i> -Protein-extrakten .....	44
<b>5.2 Immunzytochemie</b> .....	<b>45</b>
5.2.1 Herstellung von isolierten Ommatidien .....	45
5.2.2 Gefrierschnittherstellung von <i>Drosophila melanogaster</i> -Augen .....	46
5.2.2.1 Präparation der <i>Drosophila melanogaster</i> -Köpfe .....	46
5.2.2.2 Anfertigung der Gefrierschnitte .....	46
5.2.2.3 Antikörpermarkierung und Auswertung der Gefrierschnitte.....	47
<b>5.3 In vivo Dephosphorylierungsexperiment</b> .....	<b>47</b>
<b>5.4 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>47</b>
5.4.1 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen (Rubidium-chlorid-Methode)...	47
5.4.2 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente <i>E.coli</i> Bakterien .....	48
5.4.3 DNA-Präparation.....	48
5.4.4 DNA-Restriktionsverdau.....	48
5.4.5 DNA-Auftrennung mittels Agarosegel.....	49
5.4.6 DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel .....	49
5.4.7 DNA-Mutagenese.....	49
5.4.8 DNA-Ligation.....	50
5.4.9 Gateway-Klonierung.....	50
5.4.10 Plasmid-DNA-Fällung .....	51
<b>5.5 Arbeitsmethoden mit <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>51</b>
5.5.1 Haltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	51
5.5.2 Herstellung transgener <i>Drosophila melanogaster</i> .....	51
5.5.2.1 Injektion der transgenen DNA in <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen.....	51
5.5.2.2 Identifikation und Vermehrung der transgenen Fliegen.....	52
5.5.3 Kreuzungen mit <i>Drosophila melanogaster</i> .....	52
5.5.3.1 Mappingkreuzungen .....	53
5.5.3.2 Herstellung einer homozygoten transgenen Fliege im <i>trp</i> <sup>343</sup> -Hintergrund.....	54
5.5.3.3 Herstellung einer homozygoten transgenen Fliege im <i>trp</i> <sup>302</sup> ; <i>trp</i> <sup>343</sup> -Hintergrund.....	54
5.5.3.4 Austausch des 2. Chromosoms der <i>primo-2</i> -Mutante .....	55

## Inhaltsverzeichnis

5.5.3.5	Herstellung einer <i>yw; inaC<sup>P209</sup>; pkc53e-RNAi/gmr&gt;Gal4</i> -Mutante .....	55
<b>5.6</b>	<b>Elektroretinographische Messungen an <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>56</b>
5.6.1	Aufbau der ERG-Messapparatur .....	56
5.6.2	Die Stimulus Protokolle der ERG-Messungen .....	57
5.6.2.1	Messung eines einzelnen Orangelichtstimulus .....	57
5.6.2.2	OBBOO-Messung.....	57
5.6.2.3	Messung einer Reiz-Antwort-Kurve .....	57
5.6.2.4	Messung zur Bestimmung der Refraktärzeit .....	58
5.6.2.5	Messung zur Ermittlung der Adaptation .....	58
<b>5.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Screen zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals in <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>59</b>
6.1.1	Linearitätsanalyse der phosphospezifischen Antikörper $\alpha$ -pT849, $\alpha$ -pT864, $\alpha$ -pS936 und des $\alpha$ -TRP-Antikörpers.....	59
6.1.2	Ergebnisse des Screens zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals.....	61
6.1.3	Die signifikante Beeinflussung des Phosphorylierungsniveaus des TRP-Kanals durch Kinasen und Phosphatasen.....	71
6.1.4	Charakterisierung der im Screen identifizierten Phosphatase- und Kinasevarianten .....	73
6.1.4.1	TRP-Lokalisation in der Photorezeptorzelle in den identifizierten Kinase und Phosphatase Mutanten.....	73
6.1.4.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der identifizierten Kinase- und Phosphatase-Mutanten .....	75
6.1.4.3	Test der identifizierten Kinase-Mutanten für die Phosphorylierungsstelle T849 auf Proteinkinase C-Expression.....	77
6.1.4.4	Auswertung der Elektroretinogramme der identifizierten Kinase- und Phosphatase-Mutanten des TRP-Kanals.....	78
6.1.5	Zusammenfassung der Screen Ergebnisse.....	79
<b>6.2</b>	<b>Die Kinasen für die Phosphorylierungsstelle T849</b> .....	<b>80</b>
6.2.1	PKC53E(br) als alternative Kinase für die Phosphorylierungs-stelle T849.....	80
6.2.2	Gal4-Treiberstamm- und PKC53E(br)-RNAi-Test.....	80
6.2.3	Untersuchung der TRP-Phosphorylierung einer <i>inaC;pkc53e-RNAi</i> -Fliege .....	82
6.2.4	Elektroretinographische Untersuchung der PKC-Doppelnulld-mutante.....	84
<b>6.3</b>	<b>Untersuchung der Phosphorylierungsstelle S936</b> .....	<b>86</b>
6.3.1	Lokalisation von TRP und RDGC in der <i>rdgC<sup>306</sup></i> -Mutante .....	86
6.3.2	Untersuchung der Phosphorylierungsniveaus verschiedener RDGC-Mutanten .....	87
6.3.3	Elektrophysiologische Untersuchung der <i>rdgC<sup>306</sup></i> -Mutante .....	90
6.3.4	Calciumabhängigkeit der Dephosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S936 .....	93

## Inhaltsverzeichnis

<b>6.4</b>	<b>Herstellung der transgenen Fliegen <i>trp</i><sup>T849A</sup>, <i>trp</i><sup>T849D</sup> und <i>trp</i><sup>S936D</sup> .....</b>	<b>94</b>
<b>6.5</b>	<b>Charakterisierung der transgenen Fliegen TRP_T849A, TRP_T849D und TRP_S936D .....</b>	<b>98</b>
6.5.1	Expressionsniveau der mutierten TRP-Kanäle .....	98
6.5.2	Multimerisierungstest der mutierten TRP-Kanäle .....	100
6.5.3	Interaktionstest der mutierten TRP-Kanäle mit dem Gerüstprotein INAD.....	101
6.5.4	Subzelluläre Lokalisation der transgen exprimierten TRP-Kanäle .....	102
6.5.5	Expression der Komponenten der Phototransduktionskaskade in den transgenen Fliegen.....	103
6.5.6	Herstellung von transgenen Fliegen ohne natives TRP und TRPL .....	104
<b>6.6</b>	<b>Elektroretinogramme aller mutierten TRP-Mutanten .....</b>	<b>106</b>
6.6.1	Bestimmung der Reiz-Antwort-Kurve aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten .....	108
6.6.2	Bestimmung der Refraktärzeit aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten.....	110
6.6.3	Untersuchung der Adaptationsfähigkeit aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten.....	113
6.6.4	Ermittlung der Inaktivierung während eines Lichtreizes aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten.....	117
6.6.5	Bestimmung der halben Deaktivierungszeit aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten ...	118
6.6.6	Zusammenfassung der ERG-Ergebnisse aller transgenen <i>trp</i> -Mutanten .....	119
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
<b>7.1</b>	<b>Screen zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals in <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>121</b>
7.1.1	Die Kinasen der Phosphorylierungsstelle T849 .....	122
7.1.2	Die Kinasen und Phosphatasen der Phosphorylierungsstelle T864.....	125
7.1.3	Die potenzielle Phosphatase der Phosphorylierungsstelle S936 .....	127
<b>7.2</b>	<b>Einfluss der Phosphorylierung des TRP-Kanals an den Stellen T849 und S936 auf dessen physiologische Funktion.....</b>	<b>129</b>
<b>7.3</b>	<b>Regulierungsmodell des TRP-Kanals.....</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>152</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>153</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Phototransduktionskaskade im Auge von *Drosophila melanogaster* mündet in der Öffnung der beiden Ionenkanäle TRP und TRPL. Der hierdurch hervorgerufene intrazelluläre Anstieg der Natrium- und Calciumionenkonzentration führt zur Ausbildung des Photorezeptorpotentials. Der TRP-Kanal unterliegt dabei einer lichtabhängigen Phosphorylierung, wobei 15 seiner Phosphorylierungsstellen eine verstärkte Phosphorylierung im Licht zeigen und eine Phosphorylierungsstelle eine verstärkte Phosphorylierung im Dunkeln aufweist. Zu Beginn dieser Arbeit waren weder die Funktion der lichtabhängigen TRP-Phosphorylierung, noch die an ihr beteiligten Kinasen und Phosphatasen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb nach Kinasen und Phosphatasen gesucht, die das Phosphorylierungsmuster des TRP-Kanals beeinflussen. Hierzu wurde ein Kandidaten-Screen mit 79 Kinase- und Phosphatasemutanten durchgeführt unter Verwendung von drei phosphospezifischen Antikörpern. In dem Screen wurden acht Kinasen und eine Phosphatase identifiziert, die die Phosphorylierung einer oder mehrerer der drei untersuchten Phosphorylierungsstellen beeinflussen. So zeigten die Mutanten der augenspezifischen Proteinkinase C (ePKC) und der Proteinkinase C 53E (PKC53E) eine verringerte Phosphorylierung an der Stelle T849 des TRP-Kanals, während die Mutanten der Kinase Rolled und der  $\alpha$ -Untereinheit der AMP-abhängigen Kinase eine erhöhte Phosphorylierung an dieser Stelle zeigten. Die Mutanten der Caseinkinase I $\alpha$ , Licorne, Tao und Metallophosphoesterase (MPPE) zeigten hingegen an der Phosphorylierungsstelle T864 eine verringerte Phosphorylierung. Die Nullmutante der Phosphatase Retinal Degeneration C (RDGC) zeigte eine drastisch verstärkte Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S936.

Von den identifizierten Kinase- und Phosphatasemutanten wiesen nur die Mutanten der Kinase ePKC und der Phosphatase RDGC bei ERG-Messungen Auffälligkeiten in Form einer bereits beschriebenen langsamen Deaktivierung der Lichtantwort auf. Zur Klärung der Frage, ob die veränderte Phosphorylierung des TRP-Kanals in den Mutanten der ePKC beziehungsweise der RDGC der Grund für die verlängerte Deaktivierung der Lichtantwort ist, wurden transgene Fliegen hergestellt, die modifizierte TRP-Kanäle exprimieren. Hierzu wurden die ePKC-abhängige Phosphorylierungsstelle T849 oder die RDGC-abhängige Phosphorylierungsstelle S936 des TRP-Kanals durch die Aminosäure Alanin oder Asparaginsäure ersetzt. Die biochemische Analyse dieser vier transgenen Fliegen offenbarte wildtypische Eigenschaften der modifizierten Kanäle in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation, die Interaktion mit dem Gerüstprotein INAD, die Multimerisierung und die

## Zusammenfassung

Expressionsrate. Elektrophysiologische Untersuchungen dieser transgenen Fliegen zeigten hingegen eine Verlängerung der Deaktivierungszeit im ERG sowohl durch den Austausch von T849 zu Alanin als auch durch den Austausch von S936 zu Asparaginsäure. Während der Austausch von Serin oder Threonin zu Alanin eine Phosphorylierung verhindert, wirkt der Austausch zu Asparaginsäure in der Regel phosphomimetisch. In der Wildtypsituation liegt T849 im Licht phosphoryliert und im Dunkeln dephosphoryliert vor, während bei S936 genau das Gegenteil der Fall ist. Die Aminosäureaustausche an den beiden Phosphorylierungsstellen ahmen also den Phosphorylierungszustand in dunkeladaptierten Wildtyp-Fliegen nach.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse die Beteiligung von acht Kinasen und einer Phosphatase an der Einstellung des Phosphorylierungszustands des TRP-Kanals. Zwei der Phosphorylierungsstellen des TRP-Kanals vermitteln die schnelle Deaktivierung der Lichtantwort.

## 2 Summery

The phototransduction cascade in the eye of *Drosophila melanogaster* culminates in the opening of the ion channels TRP and TRPL. The hereby increased intracellular concentration of sodium and calcium ions underlies the formation of the photoreceptor potential. The TRP channel is subject to light-dependent phosphorylation. 15 of its phosphorylation sites exhibit increased phosphorylation upon illumination and one phosphorylation site exhibits increased phosphorylation in the dark. When this work was started, neither the function of light-dependent TRP phosphorylation nor the involved kinases and phosphatases were known.

Therefore, in the present work, kinases and phosphatases that affect the phosphorylation pattern of the TRP channel were identified. Towards this end a candidate screen of 79 kinase and phosphatase mutants was performed using three different phosphospecific antibodies. In this screen, eight kinases and one phosphatase were identified that affect the phosphorylation of one or more of the three tested phosphorylation sites. Eye-specific protein kinase C (ePKC) and protein kinase C 53E (PKC53E) mutants exhibited reduced phosphorylation at T849 of the TRP channel, while mutants of the Rolled kinase and the  $\alpha$ -subunit of AMP-dependent kinase showed an increased phosphorylation at this site. The mutants of Casein kinase I $\alpha$ , Licorne, Tao, and Metallophosphoesterase (MPPE) exhibited reduced phosphorylation of the site T864. The retinal degeneration C (RDGC) phosphatase null mutant demonstrated a dramatically increased phosphorylation at the phosphorylation site S936.

From these identified kinase and phosphatase mutants, only the mutants of the kinase ePKC and of the phosphatase RDGC displayed physiological abnormalities in terms of an already described slow deactivation of the light response in ERG measurements. To answer the question whether the altered phosphorylation of the TRP ion channel in the ePKC and RDGC mutants underlies the prolonged deactivation of the light response, transgenic flies were generated that express modified TRP channels. To this end, the ePKC-dependent TRP phosphorylation site T849 or the RDGC-dependent phosphorylation site S936 of the TRP channel were replaced by the amino acid alanine or aspartic acid. The biochemical analysis of these four transgenic flies revealed wild type characteristics of the modified channels with respect to subcellular localization, the interaction with the scaffold protein INAD, multimerization, and the expression rate. However, electrophysiological studies of these transgenic flies revealed a prolonged deactivation time when T849 was exchanged to alanine and in addition S936 was exchanged to aspartic acid. Whereas the exchange of a serine or threonine to alanine prevents phosphorylation, the exchange to aspartic acid typically mimics phosphorylation of this site. In the wild type situation, T849 is phosphorylated in the light and

## Summery

becomes dephosphorylated in the dark whereas for S936 the exact opposite is the case. The amino acid exchanges at the two phosphorylation sites thus mimic the phosphorylation pattern of dark-adapted wild type flies.

In summary, the results demonstrate the involvement of eight kinases and one phosphatase in generating of the phosphorylation pattern of the TRP ion channel. Two of the phosphorylation sites of the TRP ion channel mediate a rapid deactivation of the light response.

### 3 Einleitung

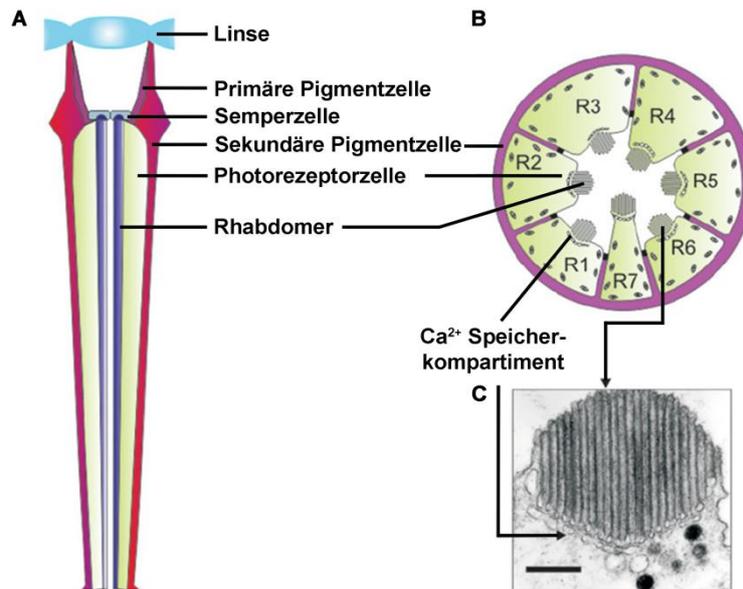
Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein in allen Organismen sehr weit verbreiteter Mechanismus zur Regulation von Signaltransduktionskaskaden, wie z. B. in enzymgekoppelten Signalwegen mit der Rezeptor-Tyrosinkinase, die sich bei Aktivierung durch ihren Liganden selbst phosphoryliert. Dadurch wird die Bindung von Signalproteinen in einer SH2-Domäne ermöglicht, die das Signal anschließend weiterleiten und verschiedene Wachstumsfaktoren aktivieren können (Marshall, 1995). Auch bei der visuellen Signaltransduktion von *Drosophila melanogaster* spielen Phosphorylierungen eine wichtige Rolle. Dieser Organismus eignet sich besonders gut, um diese Mechanismen zu untersuchen, da es relativ einfach ist Mutanten herzustellen, denen verschiedene Kinasen bzw. Phosphatasen fehlen oder auch Mutanten, in denen durch Austausch einzelner Aminosäuren Phosphorylierungsstellen verändert wurden. Zusätzlich sind die meisten Signaltransduktionskaskaden von *Drosophila melanogaster* sehr stark konserviert (Katz and Minke, 2009) und so können hier erlangte Erkenntnisse eventuell auf höher entwickelte Organismen übertragen werden.

#### 3.1 Die visuelle Signaltransduktionskaskade von *Drosophila melanogaster*

##### 3.1.1 Das *Drosophila melanogaster* Komplexauge

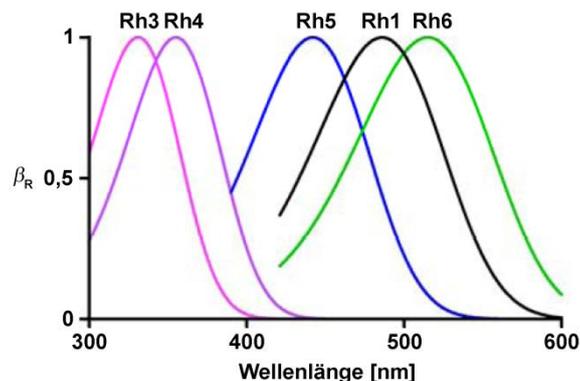
Das paarig angelegte Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besteht aus etwa 800 einzelnen hexagonal angeordneten Ommatidien (Ready et al., 1976), wobei jedes Ommatidium wiederum aus 26 Zellen besteht (Kumar, 2012); Abb. 3.1A). Acht dieser Zellen sind die Photorezeptorzellen (C. H. Waddington and Margaret M. Perry, 1960; Abb. 3.1B), die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Zum einen in die äußeren Photorezeptorzellen R1-R6, in denen das Rhodopsin 1 (Rh1), kodiert durch das Gen *ninaE*, exprimiert wird (O'Tousa et al., 1985; Zuker et al., 1985) und zum anderen in die beiden inneren Photorezeptorzellen R7 und R8 (Harris et al., 1976), die wiederum die Rhodopsine 3 (Rh3) oder 4 (Rh4) in den Zellen R7 (Fryxell and Meyerowitz, 1987; Montell et al., 1987) und entweder 5 (Rh5) oder 6 (Rh6) in der Zelle R8 exprimieren (Feiler et al., 1992; Montell et al., 1987; Papatsenko et al., 1997; Salcedo et al., 1999). Die Rhodopsine sind zusammen mit dem Rest der visuellen Signaltransduktionskaskade im Rhabdomer lokalisiert (Abb. 3.1C), das aus etwa 30.000 Mikrovilli besteht.

## Einleitung



**Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Photorezeptors von *Drosophila melanogaster*.** A: Zeigt einen schematischen Längsschnitt durch einen Photorezeptor. B: Zeigt einen schematischen Querschnitt durch den Photorezeptor, der die Anordnung der acht Photorezeptorzellen zeigt, wobei die 8. Photorezeptorzelle nicht dargestellt ist, da diese unterhalb der 7. Photorezeptorzelle lokalisiert ist. C: Zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Rhabdomers. (Verändert nach Hardie et al., 2012)

Diese fünf Rhodopsine decken mit ihren Absorptionsspektren den größten Teil des für den Menschen sichtbaren Lichts von 400 nm bis 780 nm ab (Palczewski, 2012). Mit der Ausnahme, dass *Drosophila melanogaster* kein langwelliges rotes Licht sehen, wohingegen sie aber Licht im kurzwelligen UV-Bereich wahrnehmen kann (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2 Absorptionsspektren der Rhodopsine der Komplexaugen von *Drosophila melanogaster*:** Gezeigt sind die Absorptionsspektren der fünf im Auge von *Drosophila melanogaster* exprimierten Rhodopsine, wobei die Photosensitivität ( $\beta$ ) gegen die Wellenlänge des sichtbaren Lichts [nm] aufgetragen wurde. Die pinkfarbene Linie zeigt das Absorptionsspektrum von Rhodopsin 3 (Rh3), die violette Linie dasjenige von Rhodopsin 4 (Rh4), die blaue Linie das von Rhodopsin 5 (Rh5), die schwarze Linie das des Hauptrhodopsins 1 (Rh1) und die grüne Linie das von Rhodopsin 6 (Rh6) (Verändert nach (Belusic, 2011)).

### 3.1.2 Die Phototransduktion von *Drosophila melanogaster*

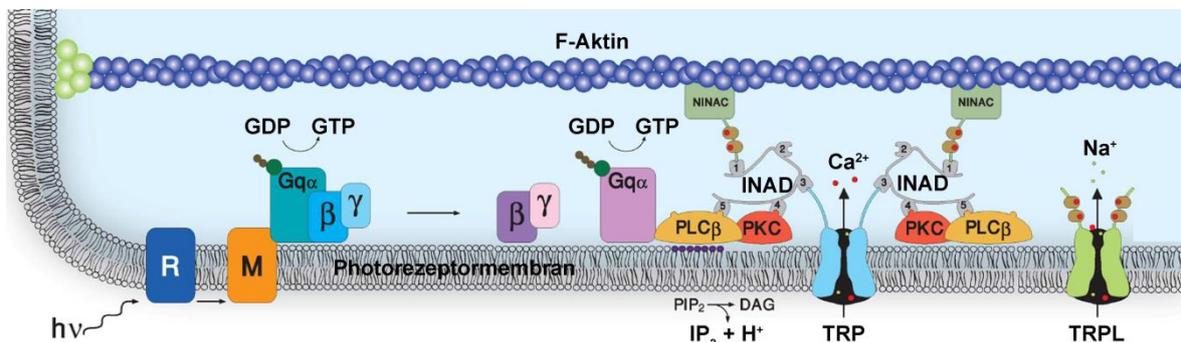
Die visuelle Phototransduktionskaskade von *Drosophila melanogaster* ist vollständig an und in der rhabdomerischen Membran der Photorezeptorzellen lokalisiert und wandelt das physikalische Signal eines Photons in ein elektrisches und in diesem Fall chemisches durch

## Einleitung

den Fluss von Ionen generiertes Signal der Photorezeptorzelle um (siehe Abb. 3.3). Sie gehört zu den schnellsten G-Proteingekoppelten Signalkaskaden die wir kennen, die in weniger als 25 Millisekunden aktiviert wird (Ranganathan et al., 1991). Am Anfang dieser Kaskade steht das Rhodopsin (R), das aus einem Proteinteil, dem Opsin und einem Chromophor, dem 11-*cis*-3-Hydroxyretinal (Vogt and Kirschfeld, 1984; Wald, 1936) aufgebaut ist. Das Rhodopsin bzw. der Chromophor 11-*cis*-3-Hydroxyretinal reagiert auf eine Absorption eines Photon ( $h\nu$ ) mit einer *cis-trans*-Isomerisierung zu all-*trans*-3-Hydroxyretinal (Bownds and Wald, 1965), wodurch sich die Konformation des Opsins ändert, um sich in die aktive Form das sogenannte Metarhodopsin (M) umzuwandeln (Stryer, 1986). Diese Konformationsänderung führt zur direkten Aktivierung des gekoppelten  $G_q$ -Proteins (Emeis et al., 1982; Talluri et al., 1995), wobei GDP zu GTP (Gilman, 1987) umgewandelt wird, wodurch sich die  $\alpha$ - ( $G_{q\alpha}$ ) und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit (UE) des  $G_q$ -Proteins voneinander lösen. Die  $\alpha$ -UE aktiviert daraufhin das zentrale Effektor-Enzym dieser Kaskade, die Phospholipase  $C\beta$  (PLC) (Bloomquist et al., 1988), die daraufhin das in der Membran befindliche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in das ebenfalls membranassoziierte Diacylglycerol (DAG) und das zytosolische Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) hydrolysiert (Lee et al., 1994), was zur anschließenden Öffnung des TRP-Kanals führt (Peretz et al., 1994). Wie der TRP-Kanal letztlich aktiviert wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt dazu aber mehrere prominente Theorien. Zum einen gibt es Evidenzen, dass der lokale Abfall des pH-Wertes durch die Hydrolyse von  $PIP_2$ , bei der ein Proton freigesetzt wird, zusammen mit einer Verminderung der  $PIP_2$ -Menge zur Öffnung der TRP-Kanals führt (Huang et al., 2010). Die andere Theorie besagt, dass der TRP-Kanal mechanosensitiv ist. Es kommt durch die lokal veränderte Zusammensetzung der Plasmamembran durch die Hydrolyse von  $PIP_2$  zu DAG zu einer Bewegung in der Membran, die zu einem Zusammensinken des gesamten Ommatidiums führt, was wiederum die Öffnung des Kanals nach sich zieht (Hardie and Franze, 2012). Eine weitere sehr weit verbreitete Theorie ist die, dass mehrfach ungesättigten Fettsäuren sogenannte PUFAs („polyunsaturated fatty acids“: PUFA), die als Abbauprodukte des  $PIP_2$  Hydrolyseprodukts DAG anfallen, (Hardie and Postma, 2008), den TRP-Kanal öffnen. Die ersten Hinweise darauf gaben *in vitro* Experimente an S2-Zellen, in denen gezeigt werden konnte, dass PUFAs die Öffnung der Kanäle stimulieren (Chyb et al., 1999). Auch Patch-Clamp-Messungen, bei denen die Zugabe von DAG zu einer erhöhten TRPL-Aktivität führte, stützen die Theorie, dass PUFAs TRP-Kanäle öffnen können (Estacion et al., 2001; Lev et al., 2012). Eine neuere Arbeit, in der die Rhabdomere von Ommatidien direkt mittels Patch-Clamp-Methoden abgeleitet wurden, deutet hingegen darauf hin, dass weder die Abnahme von  $PIP_2$  noch von PUFAs oder Protonen einen Einfluss auf die Öffnung des TRP-Kanal haben, sondern dass DAG als endogener Agonist für den TRP-Kanal dient (Delgado et al., 2014).

## Einleitung

Durch den mittels der Signaltransduktionskaskade geöffneten TRP-Kanal strömen daraufhin Natrium ( $\text{Na}^+$ )- und Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in die Photorezeptorzelle ein und bewirken somit eine Depolarisation (Pak and Pinto, 1976), die dann zur Synapse der Photorezeptorzelle weitergeleitet wird. Bereits ein einziges absorbiertes Photon reicht aus, um die Signalkaskade zu aktivieren und ein messbares elektrisches Signal einen sogenannten Quantum bump zu erzeugen (Nikolic et al., 2010). Die Signalweiterleitung von der Absorption eines Photon bis zur Depolarisation der Zelle geschieht in *Drosophila melanogaster* extrem schnell, da ihre Komponenten: die PLC, der TRP-Kanal, der dann auch als Membrananker für diesen Komplex dient und die Protein Kinase C durch das Gerüstprotein INAD („inactivation no afterpotential“ D) räumlich sehr dicht zueinander fixiert sind. Um das INAD im Photorezeptor zu fixieren, ist es durch das Protein NINAC zusätzlich am Zytoskelett befestigt (Huber, 2001; Li and Montell, 2000). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Photorezeptor führt dann zur Aktivierung der Proteinkinase C (Takai et al., 1979) und des TRPL-Kanals (Agam et al., 2004), der seinerseits ein nicht selektiver Kationenkanal ist. Außerdem führt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Deaktivierung der PLC, was die Deaktivierung der Signaltransduktionskaskade zur Folge hat (Ranganathan et al., 1991; Scott et al., 1997).

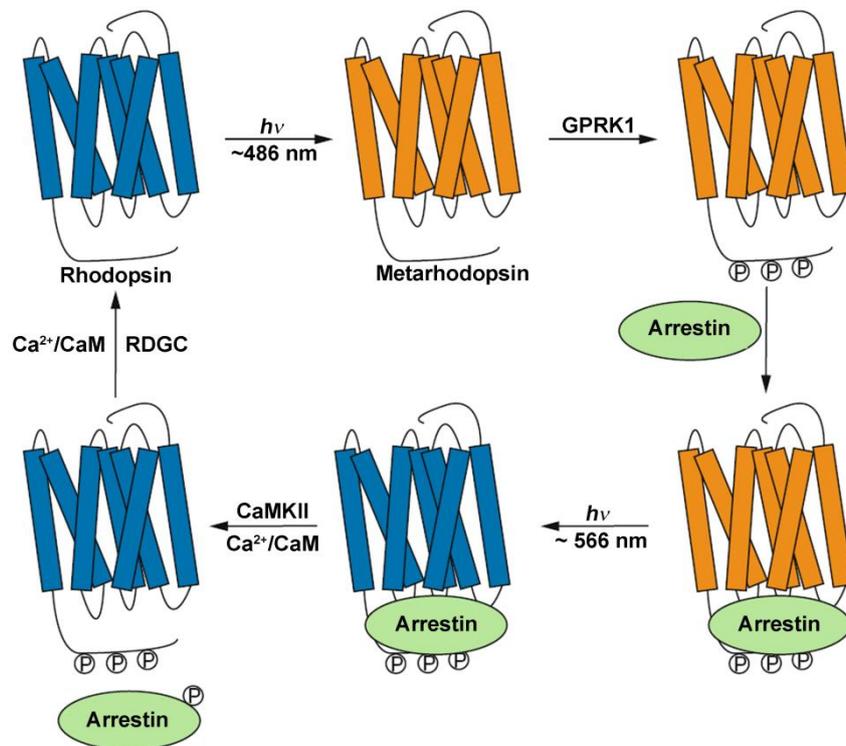


**Abbildung 3.3: Die visuelle Signaltransduktionskaskade von *Drosophila melanogaster*.** Schematische Darstellung der Umwandlung von Rhodopsin (R) zu Metarhodopsin (M), der anschließenden Weiterleitung durch das  $\text{Gq}\alpha$ -Protein an den Signalkomplex mit INAD und den daran gebundenen PLC, das daraufhin  $\text{PIP}_2$  in DAG und  $\text{IP}_3$  spaltet, wobei ein Proton frei wird (hierbei ist zu beachten, dass entgegen der Darstellung dieser Abbildung dieser Prozess intrazellulär abläuft). Die Hydrolysierung führt zur Öffnung des ebenfalls an das INAD gebundenen TRP-Kanals und des TRPL-Kanals. Der darauf folgende Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Einstrom führt dann Aktivierung der, ebenfalls an das INAD gebundenen, PKC. Das an das INAD gebundene NINAC dient zur Fixierung des Signalkomplexes an das F-Aktin des Zytoskeletts (F-Aktin) (Verändert nach Katz et al., 2009).

Auch das Rhodopsin muss nach Aktivierung wieder abgeschaltet und erneut verfügbar gemacht werden (Abb. 3.4). Die Aktivierung des Rhodopsins erfolgt durch die Absorption eines Photons mit idealer Weise der Wellenlänge von etwa 486 nm, wobei aber auch Licht, das weiter außerhalb der maximalen Absorption liegt, wie z.B. orangefarbiges Licht, das Rhodopsin aktivieren kann. Bei der Aktivierung von Rhodopsin wird das darin enthaltene 11-*cis*-3-Hydroxyretinal dadurch eine Isomerisierung zum all-*trans*-3-Hydroxyretinal (Tanimura et al., 1986) umgewandelt. Das so entstandene Metarhodopsin wird daraufhin durch die G-Proteingekoppelte Rezeptorkinase 1 (GPRK1) phosphoryliert (Lee et al., 2004)

## Einleitung

und durch die folgende Arrestin2-Bindung inaktiviert (Byk et al., 1993; Ranganathan and Stevens, 1995). Dieser Arrestin2/Metarhodopsin-Komplex ist wiederum lichtsensitiv und das darin enthaltene all-*trans*-3-Hydroxyretinal kann sich bei der Absorption eines Photons mit der idealen Wellenlänge von ca. 566 nm wieder zum 11-*cis*-3-Hydroxyretinal zurückbilden. Das Arrestin des so entstandenen Arrestin2/Rhodopsin-Komplex wird daraufhin durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Kinase II phosphoryliert (Kahn and Matsumoto, 1997), woraufhin sich das Arrestin vom phosphorylierten Rhodopsin löst (Alloway and Dolph, 1999). Im letzten Schritt wird das jetzt noch phosphorylierte Rhodopsin durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Phosphatase RDGC dephosphoryliert und steht der Photorezeptorzelle somit wieder in seiner nicht phosphorylierten Form zur Verfügung.



**Abbildung 3.4 Der Rhodopsin-1-Zyklus von *Drosophila melanogaster*:** Blaues Licht mit der Wellenlänge von ungefähr 486 nm aktiviert das Rhodopsin 1, das sich daraufhin zu Metarhodopsin umwandelt. Anschließend wird das Metarhodopsin durch die G-Proteingekoppelte Rezeptorkinase 1 (GPRK1) phosphoryliert, woraufhin sich Arrestin an das phosphorylierte Metarhodopsin bindet. Dieser Komplex reagiert bei einer Orangebelichtung mit einer Wellenlänge von etwa 566 nm mit einer erneuten Konformationsänderung von Metarhodopsin zu Rhodopsin, in dem das enthaltene all-*trans*-3-Hydroxyretinal erneut eine Isomerisierung zu 11-*cis*-3-Hydroxyretinal vollzieht. Durch die anschließende Calcium/Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM)-abhängige Phosphorylierung von Arrestin durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Kinase II löst sich das Arrestin wieder vom Rhodopsin. Daraufhin wird das Rhodopsin von der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängigen Phosphatase RDGC dephosphoryliert und ist somit wieder in seiner nicht phosphorylierten Form verfügbar (Wang and Montell, 2007).

### 3.2 Der TRP-Kanal

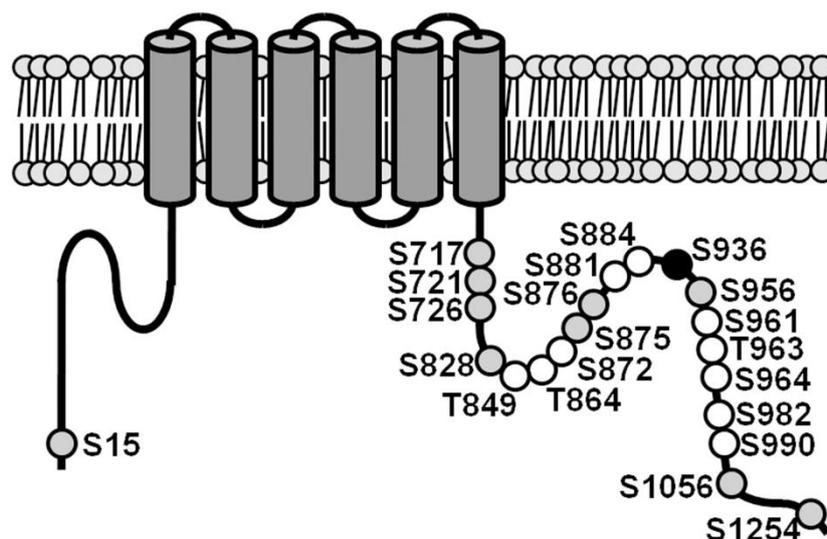
Entdeckt wurde der Kanal durch den sehr auffälligen Phänotyp seiner Null-Mutante bei elektoretinographischen Messungen in *Drosophila melanogaster*. Trotz andauernder

Belichtung konnte eine vollständige Repolarisation des Rezeptorpotentials beobachtet werden (Cosens and Manning, 1969), die etwas später als „*transient receptor potential*“ beschrieben wurde, was dann auch schließlich namensgebend für den TRP-Kanal war (Minke et al., 1975a). Zusätzlich zum TRP-Kanal wurde noch ein weiterer Kanal identifiziert, der in *Drosophila melanogaster* lichtabhängig aktiviert wird, nämlich der TRPL-Kanal (Phillips et al., 1992). Der TRP- und der TRPL-Kanal haben wie alle anderen TRP-Kanäle auch sechs Transmembrandomänen (TM), einen zytosolischen N- und C-Terminus und bestehen aus einem Tetramer, das sich aus vier gleichen Untereinheiten (UE) aufbaut (Katz et al., 2013), bei denen jeweils die Transmembrandomänen fünf und sechs das porenbildende Element darstellen (Owsianik et al., 2006). Der so entstandene Kanal ist selektiv für Kationen. Es konnten inzwischen alleine in Säugern 28 unterschiedliche Isoformen des TRP-Kanals identifiziert werden und 17 weitere in Würmern und Fliegen, wobei alle TRP-Kanäle basierend auf ihrer Aminosäuresequenz in sieben Unterfamilien eingeteilt wurden (Montell et al., 2002; Venkatachalam and Montell, 2007): in die „klassischen“ TRP-Kanäle (TRPCs), zu denen auch die *Drosophila melanogaster* TRP-Kanäle TRP, TRPL und TRP $\gamma$  gehören, dann mit den „neuen“ TRP-Kanälen die TRPNs-, die TRPM-, TRPV-, TRPA-, TRPP- und schließlich in die TRPML-Kanäle. In den meisten Organismen sind die TRP-Kanäle für die Wahrnehmung von externen sensorischen Reizen, wie zum Beispiel Hitze (TRPV1; (Tominaga et al., 1998)), Kälte (TRPA1 und TRPM8; (McKemy, 2005)) oder bei extremen Reizen auch Schmerz (TRPV1, TRPA1, TRPM8; (Stucky et al., 2009) verantwortlich. TRP-Kanäle sind aber auch an der Wahrnehmung von internen Reizen wie oxidativem Stress (z.B.: TRPM7; Miller and Zhang, 2011) beteiligt. Die Mutation von TRP-Kanälen im Menschen führt zu den verschiedensten Krankheiten wie Nachtblindheit, neurodegenerativen Erkrankungen oder chronischen Schmerzen (Nilius and Owsianik, 2010).

### 3.2.1 Die Phosphorylierung des TRP-Kanals

Es ist bereits für andere TRP-Kanäle bekannt, dass sie durch Phosphorylierung beeinflusst werden können. So wird zum Beispiel der TRPC1-Kanal in Endothelzellen durch die Phosphorylierung der PKC aktiviert (Ahmed et al., 2004), wohingegen der TRPC6-Kanal negativ durch eine PKC reguliert wird (Zhang and Saffen, 2001). Es werden aber nicht nur TRP-Kanäle der TRPC-Familie durch Phosphorylierung reguliert. Beispielsweise wird der TRP-Kanal TRPV1, der für die Hitzewahrnehmung verantwortlich ist, durch die Phosphorylierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Kinase II erst sensitiv für seinen Liganden Capsaicin (Novakova-Tousova et al., 2007), wobei eine zusätzliche Phosphorylierung durch die PKC und Proteinkinase A (PKA) diese Affinität zu Capsaicin noch zusätzlich erhöht und nebenbei auch die Sensitivität für Hitze steigert (Rathee et al., 2002; Vellani et al., 2001). Für den *Drosophila melanogaster* TRP-Kanal konnte gezeigt werden, dass es sich um einen calciumleitenden Kanal handelt (Montell and Rubin, 1989),

der lichtabhängig geöffnet wird (Hardie and Minke, 1992; ASHER PERETZ, 1994; Peretz et al., 1994). Nach der lichtabhängigen Aktivierung des TRP-Kanals und dem darauf folgenden Calcium-Einstrom kommt es zur Phosphorylierung des TRP-Kanals an den zehn Aminosäuren (AS) Threonin (T) 849, T864, Serin (S) 872, S881, S884, S961, T963, S964, S982 und S990 und zur Dephosphorylierung an der AS S936 durch bisher unbekannte Kinasen und Phosphatasen (Abb. 3.5) (Voolstra et al., 2010b; Voolstra et al., 2013). *In vitro* Experimente deuten darauf hin, dass die Protein Kinase C, die genauso wie der TRP-Kanal auch am INAD befestigt ist, den TRP-Kanal und auch das Gerüstprotein INAD selber phosphoryliert kann (Huber et al., 1996b; Voolstra et al., 2013), was inzwischen auch *in vivo* für den TRP-Kanal gezeigt werden konnte (Voolstra et al., 2013). Es gibt auch noch zehn weitere bekannte Phosphorylierungsstellen am TRP-Kanal, die allerdings lichtunabhängig phosphoryliert werden (Voolstra et al., 2013). Diese Fülle an Phosphorylierungsstellen lässt den Schluss zu, dass Phosphorylierungen an diesem Kanal wichtig für dessen Aktivität oder Stabilität sein könnten.



**Abbildung 3.5 Die Phosphorylierungsstellen des TRP-Kanals von *Drosophila melanogaster*:** Der Cartoon zeigt eine schematische Darstellung des TRP-Kanals und seiner mittels Massenspektrometrie gefundenen Phosphorylierungsstellen. Die weißen und schwarzen Kreise markieren die lichtabhängigen Phosphorylierungsstellen, wobei die weißen Kreise die hauptsächlich im Hellen phosphorylierten Stellen markieren, während der schwarze Kreis für die einzig im Dunklen phosphorylierte Stelle steht. Die grauen Kreise zeigen Phosphorylierungsstellen, die lichtunabhängig phosphoryliert werden (Verändert nach Voolstra et al., 2013).

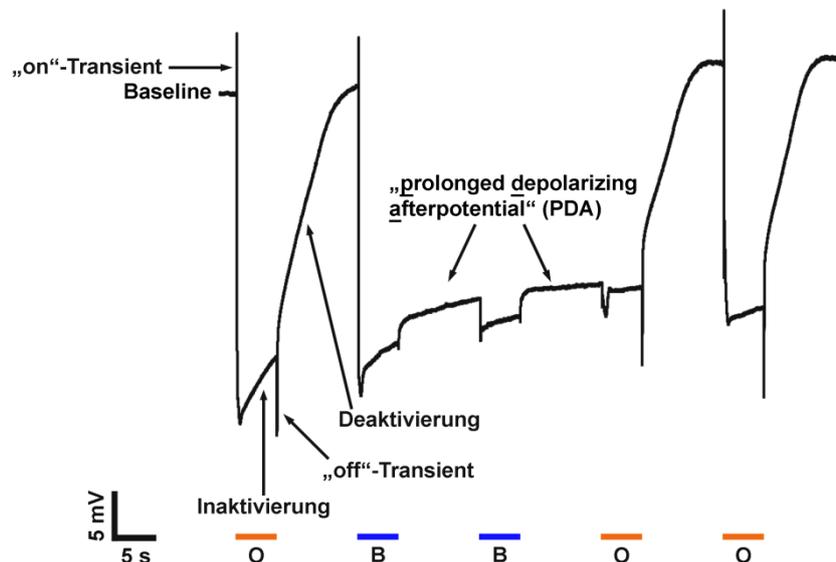
### 3.3 Das Elektretinogramm (ERG)

Das Fehlen vieler der in den vorherigen Abschnitten erwähnten Bestandteile der Phototransduktionskaskade von *Drosophila melanogaster* erzeugt einen spezifischen Phänotyp bei elektretinographischen Messungen, die somit ideal sind, um physiologische Veränderungen der Phototransduktionskaskade zu ermitteln. Auf diese Art und Weise

## Einleitung

wurden dann auch viele Gene identifiziert, die an der Phototransduktionskaskade von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind (Pak, 1979).

Ein Elektroretinogramm (ERG) ist ein durch Licht ausgelöstes Summenpotential, das aus Membranpotentialänderungen von mehreren Photorezeptorzellen und den nachgeschalteten Nervenzellen zusammengesetzt wird und durch eine Glaselektrode im extrazellulären Raum des Fliegenauges abgeleitet wird (Dolph et al., 2011; Pak et al., 1969). Die Abbildung 3.6 zeigt ein typisches Diagnose-ERG, bei dem zwei verschiedene Lichtqualitäten benutzt werden (OBBOO-Messung): zum einen orangefarbenes Licht mit einer Wellenlänge von 580 nm, dem Absorptionsmaximum von Metarhodopsin und zum anderen blaues Licht mit der Wellenlänge von 480 nm, was dem Absorptionsmaximum von Rhodopsin entspricht (Wang and Montell, 2007).



**Abbildung 3.6 Elektroretinogramm (ERG) einer weißäugigen (*white*-) Mutante von *Drosophila melanogaster*:** Gezeigt ist ein Messprotokoll einer OBBOO-Messung. Vor Aufnahme des ERGs wurde die Fliege für drei Minuten dunkel adaptiert und anschließend mit fünf aufeinander folgenden jeweils fünf Sekunden andauernden Lichtpulsen gereizt, wobei nach jedem Lichtpuls eine zehnsekündige Pause eingelegt wurde. Der erste Lichtreiz bestand aus orangenem Licht, der zweite und dritte aus blauem Licht und die letzten beiden Lichtpulse waren wieder orangenes Licht. Anhand des ersten Orangelichtpulses kann Auskunft über die „on“- und „off“-Transients sowie die Inaktivierung und Deaktivierung des Photorezeptorpotenzials gegeben werden. Das blaue Licht löst das PDA („prolonged depolarization afterpotential“) aus, das erst durch orange Belichtung beendet wird. Ein darauf folgender Orangelichtpuls kann dann wieder mit „normaler“ Intensität, genauso wie nach einer orange Belichtung, wiedergegeben werden. Die farbigen Balken geben die Bereiche im ERG an, währenddessen mit der entsprechenden Farbe belichtet wurde (O = orangefarbenes Licht; B = blaues Licht).

Es werden fünf fünfsekündige Lichtreize mit jeweils zehn Sekunden Pause dazwischen gegeben, wobei der erste Lichtreiz orange, der zweite und dritte blau und die beiden letzten wieder orange sind (OBBOO). Bei der ersten Belichtung mit orangenem Licht bildet sich sofort ein „on“-Transient aus, eine sehr kurze Hyperpolarisation, auf den die Depolarisation des Rezeptorpotentials folgt. Während das Licht noch an ist, repolarisiert der Photorezeptor schon ein wenig ein Vorgang, der Inaktivierung genannt wird. Sobald das Licht wieder ausgeht, bildet sich sofort der sogenannte „off“-Transient aus, erkennbar an einer sehr

## Einleitung

kurzen Depolarisation, auf den dann die vollständige Repolarisation folgt, die Deaktivierung genannt wird. Die Depolarisation, die Inaktivierung und die Deaktivierung des ERGs lassen sich auf die Öffnung bzw. die Schließung der TRP-Kanäle und die anschließende Aktivität der Kationenpumpen des Photorezeptors zurückführen, die das Ionenniveau wieder herstellen, das dem Ruhepotential entspricht. Das Signal der „on“- und „off“-Transienten wird hingegen von den nachgeschalteten Nervenzellen L1 und L2 in der Lamina generiert und signalisiert deren An- bzw. Abschaltung (Coombe, 1986).

Der nachfolgende Blaulichtpuls generiert wieder einen „on“-Transienten, eine Depolarisation und eine Inaktivierung. Es kommt aber nach Beendigung des Blaulichtpulses nur zu einer sehr geringen Deaktivierung, da die massive Umwandlung von 100% Rhodopsin zu etwa 70 % Metarhodopsin und nur noch 30 % Rhodopsin durch das blaue Licht bewirkt, dass die in den Photorezeptorzellen vorhandene Arrestinmenge nicht mehr ausreicht, um all das aktive Metarhodopsin zu inaktivieren, was zu einer andauernden Aktivierung der Phototransduktionskaskade auch ohne Belichtung führt (Dolph et al., 1993; LeVine et al., 1990). Dieses Phänomen wird PDA („*prolonged depolarizing afterpotential*“) genannt und ist eine Besonderheit von weißäugigen Fliegen. In rotäugigen Fliegen absorbiert das rote Schirmpigment einen Teil des blauen Lichts, wodurch nur so viel Rhodopsin in Metarhodopsin umgewandelt wird, wie Arrestin zur Deaktivierung im Photorezeptor zur Verfügung steht. Arrestin liegt nämlich in deutlich geringerer Menge im Photorezeptor vor als Rhodopsin. Damit es zur normalen Deaktivierung von Rhodopsin und damit zur Ausbildung eines „off“-Transient kommt, darf die Menge des aktivierten Rhodopsins nicht wesentlich die Menge des Arrestins überschreiten. In weißäugigen Fliegen kommt es aber nicht zu dieser Absorption des blauen Lichts und somit wird deutlich mehr Rhodopsin aktiviert, als Arrestin zur Deaktivierung zur Verfügung steht. Dadurch kann der Photorezeptor nicht abgeschaltet werden und bildet das beschriebene PDA aus.

Der zweite Blaulichtpuls wird lediglich durch eine schwache Amplitude der weißäugigen Fliege beantwortet, da die Rezeptorzellen R1 bis R6 durch das PDA noch aktiviert sind und der neue Blaulichtpuls nur noch durch die Rezeptorzellen R7 und R8 detektiert werden kann, da die Rhodopsine 3 und 4, die in den Photorezeptorzellen R7 exprimiert werden, nur nach UV Belichtung ins PDA fallen, da ihr Absorptionsmaximum eher im UV-Bereich liegt und nicht wie bei Rhodopsin 1 im Bereich des blauen Lichts (Abbildung 3.2; (Minke et al., 1975b)). Der darauf folgende Orangelichtpuls wird auch wieder nur von den Photorezeptorzellen R7 und R8 detektiert. Er sorgt aber in den Rezeptorzellen R1 bis R6 zur Photokonvertierung des Metarhodopsins zu Rhodopsin, was zur Beendigung des PDAs führt, was dann auch der entstehende „off“-Transient belegt. Der darauf folgende Orangelichtpuls kann von der *white*-Mutante dann wieder mit normaler Amplitude, wie nach der ersten orange Belichtung, wahrgenommen werden.

Unter Zuhilfenahme dieser ERG-Messmethode können sehr einfach Defekte im Fliegenauge gefunden werden, wie zum Beispiel ein reduzierter Rhodopsingehalt, der sich dadurch zeigt, dass kein PDA mehr ausgebildet werden kann. Auf diese Weise wurden die sogenannten PDA-Mutanten entdeckt, die in zwei Klassen aufgeteilt wurden. Zum einen in die sechs „ina“-Mutanten („inactivation but no afterpotential“) A bis F, die eine Inaktivierung aber kein PDA zeigen und zum anderen in die zehn „nina“-Mutanten („neither inactivation nor afterpotential“) A bis J, die weder eine Inaktivierung zeigen noch ein PDA, was sich auf einen reduzierten Rhodopsingehalt in allen *nina*-Mutanten zurückführen lässt (Pak et al., 2012; Stephenson et al., 1983). Des Weiteren lassen sich Defekte in der Deaktivierung und der Inaktivierung des Photorezeptorpotentials erkennen, wie zum Beispiel in der *inaC<sup>F209</sup>*-Mutante (Pak, 1979), die sowohl einen De- als auch einen Inaktivierungsdefekt zeigt.

### 3.4 Kinasen und Phosphatasen

Kinasen und Phosphatasen sind wichtige Regulatoren von Proteinen in z. B. vielen Stoffwechselwegen und die reversible Phosphorylierung ist ein bedeutender Mechanismus von eukaryontischen Organismen, da ca. 30% aller Proteine zu jedem beliebigem Zeitpunkt phosphoryliert sind (Gunawardena, 2005). Kinasen und Phosphatasen regulieren diese Proteine. Diese Art der Regulation findet sich z.B.: in der DNA-Replikation, für den Zellzyklus, im Energiemetabolismus, bei der Zellteilung, sowie der Zellentwicklung (Hunter, 1995; Novak et al., 2010), durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung an bestimmten Serinen, Threoninen oder Tyrosinen der entsprechenden Proteine. Auch die Regulation der Phosphorylase im Glykogenabbau ist zusätzlich zu benennen.

#### 3.4.1 Kinasen

Eine der größten Protein-Superfamilien sind die Kinasen von Eukaryonten. Eine Protein-Kinase ist laut Definition ein Enzym, das den Transfer von Phosphat von ATP oder GTP auf ein Serin, ein Threonin ein Tyrosin oder ein Histidin katalysiert (Fischer and Krebs, 1955; Krebs E. G. et al., 1958; Krebs E. G. and Fischer, 1956; Loomis et al., 1997). Die Kinasen werden entsprechend ihrer strukturellen und funktionalen Eigenschaften in viele unterschiedliche Gruppen entsprechend ihrer Funktion unterteilt (Hanks and Hunter, 1995), wobei aber alle diese Kinasen eine Gemeinsamkeit haben: ihre „katalytische Domäne“. Diese besteht aus 250 bis 300 Aminosäuren, wobei die Position dieser Domäne bei jeder Kinase anders sein kann (Barker and Dayhoff, 1982). Alle Klassen von Kinasen haben relativ ähnliche katalytische Domänen, die sich nur in einer kurzen AS-Sequenz voneinander unterscheiden, die dann aber auch die Kinase charakterisiert (Hanks, 1987). Ein Teil dieser katalytischen Domäne ist der sogenannte P-Loop, den die meisten der ATP- bzw. GTP-Bindeproteine haben und der essentiell für die Bindungen der jeweiligen Proteine an ATP oder GTP ist (Saraste et al., 1990).

## Einleitung

Zur Identifizierung von *Drosophila* Kinasen und Phosphatasen wurde im Jahre 2000 von der Arbeitsgruppe von Debora K. Morrison ein Gen-Screen nach Kinasen und Phosphatasen im *Drosophila melanogaster* Genom durchgeführt, bei dem aus den 13601 bekannten Fliegen-Proteinen insgesamt 251 Kinasen und 86 Phosphatasen identifiziert werden konnten. Die identifizierten Kinasen aus diesem Screen wurden dann in zehn Familien eingeteilt: zum einen in die AGC Familie, die aus Serin/Threonin Kinasen besteht, zu denen auch die Proteinkinase C (PKC) und die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase-Familie gehören. Sie wurden dadurch klassifiziert, dass diese nur Bereiche phosphorylieren, die von sauren AS umgeben sind. Es gibt die CaMK-Familie bestehend aus Kinasen, die durch Calcium oder Calmodulin reguliert werden, wie die Kinase SNF1/AMP-abhängige Kinase, die am Apoptose-Mechanismus beteiligt ist (Adams et al., 2000; Legembre et al., 2004) oder auch die Myosin leichte Kettenkinase (MLCK), die bei der Regulation der Zellmigration eine wichtige Rolle spielt (Chen et al., 2014). Als nächstes zu nennen ist die Caseinkinase 1 Familie, welches Serin- und Threonin-Kinasen sind, die ein saures Milieu bevorzugen. Das prominenteste Beispiel hier ist die Caseinkinase 1, die ein wichtiger Bestandteil des circadianen-Rhythmus in *Drosophila* ist (Zheng et al., 2014). Die CMGC Familie, bestehend aus Prolin geleiteten Serin/Threonin Kinasen, mit den prominenten Vertretern der MAP-Kinasen, die eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion und beim Zellzyklus spielen (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2014). Die STE Familie, bestehend aus Kinasen, die Funktionen upstream der MAP-Kinasen haben, wie zum Beispiel die Kinase TAO1, die eine wichtige Funktion in der Augenentwicklung von *Drosophila* inne hat (Boggiano et al., 2011). Dann gibt es noch die OPK (other protein Kinases)-Gruppe, die aus den Kinasen besteht, die nicht in die 6 Hauptgruppen unterteilt werden konnten, was in *Drosophila melanogaster* auf 56 Kinasen zutrifft. Es gibt zuletzt noch drei weitere Gruppen mit einigen Kinasen, die Verwandtschaften zu eukaryotischen Proteinkinasen haben, wie die atypischen Kinasen mit den Pyruvatdehydrogenasekinasen, den Guanylylcyclasen und den eukaryotischen Lipidkinasen. Es gibt aber immer noch Kinasen die sich jedweder Klassifizierung entziehen, da es entweder keine bekannten Kinase-Fragmente im Genom gibt oder irgendwelche sequenzspezifischen Genhomologien (Morrison et al., 2000).

### **Proteinkinase C**

Ein besonderes Augenmerk wird in dieser Arbeit auf die Proteinkinasen C (PKC) gelegt, die zu den AGC-Kinasen gehören. Das *Drosophila melanogaster* Genom (Adams et al., 2000) beherbergt sechs verschiedene PKCs (Morrison et al., 2000), die sich in drei verschiedene Klassen von PKCs unterteilen lassen: Zum einen die klassischen PKCs (Nishizuka, 1995), wozu die Augen Proteinkinase C (ePKC) (Rosenthal et al., 1987) und die PKC53E(br) (Schaeffer et al., 1989a) gehören, die im Genom beide sehr dicht nebeneinander liegen und

somit wahrscheinlich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Smith et al., 1991a). Die zweite Klasse sind die neuen PKCs (nPKC) mit den Kinasen PKC98E (Schaeffer et al., 1989a) und PKC $\delta$  (Morrison et al., 2000), die Sequenzhomologien untereinander aufweisen und zuletzt die atypischen PKCs (aPKC) mit dem einzigen Vertreter in *Drosophila melanogaster* der Kinase DaPKC (Wodarz et al., 2000). Die letzte bekannte *Drosophila*-PKC ist die PKN. Sie zeigt eine Sequenzhomologie zur bereits bekannten Vertebraten PKC-verwandten Proteinkinase N, konnte bis heute aber noch nicht genauer klassifiziert werden (Ueno et al., 1997).

Die Augen Proteinkinase C (ePKC) wird vorwiegend in *Drosophila*-Photorezeptoren exprimiert und ist, wie alle anderen Komponenten der visuellen Signaltransduktionskaskade auch, im Rhabdomer lokalisiert. Die ePKC wird, wie die anderen klassischen PKCs auch, unter anderem durch Calcium aktiviert. Die ePKC phosphoryliert nach ihrer Aktivierung unter anderem die PLC $\beta$ . Kodiert wird die ePKC durch das Gen *inaC*, das seinen Namen durch den „inactivation no afterpotential“ ERG-Phänotyp erhalten hat. Den zeigt dann auch die Nonsense-Mutation *inaC*<sup>P209</sup>, die keine ePKC mehr exprimiert (Smith et al., 1991b). Der Mangel an ePKC führt dazu, dass die Signalkaskade nicht mehr richtig abgeschaltet werden kann und somit das Rezeptorpotential deutlich länger braucht, um nach Beendigung eines Lichtstimulus wieder auf das normale Niveau zurückzukehren. Dieser Effekt lässt sich sehr gut mittels Elektoretinogrammen und Patch-Clamp Messungen zeigen (Pak, 1979; Ranganathan et al., 1991). Die ePKC ist, wie die PLC und TRP auch, an das Gerüstprotein INAD gebunden (Adamski et al., 1998; Shieh et al., 1997; Shieh and Zhu, 1996). Außerdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die ePKC sowohl INAD als auch TRP phosphorylieren kann (Huber et al., 1996b; Liu et al., 2000).

PKCs sind aber auch noch an anderen Prozessen als dem Sehen im *Drosophila melanogaster*-Auge beteiligt, so z.B. beim Lernen (Choi et al., 1991), der Bildung von Erinnerungen (Drier et al., 2002) und in Vertebraten am Wnt-Signalweg (Kühl et al., 2000).

### 3.4.2 Phosphatasen

Um die von Kinasen angebrachte Phosphorylierung an Proteinen wieder zu entfernen, gibt es zwei verschiedene Klassen von Phosphatasen. Zum einen die Serin/Threonin Phosphatasen (PSPs), die wiederum in die drei Hauptfamilien der Phosphoproteinphosphatasen (PPP), die Metallabhängigen Proteinphosphatasen (PPMs) und die Aspartat-basierenden Phosphatasen unterteilt werden können und zum anderen die Thyrosin-Phosphatasen (PTPs). Die PPP-Familie zeigt eine große Bandbreite von regulatorischen Untereinheiten, an die ihre katalytische Untereinheit gebunden wird. Das wohl repräsentativste Mitglied dieser Familie ist die Protein-Phosphatase 1 (PP1), die in wohl allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird und an einer großen Bandbreite von Prozessen, z.B. der allgemeinen Proteinsynthese oder der Regulation von Membranrezeptoren und

## Einleitung

Kanälen, beteiligt ist (Ceulemans and Bollen, 2004). Die PPM Familie besteht aus Phosphatasen, die mangan- oder magnesiumabhängig arbeiten und die keine sonstigen regulatorischen Untereinheiten besitzen. Zu dieser Familie zählen unter anderem die Phosphatasen PP2C, eine große Unterfamilie, die z. B. einen Einfluss auf die Stressregulation oder die Zelldifferenzierung hat (Lu and Wang, 2008). Die aspartat-basierenden Phosphatasen haben ihrerseits einen, wie der Name schon sagt, aspartat-basierenden Katalysemechanismus und das einzige bekannte Substrat dieser Phosphatasen ist der C-Terminus der RNA-Polymerase II (Zhang et al., 2006; Virshup et al., 2007).

Die Besonderheit der Thyrosin-Phosphatasen (PTP)-Familie ist der zu etwa 40 % der AS-Sequenz konservierte P-Loop mit dem für PTPs charakterisierenden CX<sub>5</sub>R Motiv (Peters et al., 1998) und mindestens eine weitere regulatorische Untereinheit. Die PTPs dephosphorylieren ihr Substrat in zwei Schritten. Zuerst erfolgt eine kovalente Bindung durch die schwefelhaltige AS Cystein an das phosphorylierte Thyrosin, woraufhin die Phosphatbindung am Thyrosin gebrochen und das somit dephosphorylierte Protein frei wird. Anschließend wird die PTP-Bindung an das Phosphat hydrolysiert und das Phosphat frei gelassen (Barford et al., 1998). Die PTPs lassen sich in drei Kategorien unterteilen. Zum einen in die klassischen PTPs (CPTP), die ausschließlich Thyrosin als Ziel haben, die sich wiederum in zwei Klassen aufteilen lassen: erstens in die membranständigen "rezeptor-like" cPTPs, z.B. die Phosphatase CD45, die wichtig für die T-Zellen-Entwicklung ist (Felberg and Johnson, 1998), und zweitens in die nicht membranständigen, zytoplasmatischen PTPs, wie z.B. die Phosphatase PTP1B, die die MAP-Kinase in *Drosophila melanogaster* reguliert (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2014). Dann gibt es noch die doppelspezifischen PTPs (DSPs), die alle Protein-Phosphorylierungen, sowohl die am Thyrosin als auch die an den Serinen und Threoninen, zum Ziel haben, wie bei der Phosphatase CDC25, die den Zellzyklus mit reguliert (Nilsson and Hoffmann, 2000). Und abschließend gibt es noch die nieder molekulargewichtigen PTPs (LMW-PTP), die z.B. eine Rolle bei der Immunantwort spielen (Souza, A C S et al., 2009).

### **Retinal degeneration C**

Auf die Phosphatase RDGC, die zur Familie der PPPs gehört, wird in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt. Sie wurde nach ihrem Nullphänotyp in *Drosophila melanogaster*-Mutanten „retinal degeneration“ benannt, der besagt, dass die Photorezeptoren einer generellen, zeitlichen und/oder lichtabhängigen Degradation unterliegen. Dieser Effekt ist nicht exklusiv für die *rdgC*-Mutanten. Es gibt auch noch weitere Mutanten mit „retinal degeneration“ wie *rdgA*, das für eine augenspezifische Diacylglycerol-Kinase kodiert, deren Fehlen kurzfristig zu einer Aktivierung der TRP-Kanäle führt (Masai et al., 1993) und langfristig zu einer abnormalen Photorezeptor-Morphologie (Matsumoto et al.,

1988) oder *rdgB*, was für eine membranassoziiertes Phosphatidylinositol-Transferprotein kodiert, dessen „loss-of-function“-Allel zu einer reduzierten Lichtsensitivität führt (Harris, 1977; Hotta and Benzer, 1970), die interessanterweise abhängig von der ePKC ist (Smith et al., 1991a). Der Degenerationsphänotyp des rezessiven „loss-of-funktion“-Allels *rdgC*<sup>306</sup> tritt dabei nicht bei sehr jungen Fliegen oder bei Fliegen auf, die nie belichtet wurden, da die Degeneration auf die andauernde Aktivierung von Rhodopsin bzw. dessen Hyperphosphorylierung zurückzuführen ist (Steele and O'Tousa, 1990). Damit ist dann auch schon die bisher bekannte Funktion von RDGC erklärt: RDGC ist eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase (Lee and Montell, 2001; Steele et al., 1992), die Rhodopsin dephosphoryliert, um die sonst eintretende retinale Degeneration zu verhindern (Byk et al., 1993; Kiselev et al., 2000; Lee and Montell, 2001; Vinos, 1997).

Vom *Drosophila melanogaster*-RDGC ist außerdem bekannt, dass es mit dem humanen PPEF (Protein phosphatase with EF calcium-binding domain) verwandt ist, von dem gezeigt wurde, dass es an der Embryonalentwicklung beteiligt ist (Montini, 1997; Sherman et al., 1997).

### 3.5 Fragestellung

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben wurde, ist bereits bekannt, dass der TRP-Kanal phosphoryliert wird und dass es einige TRP-Phosphorylierungsstellen gibt, die wiederum lichtabhängig phosphoryliert werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Antikörper gegen drei dieser Phosphorylierungsstellen hergestellt. Einer der Antikörper ist gegen das phosphorylierte Threonin an der Position 849 des TRP-Kanals gerichtet, das in einer ePKC-Konsensussequenz eingebettet ist und eine sehr starke lichtabhängige Phosphorylierung aufweist. Ein weiterer Antikörper wurde gegen das phosphorylierte Threonin an der Stelle 864 hergestellt, da es bei dieser Phosphorylierungsstelle ebenfalls zu einer sehr starken lichtabhängigen Phosphorylierung kommt. Zuletzt wurde noch ein Antikörper generiert, der das phosphorylierte Serin an der Stelle 936 erkennt, die einzige Phosphorylierungsstelle im TRP-Kanal, die vorwiegend im Dunklen phosphoryliert ist, während die anderen lichtabhängigen Phosphorylierungsstellen vorwiegend im Hellen phosphoryliert sind (Voolstra et al., 2010b; Voolstra et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun mittels Westernblotanalyse unter Zuhilfenahme dieser Antikörper geklärt werden, welche Kinasen den TRP-Kanal an den Stellen T849, T864 und S936 phosphorylieren und welche Phosphatasen diese Phosphorylierung wieder entfernen. Die identifizierten Kinasen und Phosphatasen sollten anschließend genauer untersucht werden im Hinblick darauf, ob die Kinasen oder Phosphatase noch weitere Einflüsse auf die Photorezeptorzelle haben.

Außerdem sollten transgene Phosphorylierungsmutanten hergestellt werden, bei denen die potenzielle ePKC Phosphorylierungsstelle T849 bzw. die einzig im Dunklen phosphorylierte

## Einleitung

Stelle S936 des TRP-Kanals zu Alanin oder als Kontrolle zu Asparaginsäure mutiert wurden. Mit diesen Mutanten sollte das Phosphorylierungsmuster der jeweiligen Null-Mutante an diesen Stellen simuliert werden. Das bedeutet an der Stelle T849 des TRP-Kanals simuliert die Mutation zu Alanin eine *inaC<sup>P209</sup>*-Mutation, also ein Fehlen der ePKCs und an der Stelle S936 des TRP-Kanals simuliert die Mutation zu Asparaginsäure eine *rgdC<sup>306</sup>*-Mutation, also ein Fehlen der Phosphatase RDGC. Mit Hilfe dieser Mutanten soll der Einfluss der Phosphorylierung an dieser Position untersucht werden: ob eine Phosphorylierungsstelle alleine überhaupt einen Einfluss auf die Kanaleigenschaften hat, wie die Reaktion des Kanals auf unterschiedlich starke Lichtreize ausfällt, wie gut der mutierte Kanal offen bleiben kann oder wie die Fähigkeit des Kanal ist, sich wieder zu schließen. Diese Kanaleigenschaften sollen im Rahmen dieser Arbeit mittels elektrophysiologischer Messungen überprüft werden. Außerdem soll die Lokalisation der mutierten TRP-Kanäle im Vergleich zum Wildtyp mittels immunzytochemischer Methoden überprüft werden und ob die Kanäle korrekt im Signaltransduktionskomplex eingebettet sind.

## 4 Material

### 4.1 Allgemeine Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren von höchster Reinheit („pro analysi“) und wurden bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München) gekauft.

### 4.2 Verbrauchsmaterial

Material	Quelle
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)
Blotpapier Whatman 3 MM	Schleicher Schuell (Dassel)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (München)
DNA-Ladepuffer (6x)	New England Bioleabs (Schwalbach)
Fluoreszenzmarker DAPI	Sigma-Aldrich (München)
Greiner-Kunststoffröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Immersionsöl	Carl Zeiss (Jena)
Kanüle 0,8 x 40 mm	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 0,45 x 25 mm	
Prestained Proteinmarker Precision Plus Protein (20 – 250 kDa)	BioRad (München)
Mowiol 4.88	Polysciences Inc. (Eppellheim)
Objekträger und Deckgläschen	Carl Roth (Karlsruhe)
PapPen <sup>®</sup>	Daido Sangyo Co. (Japan)
Poly-L-Lysin Lösung 0,01%	Sigma-Aldrich (München)
Protein Agarose A Beads	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Protein Agarose G Beads	Roche (Mannheim)
PVDF-Membran	BioRad (München)
Nitrozellulose Membran	Carl Roth (Karlsruhe)
Skalpell	B. Braun (Melsungen)
Tissue Tek <sup>®</sup> Einbettmedium	Sakura Finetek (Staufen)

**Tabelle 4.1: Verbrauchsmaterial**

### 4.3 Puffer und Lösungen

Alle aufgelisteten Puffer und Lösungen in Tabelle 4.3 sind mit bidest. H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt worden, solange nichts anderes vermerkt wurde. Wenn eine pH-Justierung der aufgelisteten Puffer oder Lösungen von Nöten war, wurde Salzsäure (HCl) oder Natronlauge (NaOH) verwendet.

Name	Zusammensetzung
Acrylamid-Lösung (30%)	[Rotiphorese®Gel] Acrylamid : N,N-Methylen-Bisacrylamid (1 : 37,5)
Agarose-Gel	1x TAE 1 % (w/v) Agarose 0,005 % (w/v) Ethidiumbromid
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH <sub>2</sub> O 0,5 % Fischgelatine
Blockierungslösung für Immunzytochemie	0,1 % Ovalbumin in PBS
Blockierungslösung für Western Blots	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Calcium-freie Lösung	5 mM Alanin 1,6 mM EGTA 5 mM KCl 4 mM MgCl <sub>2</sub> 120 mM NaCl 25 mM Proline 1 mM Saccharose 10 mM TES 1 % FCS pH 7,15
Coomassielösung	0,3 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 10 % (v/v) Essigsäure (100 %ig) 50 % (v/v) Methanol
Cytoskelett-Puffer	10 mM Hepes pH 7,4 3 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl 200 mM Saccharose 0,02 % (v/v) NaN <sub>3</sub> 0,5 % Triton-X-100

## Material

Name	Zusammensetzung
Davenport-Lösung	1 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM KCl 100 mM NaCl 1,8 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 7,2
DNA-Ladepuffer (6x)	New England Biolabs
ECL-Lösung	2 ml Lösung A (0,025% (w/v) Luminol in 0,1 M Tris (pH 8,6)) 200 ml Lösung B (0,11% (w/v) p-Hydroxy-Cumarinsäure in DMSO) 0,2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Embryowaschlösung (10x)	7 % (w/v) NaCl 0,2 % (v/v) Triton X100
Entfärbungslösung	10 % (v/v) Essigsäure (100%) 30 % (v/v) Methanol
Fixierlösung	2 % Paraformaldehyd in PBS
Injektionspuffer (10x)	5,0 mM KCl 0,1 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,8
Klorix-Lösung	50% Klorix (von Dan) in ddH <sub>2</sub> O
Mowiol	51 % (v/v) Glycerin 2,5 % (w/v) n-Propyl-Gallat 25,6 % (v/v) Mowiol 4.88 in PBS
Na-Phosphatpuffer	2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
Paraformaldehyd	10 % in ddH <sub>2</sub> O
PBS (10x)	1,75 M NaCl 84,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 18,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
PBS-S	PBS mit 0,1 % Saponin pH 7,2

## Material

Name	Zusammensetzung
PBS-T	0,1% (w/v) BSA 0,3% (v/v) Triton-X 100 in PBS
Poly-L-Lysin	0,01 % in ddH <sub>2</sub> O
RF1-Lösung	10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM KCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8
RF2-Lösung	10 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM MOBS 100 mM RbCl 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8
Ringerlösung	20 mM Glucose 5 mM KCl 8 mM MgSO <sub>4</sub> 125 mM NaCl 10 mM TES 10 % FCS pH 7,15
Saccharoselösungen	0,1 M Na-Phosphatpuffer 10 %, 25 % oder 50 % (w/v) Saccharose
SDS-Elektrodenpuffer	200 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	2 M Glycin 250 mM Tris 1 % SDS
SDS-Extraktionspuffer	5 mM EDTA 375 mM Tris 20 % (w/v) SDS pH 6,8

## Material

Name	Zusammensetzung
SDS-Ladepuffer	170 mM SDS 50 mM Tris 0,01 % Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol pH 6,8
SDS-Sammelgelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 0,5 M Tris pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 1,5 M Tris pH 8,8
„Standard“ Lösung (für das <i>in vivo</i> Phosphorylierungs- experiment)	5 mM Alanin 1,5 mM $\text{CaCl}_2$ 5 mM KCl 4 mM $\text{MgCl}_2$ 120 mM NaCl 25 mM Proline 1 mM Saccharose 10 mM TES 1 % FCS pH 7,15
Stripplösung	62,5 mM Tris-HCl 2 % (w/v) SDS 0,625 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol pH 6,8
TXEP	150 mM NaCl 50 mM Tris 1 % Triton X-100 pH 8

## Material

Name	Zusammensetzung
TXEP-Inhibitorenmix	50 mM APMSF 1 mg/ml Aprotinin 1 M Benzamidin 10 mM Cantharidin (in DMSO) 1 M Glycerophosphat 100 mM Orthovanadat 1 mg/ml Pepstatin A
TXWP	100 mM NaCl 50 mM Tris 0,1 % Triton X-100 pH 8
TXWP-Inhibitorenmix	50 mM APMSF 1 mg/ml Aprotinin 1 M Benzamidin 10 mM Cantharidin (in DMSO) 1 mg/ml Pepstatin A
Probenpuffer (2x) für Immunopräzipitation	150 mM NaCl 100 µg/ml Bromphenolblau 0,17 M SDS 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol 1 % Triton
Probenpuffer (5x) zur Proteinextraktion	100 µg/ml Bromphenolblau 0,17 M SDS 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol
TBS (10x)	1,5 M NaCl 1 M Tris pH 7,5
TBS-T	10 % (v/v) TBS (10x) 0.1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer (Blotpuffer A)	39 mM Glycin 48 mM Tris 20 % (v/v) Methanol

Name	Zusammensetzung
Transferpuffer (Blotpuffer B)	39 mM Glycin 48 mM Trin 1,3 mM SDS
TAE (50x)	0,05 M EDTA 2 M Tris-Acetat pH 8
Zuckerlösung (10 %ig)	10 % Saccharose in PBS pH 7,2
Zuckerlösung (25 %ig)	25 % Saccharose in PBS pH 7,2
Zuckerlösung (50 %ig)	50 % Saccharose in PBS pH 7,2

Tabelle 4.2: Puffer und Lösungen

#### 4.4 Nährmedien für *Drosophila*

Die Aufzucht von *Drosophila melanogaster* erfolgte in speziellen Kunststoff-Zuchtgefäßen auf einem Standard-Maismehl-Nährmedium (siehe Tabelle 4.2), die in Brutschränken (Binder GmbH, Tuttlingen) mit 18 °C, 22 °C oder 25 °C untergebracht wurden.

Menge für einen Liter Nährmedium	Zutaten
12 g	Agar
84 g	Frischhefe
50 g	Maismehl
32 g	Zucker
640 µl	10 % (w/v) Nipagin in Ethanol
5 ml	Propionsäure
2 Messerspitzen	Ascorbinsäure

Tabelle 4.3: Mengenangaben für einen Liter Nährmedium für *Drosophila melanogaster*

Zur Herstellung von Platten für die Eiablage von *Drosophila melanogaster* wurde das Nährmedium (Tabelle 4.3) in eine 55 mm Petrischale (Roth #N224.1) gegossen. Anschließend wurde noch eine Messerspitze Frischhefe auf die Eiablageplatte gestrichen.

Menge	Zutat
15 g	Agar
175 ml	Bio-Apfelsaft (Naturtrüb)
500 ml	ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)
0,25 ml	Essigsäure (konzentriert)
0,5 ml	Ethanol

## Material

16 g	Glucose
5 ml	Nipagin in Ethanol (10 % (w/v))

**Tabelle 4.4:** Zutaten für die Eiablageplatten für *Drosophila melanogaster*

### 4.5 Verwendete *Drosophila melanogaster*-Stämme

*Drosophila melanogaster*-Stämme, die für den Kinase- und Phosphatase-Screen benutzt wurden (Tabelle 4.4) und alle anderen verwendeten Fliegenstämme (Tabelle 4.5), die in dieser Arbeit benutzt wurden.

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
Activated Cdc42 kinase	<i>y[1] w[67c23];+;P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Ack[EY09374]</i>	Bloomington Center	Stock
Akt1	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Akt1[EY10012]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Alphabet	<i>y[1] w[67c23]; +; Mi{ET1}alph[MB01683]</i>	Bloomington Center	Stock
Arginine kinase	<i>w[*];+;PBac{GAL4D,EYFP}Argk[PL00418] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i>	Bloomington Center	Stock
Arginine kinase	<i>w[*];+;PBac{GAL4D,EYFP}Argk[PL00418] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i>	Bloomington Center	Stock
Atypical protein kinase C RNAi	<i>y[1] v[1];+;P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01966}attP2</i>	Bloomington Center	Stock
Eye protein kinase C	<i>w[*]; inaC<sup>209</sup>; +</i>	Pak	
CAMP-dependent protein kinase 1	<i>+; Pka-C1[B10]; +</i>	Bloomington Center	Stock
CAMP-dependent protein kinase 3	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Pka-C3[EY02687]</i>	Bloomington Center	Stock
CASK	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CASK[EY07081]</i>	Bloomington Center	Stock
CASK	<i>+; +;CASK[X-307]/TM3, Sb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	<i>y[1] w[67c23]; +; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CaMKI[EY07197]</i>	Bloomington Center	Stock
Casein kinase Iα	<i>w[1118] P{w[+mC]=EP}Cklalpha[EP1555] EP1555[EP1555]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock

Material

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
Casein kinase II $\alpha$	<i>y[1] w[*]; +; P{w[+mC]=UAS-CkIIalpha.Tik}T1</i>	Bloomington Center	Stock
CG10376	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}CG10376[G2887]; +</i>	Bloomington Center	Stock
CG17746	<i>y[1] w[*]; +; P{w[+mC]=EP}CG17746[G4827]</i>	Bloomington Center	Stock
CG7115	<i>[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG7115[KG02655]; +</i>	Bloomington Center	Stock
CG7766	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}CG7766[G104]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Corkscrew	<i>csw[lf] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}101/FM7c; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Downstream of raf1	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}Dsor1[G9740]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Flapwing	<i>y[2] cho[2] flw[1]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Foraging	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}for[EY10922]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Fps oncogene analog	<i>w[1118]; +; Mi{ET1}Fps85D[MB08538]</i>	Bloomington Center	Stock
Germinal centre kinase III	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}GckIII[EY05076]/TM3, Sb[1] Ser[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Genghis khan	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}gek[EY02416]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Gilgamesh	<i>y[1] w[1118]; +; PBac{w[+mC]=5HPw[+]}gish[B184]</i>	Bloomington Center	Stock
Gilgamesh	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}gish[EY06451]</i>	Bloomington Center	Stock
G protein-coupled receptor kinase 1	<i>cn[1] bw[1]; P{w[+mC]=hs-Gprk1.L}2</i>	Bloomington Center	Stock
G protein-coupled receptor kinase 1	<i>cn[1] bw[1]; P{w[+mC]=hs-Gprk1.K220R}3</i>	Bloomington Center	Stock

Material

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
G protein-coupled receptor kinase 1 RNAi	<i>y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02990}attP2/TM3, Sb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
G protein-coupled receptor kinase 1 RNAi	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GL00133}attP2/TM3, Sb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
G protein-coupled receptor kinase 2	<i>w[1118]; +; Mi{ET1}Gprk2[MB08070]</i>	Bloomington Center	Stock
Grapes	<i>w[1118]; Mi{ET1}grp[MB08323]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Hopscotch	<i>y[1] P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}hop[KG01990]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Hippo	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}hpo[G3315]</i>	Bloomington Center	Stock
Leukocyte-antigen-related-like	<i>w[1118]; Mi{ET1}Lar[MB03324]; +</i>	Bloomington Center	Stock
lethal (1) G0232	<i>w[1118] PBac{w[+mC]=WH}l(1)G0232[f06600]; l(2)*[*/CyO]</i>	Bloomington Center	Stock
Licorne	<i>w[67c23] P{w[+mC]=lacW}lic[G0252]/FM7c; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Lightoid	<i>w[1118]; Mi{ET1}ltd[MB03690]; +</i>	Bloomington Center	Stock
MAP kinase activated protein kinase 2	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}MAPk-Ak2[G265]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
MAP kinase kinase 4	<i>w[1118]; +; PBac{w[+mC]=RB}Mkk4[e01485]/TM6B, Tb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Mekk1	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Mekk1[EY11461]</i>	Bloomington Center	Stock
Mpk2	<i>w[*]; +; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B Mpk2[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Metallo-phospho-esterase	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Mppe[KG05213]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Microtubule star	<i>+; +; mts[XE-2258]/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12}FK1</i>	Bloomington Center	Stock

Material

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
Microtubule star	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}mts[EY12638]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Mkp3[EY02009a]</i>	Bloomington Center	Stock
Mushroom bodies tiny	<i>y[1] w[67c23] P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}mbt[EY08341]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Neither inactivation nor after-potential C	<i>w[*]; ninaC[3]; +</i>	Pak	
P38b	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}p38b[EY11174]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Pak3	<i>y[1]; +; ry[506] P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Pak3[KG00430]</i>	Bloomington Center	Stock
Par-1	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+t7.7] w[+mC]=wHy}mei-W68[DG23501] par-1[DG23501]; +</i>	Bloomington Center	Stock
PTEN-induced putative kinase 1	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}Pink1[G900]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase-like 17E	<i>y[1] w[67c23] P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Pk17E[EY10051]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Phospho-inositide-dependent kinase 1	<i>w[1118]; +; P{w[+mGT]=GT1}Pdk1[BG02759]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase at 92B	<i>w[1118]; +; Mi{ET1}Pk92B[MB06487]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase C 53E	<i>w[1118]; Mi{ET1}Pkc53E[MB02781]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase C 53E RNAi	<i>y[1] v[1]; +; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02641}attP2</i>	Vieana Resource Center	<i>Drosophila</i>
Primo-1	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}primo-2[EY21742] primo-1[EY21742]</i>	Bloomington Center	Stock
Primo-1 (neu)	<i>y[1] w[67c23]; +(neu); P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}primo-2[EY21742] primo-1[EY21742]</i>	Teil dieser Arbeit	
Primo-2	<i>w[1118]; +; PBac{w[+mC]=WH}primo-1[f03836] primo-2[f03836]</i>	Bloomington Center	Stock

Material

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
PRL-1	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}PRL-1[EY11934]; +</i>	Bloomington Center	Stock
PP2A-B'	<i>y[1] w[1118]; +; PBac{w[+mC]=5HPw[+]}PP2A-B'[A131]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein C kinase 98E	<i>w[1118]; +; PBac{w[+mC]=WH}Pkc98E[f06221]/TM6B, Tb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein C kinase 98E RNAi	<i>y[1] v[1]; +; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02470}attP2</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase related to protein kinase N RNAi	<i>y[1] v[1]; +; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02970}attP2</i>	Bloomington Center	Stock
Protein kinase D	<i>y[1] w[67c23]; +; Mi{ET1}PKD[MB00674]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase 1 at 87B	<i>w[1118]; +; P{w[+mGT]=GT1}Pp1-87B[BG00793]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase 1α at 96A	<i>+; +; ry[506] e[1] Pp1alpha-96A[2]/TM6B, P{w[+mW.hs]=Ubi-GFP.S65T}PAD2, Tb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase 2A at 29B	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Pp2A-29B[EP2332]/CyO; +</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase 2B at 14D	<i>w[67c23] P{y[+m8]=Mae-UAS.6.11}Pp2B-14D[GG01028]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase 19C	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}Pp4-19C[G11307]/FM6, w[*]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Protein phosphatase D3	<i>y[1] w[67c23]; +; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}PpD3[EY02912]</i>	Bloomington Center	Stock
Protein Tyrosine phosphatase-ERK/Enhancer of Ras1	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}PTP-ER[f02707]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Pyruvate-dehydrogenase kinase	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Pdk[EY01879]; +</i>	Bloomington Center	Stock
Pyruvate-dehydrogenase phosphatase	<i>w[1118] PBac{w[+mC]=RB}Pdp[e02351]; +; +</i>	Bloomington Center	Stock
Retinal degeneration C	<i>w; +; rdgC[306];</i>	Minke	

Material

Mutiertes Protein	Genotyp	Quelle	
Überexprimiertes Retinal degeneration C	<i>yw; P[y+, pRh1+rdgC]; +</i>	Aus der Arbeitsgruppe	
Rolled	<i>++; r[1]; +</i>	Bloomington Center	Stock
RPS6-p70-protein kinase	<i>y[1] w[*]; ++; S6k[l-1]/TM6B, P{y[+t7.7] ry[+t7.2]=Car20y}TPN1, Tb[1]</i>	Bloomington Center	Stock
Saxophone	<i>y[1] w[*]; P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 sax[4]/SM6a; +</i>	Bloomington Center	Stock
Shaggy	<i>w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.A81T}MB2</i>	Bloomington Center	Stock
Shaggy	<i>w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.A81T}MB30</i>	Bloomington Center	Stock
Shaggy	<i>w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.Y214F}2</i>	Bloomington Center	Stock
Shaggy	<i>w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.KK83- 84MI}2.1</i>	Bloomington Center	Stock
Salt-inducible- 3 kinase	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Sik3[EY14354]</i>	Bloomington Center	Stock
Salt-inducible- 3 kinase	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Sik3[EY06260]</i>	Bloomington Center	Stock
Smell impaired 35A	<i>++; P{ry[+t7.2]=lArB}smi35A[1]; ry[506]</i>	Bloomington Center	Stock
AMPK $\alpha$	<i>SNF1A[1]/FM7i; ++; +</i>	Bloomington Center	Stock
Synaptojanin	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}synj[e02597]/CyO</i>	Bloomington Center	Stock
TGF- $\beta$ kinase 1 activated	<i>w[*] Tak1[179]; ++; +</i>	Bloomington Center	Stock
Tao	<i>w[1118] P{w[+mC]=EP}Tao-1[EP1455]; ++; +</i>	Bloomington Center	Stock
Target of rapamycin	<i>w[1118]; Mi{ET1}Tor[MB07988]; +</i>	Bloomington Center	Stock
5Ptase I	<i>y[1] w[67c23]; ++; Mi{ET1}5PtaseI[MB01285]</i>	Bloomington Center	Stock

**Tabelle 4.5:** Liste aller im Kinase- und Phosphatase-Screen verwendeten *Drosophila melanogaster* Stämme

Material

Stamm	Genotyp	Quelle
1799	$w; P\{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB\}89-2-1$	Bloomington Stock Center
5138	$y[1] w[*]; P\{w[+mC]=tubP-GAL4\}LL7/TM3, Sb[1]$	Bloomington Stock Center
8121	$y[1] w[*]; wg[Sp-1]/CyO; P\{w[+mC]=longGMR-GAL4\}3/TM2$	Bloomington Stock Center
8227	$y[1] w[1118]; P\{w[+mC]=ey1x-GAL4.Exel\}3$	Bloomington Stock Center
27491 ( <i>pkc53e</i> -RNAi-1)	$y[1] v[1]; P\{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02641\}attP2$	Bloomington Stock Center
v27696 ( <i>pkc53e</i> -RNAi-2)	$w[1118]; P\{GD11984\}v27696/TM3$	Vienna Drosophila Recourse Center
A35 (Oregon R ( <i>w</i> ))	$w; +; +$	Aus der Arbeitsgruppe
P209 ( <i>inaC</i> )	$w; inaC^{P209}; +$	Aus der Arbeitsgruppe
PKC-Doppelnullmutante	$w; inaC^{P209}; \frac{PKC53E(br)-RNAi}{gmr-Gal4}$	Teil dieser Arbeit
Oregon R	$+; +; +$	Aus der Arbeitsgruppe
OV4 ( <i>trp</i> )	$yw, +; trp^{P343}$	Olaf Voolstra
OV5 ( <i>trp<sup>wt</sup></i> DN)	$yw, p[y+,rh1>trp^{wt}], trpl^{302}; trp^{P343}$	Olaf Voolstra
OV6 (S936A)	$yw, p[y+,rh1>trp^{S936A}]; trp^{P343}$	Olaf Voolstra
OV7 (S936A DN)	$yw, p[y+,rh1>trp^{S936A}], trpl^{302}; trp^{P343}$	Olaf Voolstra
OV11( <i>trp<sup>wt</sup></i> )	$yw, p[y+,rh1>trp^{wt}]; trp^{P343}$	Olaf Voolstra
rh1-Gal4	$yw; +; rh1-Gal4$	Aus der Arbeitsgruppe
S936D	$yw, p[y+,rh1>trp^{S936D}]; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
S936D DN	$yw, p[y+,rh1>trp^{S936D}], trpl^{302}; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
SK6	$\frac{FM6}{yw}, +; trp^{P343}$	Stefan Kaltenbach
T849A	$yw, p[y+,rh1>trp^{T849A}]; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
T849A DN	$yw, p[y+,rh1>trp^{T849A}], trpl^{302}; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
T849D	$yw, p[y+,rh1>trp^{T849D}]; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
T849D DN	$yw, p[y+,rh1>trp^{T849D}], trpl^{302}; trp^{P343}$	Teil dieser Arbeit
Y19 ( <i>ninaE</i> )	$yw; +; ninaE^{17}$	Aus der Arbeitsgruppe
Y41	$yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y}$	Aus der Arbeitsgruppe
Y64 ( <i>norpA</i> )	$w; norpA^{P24}; +$	Aus der Arbeitsgruppe
Y83 ( <i>trpl</i> )	$yw, trpl^{302}; +$	Aus der Arbeitsgruppe

Stamm	Genotyp	Quelle
Y84 (inaD)	<i>yw, inaD1, cn, bw; +</i>	Aus der Arbeitsgruppe
Y132 (TRP-eGFP)	<i>yw; p[y+,rh1&gt;TRP-eGFP]; trp<sup>P343</sup></i>	Aus der Arbeitsgruppe
Y174	<i>yw; <math>\frac{sp}{CyO}</math>; <math>\frac{trp^{P343}}{trp^{P343}}</math></i>	Aus der Arbeitsgruppe
Y211	<i>yw, trpl<sup>302</sup>; trp<sup>P343</sup></i>	Aus der Arbeitsgruppe
Y219	<i>yw; <math>\frac{sp}{CyO}</math>; <math>\frac{trp^{P343}}{MKRS, trp^{P343}}</math></i>	Aus der Arbeitsgruppe
<i>yw</i>	<i>yw; +; +</i>	Aus der Arbeitsgruppe

**Tabelle 4.6:** Auflistung der Fliegen, die in dieser Arbeit (Screen ausgenommen) verwendet wurden

## 4.6 Antikörper

Die folgende Tabelle zeigt alle verwendeten **primären Antikörper**, die für Westernblots (WB), Immunzytochemie (IC) oder Immunpräzipitationen (IP) verwendet wurden. Sofern nichts anderes angegeben ist, waren alle verwendeten Antikörper polyklonal. Beim hingegen Phalloidin handelt es sich nicht um einen Antikörper, sondern um ein Pilzgift, an das ein Fluorophor gekoppelt wurde.

Antikörper	hergestellt in	verwendete Verdünnung	Quelle
$\alpha$ - $\beta$ -Tubulin (monoklonal)	Maus	1:5000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank
$\alpha$ -DmRh1 4C5 (monoklonal)	Maus	1:1000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank
$\alpha$ -ePKC	Kaninchen	1:1000 (WB)	Univerität Karlsruhe
$\alpha$ -GFP (monoklonal)	Maus	1:10 (IP) 1:1000 (WP)	Roche (Mannheim)
$\alpha$ -GRK2/3	Maus	1:1000 (WB)	Merck Millipore
$\alpha$ -INAD	Kaninchen	1:100 (IP) 1:1000 (WB)	Aus der Arbeitsgruppe
$\alpha$ -Myc	Maus	1:5000 (WB)	Sigma (München)
$\alpha$ -PLC	Kaninchen	1:1000 (WB)	Aus der Arbeitsgruppe
$\alpha$ -RDGC	Kaninchen	1:100 (IC) 1:500 (WB)	Aus der Arbeitsgruppe
$\alpha$ -TRP (Monoklonal) MAb83F6	Maus	1:100 (IC)	Developmental Studies
Panspezifisch		1:1000 (WB)	Hybridoma Bank
$\alpha$ -TRP	Kaninchen	1:2000 (WB)	M. Böhner
$\alpha$ -TRP_pS936	Kaninchen	1:1000 (WB)	Pineda (Berlin)

## Material

$\alpha$ -TRP_pT849	Kaninchen	1:1000 (WB)	Pineda (Berlin)
$\alpha$ -TRP_pT864	Kaninchen	1:2500 (WB)	Pineda (Berlin)
$\alpha$ -TRPL	Kaninchen	1:1000 (WB)	Pineda (Berlin)
Phalloidin mit gekoppeltem AlexaFluor 546	-	1:600	Invitrogen (Karlsruhe)

**Tabelle 4.7:** Aufgelistet sind alle verwendeten primären Antikörper

Tabelle 4.8 zeigt alle verwendeten **sekundären Antikörper**.

Antikörper	hergestellt in	verwendete Verdünnung	Quelle
$\alpha$ -Maus Cy5	Schaf	1:100 (IC)	Dianova
$\alpha$ -Maus IgG-HRP	Kaninchen	1:10000 (WB)	Sigma (München)
$\alpha$ -Maus mit gekoppeltem AlexaFluor 488	Ziege	1:20 (IC)	Invitrogen (Karlsruhe)
$\alpha$ -Kaninchen mit gekoppeltem AlexaFluor 680	Ziege	1:20 (IC)	Invitrogen (Karlsruhe)
$\alpha$ -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:10000 (WB)	Sigma (München)

**Tabelle 4.8:** Aufgelistet sind alle verwendeten sekundären Antikörper

## 4.7 Kits

Material	Quelle
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Stratagene QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Leonberg

**Tabelle 4.9:** Verwendete Kits

## 4.8 Enzyme

Material	Quelle
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-DNA-Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

**Tabelle 4.10:** Verwendete Enzyme

## 4.9 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Quelle
One Shot TOP10 Competent <i>E.coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Bakterienstamm	Quelle
XL-1 Blue Supercompetent <i>E. coli</i>	Stratagene (Santa Clara)
XL-10-Gold Ultracompetent <i>E. coli</i>	Stratagene (Santa Clara)

Tabelle 4.11: Verwendete Bakterienstämme

## 4.10 Medien und Agarplatten für Bakterien

Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurde alles mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt

Material	Zusammensetzung/Quelle
Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml; Verdünnung 1:1000)	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin (Stammlösung: 50mg/ml; Verdünnung 1:2000)	Roth (Karlsruhe)
LB-Agar	15 g/l Agar (Roth, Karlsruhe) LB-Medium
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
NZY <sup>+</sup>	Labor Eigen
	3,6 g/l Glucose
	20 g/l Hefeextrakt
	0,2 g/l KCl (pH 7)
SOC-Medium	0,98 g/l MgCl <sub>2</sub>
	1,2 g/l MgSO <sub>4</sub>
	0,5 g/l NaCl
	5 g/l Trypton
Tetracyclin	Roth (Karlsruhe)

Tabelle 4.12: Material für Bakterienmedien und Agarplatten

## 4.11 Oligonukleotide

Die Synthese aller Oligonukleotide, die in dieser Arbeit benutzt wurden, wurde von Thermo Fisher Scientific GmbH in Ulm durchgeführt.

### 4.11.1 Vektorprimer

Primername	Basen	T <sub>M</sub> [°C]	Sequenz (5' → 3')
M13 Forward	17	47,1	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13 Reverse	17	44.6	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabelle 4.13: Verwendete Vektorprimer

### 4.11.2 Primer für die Sequenzierung der *trp*-Fragmente

Primername	Basen	T <sub>M</sub> [°C]	Sequenz (5' → 3')
TRP5rev	18	50,3	AAAGCGACCGTCACGAAC
TRP3rev	20	49,7	AAGGTCATCGGCAGAAAGAA

**Tabelle 4.14:** Primer, die für die Kontrollsequenzierung benutzt wurden, da sie die jeweilige Mutagenese-Site einschließen.

### 4.11.3 Mutagenese Primer

Primername	Basen	T <sub>M</sub> [°C]	Sequenz (5' → 3')
TRP_T849A	33	66,9	CATCGGCAGAAAGAAGGCCAGAAAGGGAGACAA
TRP_T849D	32	65,7	GTCATCGGCAGAGAAAGAAGGACCAGAAGGGA
TRP_S936D	32	69,5	GCTGCCGACGAGGTTGACTTGGCCGATGACGA

**Tabelle 4.15:** Mutagenese Primer

## 4.12 Vektoren

Name und Quelle	Vektorkarte
<p><b>pBII</b>                      (= pBluescript II SK(+))                      Fermentas GmbH                      (Deutschland)</p>	<p>A circular plasmid map for pBII (2961 bp). A blue arc represents the Ampicillin resistance gene. Two restriction sites, SalI and BamHI, are indicated on the right side of the circle.</p>
<p><b>pBII_ <i>trp</i><sup>wt</sup> (AS 668-1041)</b>                      Olaf Voolstra</p>	<p>A circular plasmid map for pBII_ <i>trp</i><sup>wt</sup> (3983 bp). It features an Ampicillin resistance gene (blue arc), a red arc representing the <i>trp</i> fragment (AS 668-1041), and restriction sites DralIII, KpnI, and SacI.</p>
<p><b>pBII_ <i>trp</i><sup>x</sup> (AS 668-1041)</b>                      (x = T849A, T849D oder S936D)                      Teil dieser Arbeit</p>	<p>A circular plasmid map for pBII_ <i>trp</i><sup>x</sup> (3983 bp). It features an Ampicillin resistance gene (blue arc), a red arc representing the <i>trp</i><sup>x</sup> fragment (AS 668-1041), and restriction sites DralIII, KpnI, and SacI.</p>

Name und Quelle	Vektorkarte
<p><b>pENTR_ <i>trp</i><sup>wt</sup></b>                      (= pENTR 1A_ <i>trp</i><sup>wt</sup>)                      Olaf Voolstra</p>	<p style="text-align: center;">pENTR_ <i>trp</i><sup>wt</sup> 6115 bp</p>
<p><b>pYC4_ <i>rh1</i>_dest UTR</b>                      David Richter</p>	<p style="text-align: center;">pYC4_ <i>pRh1</i>_dest_UTR</p>
<p><b>pUC <i>hs</i>Δ2-3</b>                      (= <i>hsII</i>[Δ2-3])                      Drosophila Genomics Resource Center</p>	<p style="text-align: center;">pUC <i>hs</i>Δ2-3</p>

**Tabelle 4.16:** Für diese Arbeit verwendete Vektoren

## 4.13 Geräte

### 4.13.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Modell	Quelle
Bakterienschüttler	Multitron II	Infors GmbH (Stuttgart)
Blottingapparatur	Trans-Blot Semi-Dry Transfer cell	Biorad (Freiburg)
Brutschränke	versch. Modelle	Binder GmbH (Tuttlingen)
Geldokumentationssystem	Alphamager	Alpha Innotech
Gelgieß- Elektrophoreseapparatur	+ Mini PROTEAN Tetra Cell	Biorad (Freiburg)
Heiz- und Kühlsystem	Grat Bio PCH-1	Grant Instruments Ltd (Camebridge)
Horizontale Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Gelsystem Mini L Horizon 58	PEQLAB (Erlangen) Whatman
Injektionsspritzen	Femtotips	Eppendorf (Hamburg)
Injektor	FemtoJet	Eppendorf (Hamburg)
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Zeiss (Jena)
Kryomikrotom	Leica CM3050 S	Leica (Bensheim)
Mikroskop (Injektor)	Axiovert 40 C	Carl Zeiss (Jena)
Mikroskop (Fluoreszenz)	Axio Imager.Z1m	Carl Zeiss (Jena)
Mikroskop (Binokular)	Stemi 2000-C	Carl Zeiss (Jena)
	C-LEDS	Nikon
	Axionvert 40C	Carl Zeiss (Jena)
Mikro-Siebsatz Netzeinlage	mit Primo Star	Carl Zeiss (Jena)
		Neolab Migge (Heidelberg)
Netzteile	Standart Power Pack P25	Biorad (Freiburg)
	PowerPak HC	Biorad (Freiburg)
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson (Bad Camberg)
Westernblot Dokumentationsapparatur	Chemi Doc XRS+	Biorad (Freiburg)
Thermocycler	MJMini™	Biorad (Freiburg)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Microfuge 22R	Beckman Coulter

Gerät	Modell	Quelle
Tischzentrifuge	Minispinn	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 4.17: Allgemeine Geräte

### 4.13.2 Elektrophysiologie

Gerät	Modell	Quelle
Abgedunkelter Faradaykäfig mit Anschlussblock zur Rackmontage mit BNC-Anschlüssen	BNC-6090A	National Instruments (Deutschland)
Bienenwachs		Rayher
Colophonium		Aus der Arbeitsgruppe
Davenportlösung		siehe Tabelle 4.2
Differenzverstärker	EXT-08	NPI elektronik (Deutschland)
Glaskapillaren	BF 150-75-10	Sutter Instrument
LED (Blau)	Hexagon High Power LED H11A1-HB-30	Roithner Lasertechnik (Österreich)
LED (Orange)	Hexagon High Power LED H11A1-HY-30	Roithner Lasertechnik (Österreich)
Lötnadel	Microlötköpchen 12 V	Conrad (Stuttgart)
Messkarte	PCI-6221	National Instruments (Deutschland)
Mikromanipulator		NPI elektronik (Deutschland)
Mikropipetten Puller	PC-10	Narishige
Neutralgraufilter		Linos (Deutschland)
Netzgerät	PS-1152A	Conrad (Stuttgart)
Pipettenspitzen	200 µl type	Eppendorf
Sammellinsen		Linos (Deutschland)
Silberdraht	LS323495 J V	Goodfellow (Cambridge)
Skalpell	10	BBraun
Stimulusgenerator	PLEM-02M	National Instruments (Deutschland)

Tabelle 4.18: ERG-Gerätschaften

## 4.14 Datenbanken

Name	Internetadresse
Bloomington Stock Center	<a href="http://flystocks.bio.indiana.edu/">http://flystocks.bio.indiana.edu/</a>
FlyAtlas	<a href="http://flyatlas.org/">http://flyatlas.org/</a>
FlyBase	<a href="http://flybase.org/">http://flybase.org/</a>
Google Scholar	<a href="http://scholar.google.de/">http://scholar.google.de/</a>
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Vienna <i>Drosophila</i> resource centre	<a href="http://stockcenter.vdrc.at/control/main">http://stockcenter.vdrc.at/control/main</a>

**Tabelle 4.19:** Datenbanken

## 4.15 Software

Art der Anwendung	Name
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS2 Microsoft Power Point 2007
DNA-Sequenzbearbeitung	Vector NTI Suite
DNA-Verdau Simulation	NEBcutter V2.0 ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a> )
ERG-Aufnahme und Auswertung	WinWCP V3.5.6 und V4.3.1 Microsoft Excel 2007 GraphPad Prism 4.03
Immuncytochemie-Aufnahme und -Auswertung	Axiovision Re. 4.6 (Zeiss) ZEN 2012 (Zeiss)
Insertmengen-Berechnung für die Ligation	Ligation Calculator ( <a href="http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html">http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html</a> )
Kinase-Vorhersage Programme	GPS 2.1.2 ( <a href="http://gps.biocuckoo.org/down.php">http://gps.biocuckoo.org/down.php</a> ) PhosphoMotif Finder ( <a href="http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder">http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder</a> ) KinBase ( <a href="http://kinase.com/web/current/kinbase/">http://kinase.com/web/current/kinbase/</a> )
Primerdesign	QuikChange Primer Design ( <a href="http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp">http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp</a> )
Primer-Charakterisierung	Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator ( <a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a> )
Textbearbeitung	Microsoft Word 2007
Westernblot-Aufnahme und Auswertung	Image Lab Software V2.0.1 (Bio-Rad) Microsoft Excel 2007

**Tabelle 4.20:** Verwendete Software

## **5 Methoden**

### **5.1 Biochemische Methoden**

#### **5.1.1 Proteinextrakt-Herstellung aus *Drosophila melanogaster*-Köpfen**

Zur Herstellung eines Proteinextraktes wurden jeweils 15 Fliegenköpfe mittels einer Rasierklinge oder zweier Pinzetten vom Thorax der Fliegen getrennt, die, wenn nichts anderes angegeben war, 1-5 Tage alt waren. Die Köpfe wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 60 µl SDS-Extraktionspuffer überführt und anschließend mit einem Pistill homogenisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei RT (Raumtemperatur) inkubiert und anschließend für 10 min. mit 16.000 g bei 22 °C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 15 µl 5x Ladepuffer hinzu pipettiert. Die Lagerung über Nacht erfolgte bei -20 °C, während eine langfristige Lagerung bei -80 °C durchgeführt wurde.

##### **5.1.1.1 Herstellung eines definiert belichteten Kopfextraktes**

Zur Herstellung eines sogenannten hellen, also belichteten Kopfextraktes, wurden die Fliegen vor der Extrakt Herstellung mind. 16 h in absoluter Dunkelheit in einer Dunkelbox gehalten und daraufhin eine Stunde mit einer handelsüblichen Leuchtstoffröhre, die weißes Licht generiert (30 W und 2000 lux), belichtet. Anschließend erfolgte die Extraktherstellung, wie in 5.1.1 beschrieben.

##### **5.1.1.2 Herstellung eines definiert unbelichteten Kopfextraktes**

Zur Herstellung eines sogenannten dunklen, also nicht belichteten, Kopfextraktes, wurden die Fliegen vor der Extrakt-Herstellung mind. 16 h mit einer handelsüblichen Leuchtstoffröhre, die weißes Licht generiert (s. o.), belichtet und daraufhin genau eine Stunde in absoluter Dunkelheit in einer Dunkelbox gehalten. Die Extraktherstellung erfolgt dabei bis zur Zentrifugation unter Rotlicht-Bedingungen, d.h. die einzige Lichtquelle war rotes Licht mit einer Wellenlänge von mindestens 665 nm (Schott RG665 C-LEDS von Nikon). Ansonsten verlief die Extraktherstellung, wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben.

##### **5.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Proteinextrakte wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetragen. Die verwendeten Gele dafür wurden selbst hergestellt, bestehend aus einem 8

%igem Trenngel und einem 4,5 %igem Sammelgel (Siehe Tabelle 5.1) in einem diskontinuierlichem Puffersystem (Trenngelpuffer pH 8,8; Sammelgelpuffer pH 6,8; Elektrodenpuffer pH 8,3).

	<b>8 %iges Trenngel</b>	<b>4,5 %iges Sammelgel</b>
ddH <sub>2</sub> O	2,9 ml	1,2 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	1,5 ml	-
4x SDS-Sammelgelpuffer	-	0,5 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	1,6 ml	0,3 ml
APS-Lösung	40 µl	20 µl
TEMED	6 µl	3 µl

**Tabelle 5.1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele**

Die Auftrennung der Proteine (15 µl Proteinprobe pro Geltasche entsprechen dabei drei Köpfen) im Gel erfolgte bei einer maximalen Spannung von 250 V und einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel über einen Zeitraum von ca. 45 Minuten.

### 5.1.3 Western Blot-Analyse

Die, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, aufgetrennten Proteinen wurden anschließend per Western Blot auf eine Membran transferiert (siehe 5.2.3.1 oder 5.2.3.2). Anschließend wurde die Membran für 10 min mit Blockierungslösung (siehe Tabelle 4.2) blockiert. Wenn nichts anderes angegeben war, wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Die Inkubation des primären Antikörpers benötigte mind. 3 h oder über Nacht mit der entsprechenden Konzentration (siehe Tabelle 4.7) in 10 ml Blockierungslösung. Nach dreimaligen jeweils fünf minütigem Waschen mit TBST wurde der benötigte sekundäre Antikörper in der entsprechenden Konzentration (siehe Tabelle 4.8) in 10 ml Blockierungslösung hinzugegeben und für mind. eine Stunde bei RT inkubiert. Für die Detektion des Signals wurden die Membranen wieder dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für zwei Minuten mit ECL-Lösung inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz, erzeugt durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP, erfolgte durch das Dokumentationssystem Chemi Doc<sup>TM</sup> XRS<sup>+</sup>.

Bei einer Untersuchung der Membran mit unterschiedlichen Antikörpern, die Proteine detektieren sollen und die sich auf der gleichen oder einer ähnlichen Höhe befinden, müssen die zuvor verwendeten Antikörper wieder von der Membran gelöst werden. Dieser Vorgang wird als Strippen bezeichnet. Hierfür wurde die Membran zunächst einmal mit TBST gewaschen und anschließend für eine Stunde in einem Wasserbad bei 70 °C mit der Strippinglösung (siehe Tabelle 4.2) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und daraufhin für 10 Minuten mit Blockierungslösung

blockiert. Die so gestrippte Membran konnte jetzt wieder zur erneuten Antikörperinkubation genutzt werden.

### **5.1.3.1 Westernblotting (Semi Dry)**

Bei dieser Methode werden die Proteine mittels einer Semi-Dry Blotapparatur mit einer konstanten Spannung von 10 V und einer maximaler Stromstärke von 90 mA pro Gel für 35 min auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurden pro Gel acht Whatman-Papiere und der Transferpuffer A (siehe Tabelle 4.2) verwendet (Aufbau siehe Herstellerangabe (Bio-Rad)).

### **5.1.3.2 Westernblotting (Tankblotting)**

Bei dieser Western Blot-Methode werden die Proteine mittels einer Tank-Blotapparatur auf eine zuvor mit 100 %igem Methanol aktivierte PVDF-Membran, mit einer konstanten Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 250 mA pro Gel für eine Stunde, übertragen. Hierfür wurden pro Gel zwei Whatman-Papiere und der Transferpuffer B (siehe Tabelle 4.2) verwendet (Aufbau siehe Herstellerangabe (Bio-Rad)). Dies erfolgte unter Kühlung mittels Kühl-Akku und Rühren zur Verhinderung einer Überhitzung der Membran.

### **5.1.4 Immunopräzipitation aus *Drosophila melanogaster*-Proteinextrakten**

**Vorbereitung der Agarose Beads:** Zuerst wurden 50 µl der zu verwendenden Beads, Protein A-Agarose Beads, für die Immunopräzipitation (IP) mit Kaninchen Antikörpern oder Protein G-Agarose Beads, für die IP mit Antikörpern aus der Maus, je dreimal mit 600 µl TXWP (Tabelle 4.2) gewaschen. Dafür wurden die Beads jedes Mal mit TXWP aufgeschüttelt, mit 1000 rpm bei 4 °C wieder herunter zentrifugiert und schließlich wurde der entstandene Überstand mit einer Kanüle entfernt. Zu den so gewaschenen Beads wurde anschließend 3 µg des entsprechenden Antikörpers hinzu pipettiert und das so entstandene Volumen mit TXWP auf 100 µl aufgefüllt und in einem Thermomixer bei 1000 rpm und 4 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit 1000 rpm und 4 °C für eine Minute herunter zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut dreimal (s. o.) gewaschen.

**Proteinextrakt-Herstellung für eine Immunopräzipitation:** Zur Extrakterstellung wurden 50 ein bis fünf Tage alte Fliegen benutzt, diese in ein 50 ml Falcontube überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Köpfe mittels Schütteln vom Thorax zu lösen, woraufhin die Köpfe mittels unterschiedlich feiner Siebe herausgesiebt wurden. Die so erhaltenen Köpfe wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und in 150 µl TXEP mittels eines Mikropistills homogenisiert und mit TXEP (siehe Tabelle 4.2) auf 500 µl

aufgefüllt und für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt bei 13000 rpm g<sup>?</sup> und 4 °C für eine Minute zentrifugiert und der Überstand auf die, wie oben beschriebenen vorbereiteten Beads gegeben, wobei 20 µl des Extraktes als Input-Kontrolle zurückbehalten und mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt wurde (Input).

**IP und Elution der Proteine:** Die Beads mit dem Extrakt wurden anschließend in einen Thermomixer über Nacht bei 1000 rpm und 4 °C inkubiert und am nächsten Tag mit 13000 rpm g bei 4 °C für eine Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend viermal mit 600 µl TXEP (mit Inhibitoren, siehe Tabelle 4.2), wie oben beschrieben, gewaschen. Für die Elution der Antikörper mit den jetzt gebundenen Proteinen wurden 15 µl 2x SDS-Probenpuffer zu den Beads hinzugegeben und für zehn Minuten bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 13000 rpm und 22 °C für eine Minute zentrifugiert und der entstandene Überstand abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde nochmals mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer eluiert und auch dieser Überstand in das vorherige Eppendorfgefäß überführt. Zur Analyse der IP wurden 15 µl der Input-Kontrolle und 15 µl der Elution aus der IP auf separate achtprozentige SDS-Gele aufgetragen (siehe 5.1.2) und mittels Western Blot-Analyse (5.1.3 und 5.1.3.1) untersucht.

## 5.2 Immunzytochemie

Mit Hilfe der Immunzytochemie ist es möglich, die Lokalisation von Proteinen in Geweben oder Organen sichtbar zu machen. Hierfür werden die gesuchten Proteine mit einem primären Antikörper detektiert und anschließend mittels einem sekundären Antikörper, an den ein Fluorophor gekoppelt ist, sichtbar gemacht.

### 5.2.1 Herstellung von isolierten Ommatidien

Zur Isolierung von Ommatidien wurden vier Fliegen auf Eis (4 °C) unter einem Binokular (Stemi 200-C, Zeiss) dekapitiert, die Augen mittels eines Skalpells entfernt und anschließend in 40 µl 0,1 M Phosphatpuffer überführt. Die so hergestellten „Eyecups“ wurden daraufhin vorsichtig mit einer sehr feinen Pinzette einmal durchgerissen. Daraufhin wurden die halben Eyecups mit dem Phosphatpuffer in einer abgeschnittenen 200 µl Pipettenspitze langsam zehnmal hinein und wieder heraus pipettiert, damit sich die Ommatidien voneinander lösen. Anschließend wurden die Ommatidien im Phosphatpuffer auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen überführt und bei RT für 30 bis 60 Minuten angetrocknet, bis fast keine Flüssigkeit mehr vorhanden war. Zur anschließenden Fixierung wurde ein Tropfen (ca. 20 - 30 µl) zweiprozentiges wässriges Formaldehyd auf den Ansatz getropft und für zehn Minuten inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils einem Tropfen 0,1 m PBS-S für fünf Minuten. Zur Permeabilisierung wurden die Ommatidien daraufhin für acht Minuten in „Cytoskeleton Buffer“ inkubiert und dreimal mit 0,1 M PBS-S für fünf Minuten gewaschen.

Die Antikörper-Inkubation mit einem Tropfen (20-30 µl) primärem Antikörper erfolgte über Nacht verdünnt in Blockierungslösung (siehe Tabelle 4.7 (IC Verdünnungen)) in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation wurden drei Waschschrte mit je einem Tropfen 0,1 M PBS-S für fünf Minuten durchgeführt, um daraufhin einen Tropfen (20-30 µl) sekundären Antikörper (Siehe Tabelle 4.8 (IC Verdünnung) verdünnt in Blockierungslösung auf die Ommatidien zu geben. Die Inkubation erfolgte zwei bis vier Stunden lang bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Ommatidien mit einem Tropfen Moviol 4.88 bedeckt und mit der Kopfseite auf einen Objektträger gelegt. Die Dokumentation der Antikörper-Signale erfolgte daraufhin mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1m).

### **5.2.2 Gefrierschnittherstellung von *Drosophila melanogaster*-Augen**

Um eine genauere Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in der Zelle zu bekommen, wurden mit einem Kryostat Gefrierschnitte hergestellt und diese daraufhin mit Antikörpern inkubiert.

#### **5.2.2.1 Präparation der *Drosophila melanogaster*-Köpfe**

Ein bis fünf Tage alte Fliegen wurden mit Eis betäubt und der Kopf unter Zuhilfenahme eines Binokulars (Stemi 2000-C, Zeiss) mit zwei Pinzetten vom Thorax getrennt. Daraufhin wurden die Augen mit einem Skalpell abgeschnitten, bei RT für eine Stunde in zweiprozentigem Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,2) fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Augen zur Entwässerung erst bei RT für 45 Minuten in 10 %iger Zuckerlösung (in PBS, pH 7,2), dann zweimal ebenfalls bei RT für 30 Minuten in 25 %iger Zuckerlösung (in PBS, pH 7,2) und abschließend über Nacht bei 4 °C in einer 50 %igen Zuckerlösung inkubiert.

#### **5.2.2.2 Anfertigung der Gefrierschnitte**

Die entwässerten Köpfe wurden in gekochter und in kleine Würfel geschnittener Kalbsleber in Löchern, die mit einer Präparier-Nadel gestochen wurden, nach oben hin orientiert, eingebettet und mit Tissue TeK (Fa. Sakura Finetek) bedeckt. Anschließend wurden die Präparate in flüssigem 2-Methylbutan schockgefroren und mindestens einen Tag bei -80 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate mit einem Gefriermikrotom bei -28 °C (Objektträger- und Boxtemperatur) in 10 µm dünne Scheiben geschnitten und auf ein mit 0,01 %igem Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen übertragen. Die Qualitätskontrolle erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 40C, Zeiss), wobei geeignete Schnitte mit einem PapPen® umkreist und bis zur Antikörpermarkierung bei -80 °C aufbewahrt wurden.

### 5.2.2.3 Antikörpermarkierung und Auswertung der Gefrierschnitte

Die zuvor geschnittenen Präparate wurden nun mit einer zweiprozentigen Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und zwei Stunden mit Blockierungslösung (für Immunzytochemie) blockiert. Anschließend erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung (Tabelle 4.7 (IC)) in einer feuchten Kammer. Nach drei Waschschritten mit PBS-T für jeweils fünf Minuten erfolgte die vierstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung (Tabelle 4.8 (IC)) in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Abschließend wurden die Schnitte nochmals dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und genau wie die isolierten Ommatidien mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1m, Zeiss) sowie den Programmen Axiovision Rel. 4.6 oder ZEN 2012 (beide von Zeiss).

### 5.3 *In vivo* Dephosphorylierungsexperiment

Für dieses Experiment wurden ein bis fünf Tage alte Fliegen für mindestens eine Stunde in der Dunkelbox gehalten und anschließend unter Rotlicht ( $\lambda > 665$  nm) präpariert. Für die Präparation wurden die Fliegen auf Eis betäubt und anschließend mit einer Rasierklinge geköpft und die Augen mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurden die so präparierten Eyecups für 20 min entweder in „Standard“-Lösung (siehe Tabelle 4.2) oder in Calcium-freier Lösung (siehe Tabelle 4.2) inkubiert. Die Inkubation erfolgte dabei entweder im Dunkeln oder im Licht.

Anschließend wurden die Eyecups in SDS-Puffer überführt und mit einem Pistill homogenisiert, wobei die Eyecups, die belichtet wurden, im Licht und die Eyecups, die im Dunkeln inkubiert wurden, im Dunkeln bearbeitet wurden. Anschließend wurden die *in vivo*-Extrakte wie die Kopfextrakte in Abschnitt 5.1.1 bis 5.1.3 behandelt und wie in Abschnitt 5.1.3.2 geblottet.

### 5.4 Molekularbiologische Methoden

#### 5.4.1 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

XL1 Blue superkompetente *E. coli* Bakterien wurden über Nacht in 50 ml LB-Medium angezogen und ein ml dieser Kultur in 200 ml frisches LB-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert bis, bei einer 600 nm Messung mit einem Photometer, eine optische Dichte zwischen 0,3 und 0,6 erreicht wurde, woraufhin die Kultur 15 Minuten auf Eis gekühlt und mit 1000 g und 4 °C 15 Minuten lang pelletiert wurde. LB mit Tetracyclin Das Zellpellet wurde

daraufhin in 1/3 des Ausgangsvolumens mit RF1-Lösung (Tabelle 4.2) vorsichtig resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert, um anschließend wieder mit 1000 g und 4 °C für 15 Minuten pelletiert zu werden. Das Zellpellet wurde in 1/12,5 des Ausgangsvolumens mit RF2-Lösung resuspendiert (Tabelle 4.2), 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend jeweils 50 µl in eisgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. Die gefüllten Eppendorfgefäße wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C eingelagert.

### **5.4.2 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien**

Die chemisch kompetenten Zellen (siehe Abschnitt 5.4.1), die bei -80 °C gelagert wurden, wurden langsam auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden 0,5 µl des DNA-Plasmids /Ligationsansatz zu den kompetenten Zellen hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für eine Minute ein Hitzeschock mit 42 °C in einem Wasserbad durchgeführt, woraufhin die Zellen wieder für zwei Minuten auf Eis inkubiert wurden. Daraufhin wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und je nach Resistenz (bei Ampicillin 30 Minuten und bei Kanamycin eine Stunde) bei 37 °C in einem Schüttler mit 250 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 und 200 µl des Ansatzes sofort neben einem Bunsenbrenner auf je eine Agarplatte ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert, wobei der Boden der Platte nach oben ausgerichtet war.

### **5.4.3 DNA-Präparation**

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu erhalten, wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit oder das OIAfilter™ Plasmid Midi Kit von QIAGEN verwendet. Die einzelnen Schritte wurden, wie in den Anleitungen der jeweiligen Kits beschrieben, durchgeführt. Es wurde mit XL-1 blue superkompetenten *E. coli* Bakterien in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika gearbeitet. Zur Lösung des DNA-Pellets wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet (30 µl beim Mini-Kit und 500 µl beim Midi Kit). Zur Bestimmung der erhaltenen DNA-Konzentration wurden die Absorptionen bei 260 nm mit einem Photometer bestimmt, wobei eine Absorption von eins einer Konzentration von 50 ng/µl DNA entsprach.

### **5.4.4 DNA-Restriktionsverdau**

Für die Restriktion der isolierten DNA wurden Restriktionsendonukleasen verwendet: zum einen für analytische Verdaus (siehe Tabelle 5.2) und zum anderen für präparative Verdaus (siehe Tabelle 5.3). Die jeweiligen Ansätze wurden ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (~ 5 ng)	x µl
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym(e)	(je) 0,2 µl
100x BSA	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Tabelle 5.2: Zusammensetzung eines analytischen Restriktionsverdau-Ansatzes

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (~ 5 ng)	x µl
10x Puffer 1	4 µl
Restriktionsenzym(e)	(je) 0,4 µl
100x BSA	0,4 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 40 µl

Tabelle 5.3: Zusammensetzung eines präparativen Restriktionsverdau-Ansatzes

### 5.4.5 DNA-Auftrennung mittels Agarosegel

Zur Auftrennung der erhaltenen DNA der Größe nach wurde diese in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dafür wurde die Agarose (1 % w/v) in einmal TAE-Puffer aufgeköcht und auf 60 °C heruntergekühlt, um das Ethidiumbromid hinzugeben zu können und anschließend in die gewünschte Form zusammen mit einem Kamm zur Generierung von Ladetaschen gegossen. Nach Abkühlen des Gels wurde es in einer Elektrophorese Kammer mit einmal TAE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben, die mit Ladepuffer versetzt wurden, zusammen mit einem Größenstandard aufs Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei zehn Volt pro Zentimeter. Zur Dokumentation wurde das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert.

### 5.4.6 DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel

Zur Extraktion der gewünschten DNA aus einem Agarose-Gel wurde die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus diesem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits von QIAGEN, wobei sich genau an die Anweisungen in der Anleitung des Kits gehalten wurde.

### 5.4.7 DNA-Mutagenese

Die Mutagenese der Aminosäure T849 nach Alanin bzw. Asparaginsäure oder der Aminosäure S936 nach Asparaginsäure des TRP-Kanals wurde mit dem QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenese Kit durchgeführt. Die dafür benötigten Primer (siehe Tabelle 4.15) wurden mittels der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software (QuickChange®

Primer Design) designt. Es wurde das in Tabelle 5.4 dargestellte und vom Hersteller empfohlene Pipettierschema für die Mutagenesereaktion verwendet.

Komponenten	Volumen
Template DNA von TRP	0,5 µl
Mutageneseprimer	1 µl
10x QuickChange Multi Reaktionspuffer	2,5 µl
QuickChange Multi enzyme blend	1 µl
dNTP-Mix	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

**Tabelle 5.4: Pipettierschema einer Mutagenese-PCR des QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenese Kits**

Die Ansätze für eine Mutagenese durchliefen das in Tabelle 5.5 dargestellte Protokoll in einem Thermocycler.

Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
1	95	1	1 x
	95	1	
2	55	1	30 x
	65	10	

**Tabelle 5.5: PCR-Programm des verwendeten QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenese Kits**

### 5.4.8 DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA wurde die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Der Ligationsansatz (siehe Tabelle 5.6) wurde vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Komponenten	Volumen
Vektor (~ 50 ng)	x µl (je Konzentration des Aliquots)
Insert	x µl (4,5x der stöchiometrischen Menge des Vektors)
T4 DNA-Ligase	1 µl
10x DNA-Ligase-Puffer	1 µl

**Tabelle 5.6: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes**

### 5.4.9 Gateway-Klonierung

Die Gateway-Klonierung ermöglicht die Rekombination von DNA zwischen den Rekombinationsstellen (*att*: „attachment sites“) zweier Gateway-Vektoren. Es wurde das Gateway-System von Invitrogen verwendet und entsprechend deren Angaben durchgeführt. Die dafür verwendeten Gateway-Vektoren waren: pENTR\_ *trp*<sup>T849A</sup>, pENTR\_ *trp*<sup>T849D</sup> oder pENTR\_ *trp*<sup>S936D</sup> zusammen mit dem Vektor pYC4\_ *pRH1\_dest\_UTR* und dem LR-Clonase™ II Enzym Mix.

### **5.4.10 Plasmid-DNA-Fällung**

Für die Fällung von 45 µg gelöster Plasmid-DNA wurde diese auf 200 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, 20 µl 3 M Na-Acetat pH 5,0 dazugegeben und bei RT gut durchgemischt. Daraufhin wurden 440 µl -20 °C kalter 100 %iger Ethanol zugegeben, gemischt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die DNA wurde dann bei 4 °C mit 16.000 g für 10 Minuten pelletiert und daraufhin zweimal mit 70 %igem Ethanol bei RT gewaschen, wobei jeweils für fünf Minuten bei maximaler Drehzahl bei 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels eines Photometers.

## **5.5 Arbeitsmethoden mit *Drosophila melanogaster***

### **5.5.1 Haltung und Zucht von *Drosophila melanogaster***

Zur Haltung und Aufzucht der verwendeten Fliegenstämme (siehe Abschnitt 4.5) wurde ein Standard-Maismehlnährmedium (Tabelle 4.4) in speziellen Kunststoffgefäßen verwendet. Die Fliegen wurden je nach Bedarf in Brutschränken ohne Beleuchtung (Binder GmbH, Tuttlingen) bei 18 °C, 22 °C oder 25 °C gehalten.

### **5.5.2 Herstellung transgener *Drosophila melanogaster***

Für die Herstellung transgener *Drosophila melanogaster* wurde ein P-Element-Vektor zusammen mit dem Helferplasmid pUC, der eine Transposase enthält und damit die Integration des P-Element-Vektors in das *Drosophila melanogaster*-Genom ermöglicht, in *yellow*, *white*-Fliegen injiziert. Um zu erkennen, ob die Fliegen das Transgen stabil in ihrem Erbgut verankert haben, wurde das Transgen mit einem *yellow*<sup>+</sup>-Marker (im P-Element-Vektor enthalten) versehen, der den *yellow*-Phänotyp der Injektionsfliegen rettete. Diese Fliegen konnten somit wieder dunkle Flügel ausbilden.

#### **5.5.2.1 Injektion der transgenen DNA in *Drosophila melanogaster*-Embryonen**

Die für die Injektion benötigten Embryonen wurden von zwei bis fünf Tage alten *yellow*, *white*-Fliegen hergestellt. Zur Stimulierung der Eiablage wurde diesen Fliegen einen Tag zuvor wässrige Würfelhefe verabreicht. Die zur Injektion verwendeten Eier waren nicht älter als 30 Minuten, da sich zu diesem Zeitpunkt der Embryo noch in der syncytialen Phase befand, die eine Insertion des P-Element-Vektors in die Keimbahn des Embryos ermöglicht. Zur Injektion wurden die Embryonen mit Klorix-Lösung (siehe Tabelle 4.2) dechloriniert, mit Embryonenwaschlösung (siehe Tabelle 4.2) gewaschen und anschließend auf einem Papiertuch getrocknet. Die so behandelten Embryonen wurden auf einer halbierten Eiablageplatte aufgereiht und mit einem mit doppelseitigem Klebeband beklebten

Deckgläschen abgenommen. Dieses Deckgläschen wurde daraufhin auf einem Objektträger fixiert und mit Silica-Gel für fünf Minuten angetrocknet, um die Embryonen abschließend mit Voltalef-Oil (10S) zu überschichten.

Für die Injektion wurden 30 µg pYC4-Plasmid-DNA zusammen mit 15 µg pUC-Helferplasmid-DNA wie in Abschnitt 5.4.10 beschrieben gefällt. Anschließend wurden 27 µl dieser DNA-Lösung mit 3 µl 10x Injektionspuffer gemischt und fünf Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Zwei bis fünf µl dieser Mischung wurden luftblasenfrei in eine Injektionskapillare gegeben und mittels der Injektionsapparatur in die auf dem Objektträger fixierten Embryonen in den Bereich der Polzellen injiziert. Für diese Prozedur wurde ein Injektionsdruck von 450 - 630 hPa, ein Haltedruck von 80 hPa und eine Injektionszeit von 0,1 bis 0,2 Sekunden verwendet. Die injizierten Embryonen wurden anschließend zusammen mit dem Deckgläschen, auf das sie geklebt waren, auf Eiablageplatten mit ausgestrichener Hefe gelegt und bis zum Schlupf in einem Brutschrank bei 18 °C inkubiert.

### 5.5.2.2 Identifikation und Vermehrung der transgenen Fliegen

Nachdem die Larven geschlüpft waren, wurden sie auf eine mit Hefe bestrichene Apfelagarplatte transferiert und nach Erreichen des dritten Larvenstadiums einzeln auf kleine Futterröhrchen verlagert. Sobald eine Fliege geschlüpft war, wurde sie mit drei *yellow*, *white*-Fliegen des jeweils anderen Geschlechts verkreuzt. Die Nachkommen aus dieser Kreuzung, die dunkle Flügel ausbildeten, d.h. die ein funktionelles *yellow*-Gen trugen, trugen auch das Transgen stabil im Genom und wurden daraufhin zur weiteren Vermehrung einzeln mit *yellow*, *white*-Fliegen des jeweils anderen Geschlechts verkreuzt. Die transgenen Fliegen, die aus demselben Futterröhrchen geschlüpft sind, wurden im Folgenden als abhängige Linien bezeichnet, während transgene Fliegen aus unterschiedlichen Futterröhrchen als unabhängige Linien bezeichnet wurden. Dies ist daher von Bedeutung, da bei abhängigen Linien der Integrationsort des Transgens identisch sein kann, während sich bei unabhängigen Linien der Integrationsort des Transgens in jedem Fall unterscheidet. Anschließend wurden alle transgenen Fliegen gemapped (siehe 5.5.3.1), um das Chromosom zu identifizieren, auf dem das Transgen inseriert wurde. Daraufhin wurden jeweils eine unabhängige Linie, mit der p-Elementinsertion auf dem zweiten Chromosom, in den *trp*<sup>343</sup>-Hintergrund gekreuzt (siehe 5.5.3.2) und anschließend wurden diese Fliegen auch noch in den *trpl*<sup>302</sup>, *trp*<sup>343</sup>-Hintergrund rekombiniert und gekreuzt (siehe 5.5.3.3).

### 5.5.3 Kreuzungen mit *Drosophila melanogaster*

Für alle Kreuzungen wurden Jungfrauen verwendet, die durch ihre schwache Pigmentierung und durch einen dunklen Fleck an der ventralen Seite des Abdomens zu erkennen sind. Diese wurden dann mit Fliegenmännchen des benötigten Genotyps verkreuzt. Jungfrauen können auch aufgrund ihres Alters identifiziert werden, da alle weiblichen Fliegen, die bei 25

°C gehalten wurden und nicht älter als sechs Stunden waren, immer jungfräulich sind. Bei niedrigeren Temperaturen steigt das Alter, in dem die Weibchen noch jungfräulich sind, weiter an. So sind es bei 22 °C acht Stunden und bei 18 °C sogar 16 Stunden. Die jeweiligen Kreuzungen wurden in kleinen Zuchtgefäßen angesetzt, in einem Brutschrank bei 25 °C gehalten und alle drei bis vier Tage auf ein neues Zuchtgefäß umgesetzt.

### 5.5.3.1 Mappingkreuzungen

Zur chromosomalen Identifikation des Transgens wurden transgene Männchen mit dem Fliegenstamm Y219 (siehe Tabelle 4.6) verkreuzt. Entstanden in der F1-Generation dieser Kreuzung nur Weibchen, die das Transgen trugen (also dunkle Flügel hatten), so handelte es sich um eine X-chromosomale Insertion (Kreuzung 5.1). Entstanden hingegen auch Männchen in der F1-Generation, so war die Insertion autosomal. Aufgrund der Marker/Transgen-Kombination in der F2-Generation konnte zweifelsfrei das autosomale Chromosom bestimmt werden, auf dem das Transgen inseriert war (siehe Kreuzung 5.2 und 5.3; gelb unterlegt sind die einzigartigen F2-Kombinationen, die Indikativ für das entsprechende Chromosom waren).

#### Kreuzungsschema einer X-chromosomalen Insertion

$$P: \frac{yw, sp}{yw, CyO} ; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}, MKRS} \quad \times \quad \frac{yw, p[trp^x]}{Y} ; \frac{+}{+}, \frac{+}{+}$$

F1: nur Weibchen mit dunklen Flügeln, d.h. mit  $p[trp^x]$  haben eine X-chromosomale Insertion

**Kreuzung 5.1:** Kreuzungsschema zur Mapping-Kreuzung mit dem Ziel des ersten Chromosoms. Für die Kreuzung verwendete Fliegen: Y219 und die jeweilige transgene Fliege mit einem mutierten  $trp^x$  ( $x = T849A, T849D$  oder  $S936D$ ).

#### Kreuzungsschema einer zweitchromosomalen Insertion

$$P: yw, \frac{sp}{CyO} ; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}, MKRS} \quad \times \quad yw, \frac{p[trp^x]}{+} ; \frac{+}{+}$$

$$F1: yw, \frac{+}{+} ; \frac{+}{+} \quad \times \quad yw, \frac{CyO}{p[trp^x]} ; \frac{trp^{P343}, MKRS}{+}$$

$$F2: yw, \frac{+}{p[trp^x]} ; \frac{+}{trp^{P343}, MKRS}, yw, \frac{+}{p[trp^x]} ; \frac{+}{+}, yw, \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{trp^{P343}, MKRS}, \text{ und}$$

$$yw, \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{+}$$

→ Fliegen mit dunklen Flügeln und kurzen Borsten sowie Fliegen mit hellen und gebogenen Flügel sind indikativ für die p-Element-Insertion auf dem zweiten Chromosom.

**Kreuzung 5.2:** Kreuzungsschema zur Mapping-Kreuzung mit dem Ziel des zweiten Chromosoms. Für die Kreuzung verwendete Fliegen: Y219, yw und die jeweilige transgene Fliege mit einem mutierten  $trp^x$  ( $x = T849A, T849D$  oder  $S936D$ ).

**Kreuzungsschema einer drittriosomalen Insertion**

$$\begin{array}{l}
 \text{P: } yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343},MKRS} \quad \mathbf{X} \quad yw; \frac{+}{+}; \frac{p[trp^x]}{+} \\
 \text{F1: } yw; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \quad \mathbf{X} \quad yw; \frac{CyO}{+}; \frac{trp^{P343},MKRS}{p[trp^x]} \\
 \text{F2: } yw; \frac{+}{p[trp^x]}; \frac{+}{trp^{P343},MKRS}, yw; \frac{+}{+}; \frac{+}{p[trp^x]}, yw; \frac{+}{+}; \frac{+}{trp^{P343},MKRS}, \text{ und} \\
 yw; \frac{+}{CyO}; \frac{+}{p[trp^x]}
 \end{array}$$

→ Fliegen mit dunklen und gebogenen Flügeln sowie Fliegen mit hellen Flügeln und kurzen Borsten sind indikativ für die p-Element-Insertion auf dem dritten Chromosom.

**Kreuzung 5.3:** Kreuzungsschema zur Mapping-Kreuzung mit dem Ziel des dritten Chromosoms. Für die Kreuzung verwendete Fliegen: Y219, yw und die jeweilige transgene Fliege mit einem mutierten  $trp^x$  (x = T849A, T849D oder S936D).

**5.5.3.2 Herstellung einer homozygoten transgenen Fliege im  $trp^{343}$ -Hintergrund**

$$\begin{array}{l}
 \text{P: } yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343},MKRS} \quad \mathbf{X} \quad yw; \frac{p[trp^x]}{+}; \frac{+}{+} \\
 \text{F1: } yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \quad \mathbf{X} \quad yw; \frac{CyO}{p[trp^x]}; \frac{trp^{P343},MKRS}{+} \\
 \text{F2: } yw; \frac{CyO}{p[trp^x]}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343},MKRS} \quad \mathbf{X} \quad yw; \frac{CyO}{p[trp^x]}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343},MKRS} \\
 \text{F3: } yw; \frac{p[trp^x]}{p[trp^x]}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}}
 \end{array}$$

**Kreuzung 5.4:** Kreuzung zur Herstellung von Mutanten mit einem transgenen TRP-Kanal im  $trp^{343}$ -Hintergrund. Für die Kreuzung verwendete Fliegen: Y219, Y174 und die jeweilige transgene Fliege mit einem mutierten  $trp^x$  (x = T849A, T849D oder S936D).

**5.5.3.3 Herstellung einer homozygoten transgenen Fliege im  $trpl^{302};trp^{343}$ -Hintergrund**

**A:** Rekombinationskreuzung

$$\begin{array}{l}
 \text{P: } \frac{yw}{yw}; \frac{p[trp^x,y^+]}{p[trp^x,y^+]}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} y^+ \quad \mathbf{X} \quad \frac{yw}{Y}; \frac{trpl^{P302}}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \\
 \text{F1: } \frac{yw}{yw}; \frac{p[trp^x,y^+]}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \quad \mathbf{X} \quad \frac{yw}{Y}; \frac{trpl^{P302}}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \\
 \text{F2: } \frac{yw}{yw}; \frac{trpl^{P302}}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \quad \mathbf{X} \quad \frac{yw}{Y}; \frac{(p[trp^x,y^+],trpl^{P302})}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}}
 \end{array}$$

**Kreuzung 5.5: Rekombinationskreuzung** zur Erzeugung einer heterozygoten transgenen  $trp$ -Mutante ( $trp^x$ ) im TRPnull ( $trp^{P343}$ )- und TRPLnull ( $trpl^{302}$ )-Hintergrund. [(): Mögliche erfolgreiche Rekombination; x = T849A, T849D oder S936D].

**B:** Homozygot-Kreuzung der Rekombinationsmutanten

$$\begin{array}{l}
 \text{P: } \frac{yw}{yw}; \frac{CyO}{sp}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \quad \mathbf{X} \quad \frac{yw}{Y}; \frac{p[trp^x,y^+],trpl^{P302}}{trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \\
 \text{F1: } \frac{yw}{yw}; \frac{CyO}{p[trp^x,y^+],trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}} \quad \mathbf{X} \quad \frac{yw}{yw}; \frac{CyO}{p[trp^x,y^+],trpl^{P302}}; \frac{trp^{P343}}{trp^{P343}}
 \end{array}$$

$$F2: \frac{yw; p[trp^x, y^+], trpl^{P302}; trp^{P343}}{yw; p[trp^x, y^+], trpl^{P302}; trp^{P343}}$$

**Kreuzung 5.6: Homozygot-Kreuzung der Rekombinationsmutanten:** Gezeigt ist das Kreuzungsschema zur Herstellung einer homozygoten transgenen TRP-Mutante ( $trp^x$ ) im TRPnull- und TRPLnull-Hintergrund ( $x = T849A, T849D, S936D$ ).

### 5.5.3.4 Austausch des 2. Chromosoms der *primo-2*-Mutante

**A:**

$$P: w; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \quad \times \quad w; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y}$$

$$F1: w; \frac{+}{sp}; \frac{+}{MKRS}$$

**B:**

$$P: w; \frac{inaC; primo-2}{inaC; primo-2} \quad \times \quad w; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y}$$

$$F1: w; \frac{inaC; primo}{CyO; TM2y}$$

**C:**

$$P: w; \frac{+}{sp}; \frac{+}{MKRS} \quad \times \quad w; \frac{inaC; primo-2}{CyO; TM2y}$$

$$F1: w; \frac{+}{CyO}; \frac{MKRS}{primo-2} \quad \times \quad w; \frac{+}{CyO}; \frac{MKRS}{primo-2}$$

$$F2) w; \frac{+}{+}; \frac{primo-2}{primo-2}$$

**Kreuzung 5.7: Kreuzung zum Austausch des 2. Chromosoms der *primo2*-Mutante mit dem 2. Chromosom eines Wildtyps.** **A:** Kreuzung einer *white;sp;MKRS*-Fliege (in Rot). **B:** Kreuzung einer *white;inaC/Cyo;primoMKRS*-Fliege (in grün). **C:** Kreuzung der finalen *primo*-Mutante mit neuem wildtypischen 2. Chromosom aus den Fliegen aus A und B (in Gelb).

### 5.5.3.5 Herstellung einer *yw; inaC<sup>P209</sup>; pkc53e-RNAi/gmr>Gal4*-Mutante

**A:** Kreuzung zur Herstellung einer *inaC<sup>P209</sup>*-Fliege mit dem Balancer MKRS

$$P: w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}} \quad \times \quad yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y}$$

$$F1: (y)w; \frac{inaC^{P209}}{CyO}; \frac{+}{MKRS} \quad \times \quad (y)w; \frac{inaC^{P209}}{CyO}; \frac{+}{MKRS}$$

$$F2: (y)w; \frac{inaC^{P209}; MKRS}{inaC^{P209}; +}$$

**B:** Kreuzung zur Herstellung einer *inaC<sup>P209</sup>*-Fliege mit der RNAi gegen *pkc53e(br)*

$$P: yw; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y} \quad \times \quad yw; \frac{+}{+}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{pkc53e(br)-RNAi}$$

$$F1: yw; \frac{CyO}{+}; \frac{MKRS}{pkc53e(br)-RNAi} \quad \times \quad yw; \frac{CyO}{+}; \frac{MKRS}{pkc53e(br)-RNAi}$$

$$F2: yw; \frac{CyO}{+}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{pkc53e(br)-RNAi} \quad \times \quad (y)w; \frac{inaC^{P209}; MKRS}{inaC^{P209}; +}$$

$$F3: yw; \frac{CyO}{inaC^{P209}}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{MKRS} \quad \times \quad yw; \frac{CyO}{inaC^{P209}}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{MKRS}$$

$$F4: yw; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{pkc53e(br)-RNAi}$$

**C:** Kreuzung zur Herstellung einer *inaC<sup>P209</sup>*-Fliege mit dem *gmr>Gal4* Treiberstamm

P:	$y^w; \frac{wg^{Sp-1}}{CyO}; \frac{gmr-Gal4}{gmr-Gal4}$	X	$y^w; \frac{sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM2y}$
F1:	$y^w; \frac{CyO}{sp}; \frac{gmr-Gal4}{MKRS}$	X	$y^w; \frac{CyO}{sp}; \frac{gmr-Gal4}{MKRS}$
F2:	$y^w; \frac{CyO}{sp}; \frac{gmr-Gal4}{gmr-Gal4}$	X	$(y)w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{MKRS}{+}$
F3:	$(y)w; \frac{CyO}{inaC^{P209}}; \frac{gmr-Gal4}{MKRS}$	X	$(y)w; \frac{CyO}{inaC^{P209}}; \frac{gmr-Gal4}{MKRS}$
F4:	$(y)w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{gmr-Gal4}{gmr-Gal4}$		

**D:** Kreuzung zur Herstellung einer *inaC<sup>P209</sup>*-Fliege mit einer unter Kontrolle von *gmr>Gal4* exprimierten *pkc53e*-RNAi

P:	$(y)w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{pkc53e(br)-RNAi}{pkc53e(br)-RNAi}$	X	$(y)w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{gmr-Gal4}{gmr-Gal4}$
F1:	$(y)w; \frac{inaC^{P209}}{inaC^{P209}}; \frac{PKC53E(br)-RNAi}{gmr-Gal4}$		

**Kreuzung 5.8: Kreuzung zur Herstellung einer ePKC/PKC53E(br)-„Doppelmutante“.** **A:** Kreuzungsschema zur Herstellung einer ePKC-Fliege mit MKRS-Balancer (in Blau). **B:** Kreuzungsschema zur Herstellung einer *inaC*-Mutante mit der RNAi für PKC53E(br) (in Grün) **C:** Kreuzungsschema zur Herstellung einer *inaC*-Mutante mit *gmr* Promotor getriebenem Gal4 (in Rot). **D:** Kreuzungsschema zur Herstellung einer *inaC*-Mutante mit *gmr*-getriebenem Gal4 und der PKC53E(br)-RNAi.

## 5.6 Elektoretinographische Messungen an *Drosophila melanogaster*

Elektrophysiologische Messungen ermöglichen die Aufzeichnung von Spannungsänderungen in lebenden Organismen. Im Falle von Elektoretinogrammen (ERGs) heißt das, dass die lichtabhängige Spannungsänderung im Auge von *Drosophila melanogaster* bestimmt wurde. Das ERG ermittelt hierbei die Potentialänderung von mehreren Photorezeptorzellen in der Retina und der jeweiligen nachgeschalteten Nervenzellen in der Lamina.

### 5.6.1 Aufbau der ERG-Messapparatur

Die für die Messungen verwendeten Fliegen waren, wenn nicht anders vermerkt, ein bis fünf Tage alt und wurden am Rüssel mittels eines Lötkebogens mit einer Bienenwachs-Colophonium-Mischung (3:1) in einer abgeschnittenen gelben 200 µl Pipettenspitze mit herausragendem Kopf fixiert. Anschließend wurden zwei chlorierte Silberdrähte, die in Glaskapillaren mit Davenport-Lösung fixiert waren, jeweils ins Auge und in die Stirnregion der Fliege eingestochen, um eine Potentialänderung zwischen diesen beiden Elektroden messen zu können. Diese abgeleiteten Signale wurden mittels eines DPA-2FS Differenzverstärkers verstärkt, mit einem Analog-Digitalwandler umgewandelt und zur Dokumentation in einen PC mit einer PCI-6221-Messkarte und dem Programm WinWCP gespeist. Die Belichtung der Fliegen erfolgte mit maximal zwei LEDs, die entweder beide

orangenes Licht oder eine blaues und die andere orangenes Licht emittierten, wobei die unabgeschwächte Lichtintensität des orangenen Reizlichtes 2,22 mW/cm<sup>2</sup> betrug, während das orangene Hintergrundlicht mit einer Stärke von 0,3 mW/cm<sup>2</sup> emittierte. Die benutzte blaue LED emittierte mit einer Stärke von 1,38 mW/cm<sup>2</sup> und wurde mit einem Neutralgraufilter auf eine Stärke von 0,6 mW/cm<sup>2</sup> abgeschwächt. Zur Fokussierung des Lichts wurden Linsen benutzt. Um das jeweilige Licht schrittweise abzuschwächen, wurden unterschiedliche Neutralgraufilter in den Strahlengang gebracht. Die gesamte Messapparatur wurde zur Abschirmung von elektrischen Störungen und zur Verhinderung von Fremdbeleuchtung mit einem abgedunkelten Faradaykäfig umgeben, der ein kleines Loch für das Licht der LEDs enthielt.

### **5.6.2 Die Stimulus Protokolle der ERG-Messungen**

Vor Beginn jedes ERG-Protokolls wurden die verwendeten Fliegen drei Minuten in der Messapparatur dunkeladaptiert.

#### **5.6.2.1 Messung eines einzelnen Orangelichtstimulus**

Die Bestimmung der Inaktivierung erfolgte anhand eines einzelnen fünfsekündigen Orangelicht-Stimulus, der zwei Sekunden nach Beginn des Stimulus Protokolls initiiert wurde. Die Gesamtlänge des Protokolls betrug 37 Sekunden.

Die Bestimmung der Deaktivierungszeit erfolgte anhand eines einzelnen 500 ms andauerndem Orangelicht-Stimulus, der zwei Sekunden nach Beginn des Stimulus Protokolls injiziert wurde. Die Gesamtlänge dieses Protokolls betrug 32 Sekunden.

#### **5.6.2.2 OBBOO-Messung**

Bei dieser Art von Stimulus Protokoll wurden die Fliegen mit fünf fünfsekündigen Lichtstimuli, die jeweils in einem Abstand von 10 Sekunden auftraten, gereizt, wobei der erste, vierte und fünfte Lichtstimulus orange war, während der zweite und dritte Stimulus mit blauem Licht durchgeführt wurde.

#### **5.6.2.3 Messung einer Reiz-Antwort-Kurve**

Zur Bestimmung einer Reiz-Antwort-Kurve wurden im Abstand von drei Minuten dreizehn 500 ms andauernde orangefarbige Lichtreize mit ansteigender Intensität gegeben, beginnend mit einer Lichtintensität von  $\log(I/I_{\max}) = -6$  und anschließend abwechselnd um 0,4 bzw. 0,6 ansteigend, bis zur maximalen Lichtintensität von  $\log(I/I_{\max}) = 0$  ( $I_{\max} = 2,22$  mW/cm<sup>2</sup>).

### 5.6.2.4 Messung zur Bestimmung der Refraktärzeit

Zur Bestimmung der Refraktärzeit wurde ein Protokoll mit fünfsekündigen orangenen Lichtstimuli durchgeführt. Nach dem ersten Lichtstimulus, der nicht ausgewertet wurde, wurden die Fliegen für 3 Minuten dunkel adaptiert und erneut mit orangenem Licht stimuliert. Anschließend wurden die Erholungszeiten auf die folgenden Lichtreize schrittweise erhöht, angefangen mit 10 Sekunden Erholungszeit, dann 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s und anschließend 180 s. Die Zeitspanne, die die Fliege zur Ausbildung eines maximalen Signals benötigt, hier in diesem Fall wurde das Signal als Referenz verwendet, das nach drei Minuten Erholungszeit aufgenommen wurde, entspricht dabei der Refraktärzeit der Photorezeptorzelle.

### 5.6.2.5 Messung zur Ermittlung der Adaptation

Zur Ermittlung der Adaptation der Photorezeptoren wurde die Amplitude eines gleichbleibend starken orangenem Reizlichtstimulus ( $I_{\max} = 2,22 \text{ mW/cm}^2$ ) in Abhängigkeit von unterschiedlich starken Hintergrundlichtstärken bestimmt. Für die Messung wurde das Hintergrundlicht für 35 Sekunden angeschaltet. Nach 30 Sekunden wurde der fünfsekündige Messreiz appliziert. Die Intensität des Hintergrundlichts ( $I/I_{\max}$ ) wurde bei jeder Messung um einen Faktor von 10 verstärkt, beginnend bei der  $10^{-7}$  fachen Reizlichtstärke, bis das Hintergrundlicht ein Zehntel der Reizlichtstärke erreicht hatte. Zwischen den einzelnen Messungen wurden jeweils drei Minuten lange Dunkelphasen eingeschoben.

## 5.7 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden zur Ermittlung ihrer Signifikanz einem zweiseitigen t-Test für zwei unabhängige Stichproben bei gleicher Varianz mit Excel (Typ 2) oder GraphPad Prism unterzogen. Bei zwei unabhängigen Stichproben mit ungleicher Varianz wurde ein t-Test mit Welch-Korrektur, auch Welch-Test genannt, verwendet und mit Excel berechnet (Typ 3). Für die t-Tests wurde ein Signifikanzniveau von mindestens  $p > 0,05$  festgesetzt (siehe Tabelle 5.7).

P-Wert	Signifikanzniveau
> 0,05	kein signifikanter Unterschied
< 0,05	signifikanter Unterschied (*)
< 0,01	hoch signifikanter Unterschied (**)
< 0,001	höchst signifikanter Unterschied (***)

**Tabelle 5.7:** Darstellung der Signifikanzniveaus in Abhängigkeit ihrer P-Werte.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Screen zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals in *Drosophila melanogaster*

In Folge der lichtabhängigen Aktivierung der visuellen Signaltransduktionskaskade im Auge von *Drosophila melanogaster* wird der TRP-Kanal phosphoryliert (Voolstra et al., 2010a; Voolstra et al., 2013). Um diese Phosphorylierung besser untersuchen zu können, wurden phosphospezifische Antikörper gegen die vorwiegend im Licht phosphorylierten Aminosäuren Threonin 849 und Threonin 864 (Voolstra et al., 2013) und gegen die einzige vornehmlich im Dunkeln phosphorylierte Aminosäure Serin 936 des TRP-Kanals hergestellt (Voolstra et al., 2010a), die nachfolgend als  $\alpha$ -pT849,  $\alpha$ -pT864 und  $\alpha$ -pS936 bezeichnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese phosphospezifischen Antikörper (AK) dazu verwendet, Kinasen und Phosphatasen zu finden, die die Phosphorylierung des TRP-Kanals entweder direkt oder indirekt an diesen drei Phosphorylierungsstellen beeinflussen. Dafür wurden Mutanten mittels Westernblotanalyse (siehe 5.1.3.1) untersucht, in denen entweder eine Kinase oder eine Phosphatase mutiert waren.

#### 6.1.1 Linearitätsanalyse der phosphospezifischen Antikörper $\alpha$ -pT849, $\alpha$ -pT864, $\alpha$ -pS936 und des $\alpha$ -TRP-Antikörpers

Um die Linearität der Signalintensität unter Verwendung der phosphospezifischen Antikörper  $\alpha$ -pT849,  $\alpha$ -pT864,  $\alpha$ -pS936 und des panspezifischen-TRP-Antikörpers ( $\alpha$ -TRP-Antikörper) zu überprüfen, wurden unterschiedliche Mengen an Proteinextrakten aus Wildtyp-Köpfen mit Proteinextrakten aus *trp*<sup>P343</sup>-Nullmutanten supplementiert, wodurch gleiche Gesamtproteinmengen sichergestellt waren. Das Pipettierschema ist in Tabelle 6.1 angegeben. Es wurden jeweils drei Kopfüquivalente auf ein SDS-Gel geladen und einer Westernblot-Analyse zugeführt. Nach Inkubation mit dem  $\alpha$ -TRP-Antikörper wurden die Membranen wieder vom  $\alpha$ -TRP-Antikörper befreit und anschließend mit dem  $\alpha$ -pT849-, dem  $\alpha$ -pT864- oder dem  $\alpha$ -pS936-Antikörper inkubiert. Diese Bedingungen entsprachen denen des Screens (siehe 5.1.3.2).

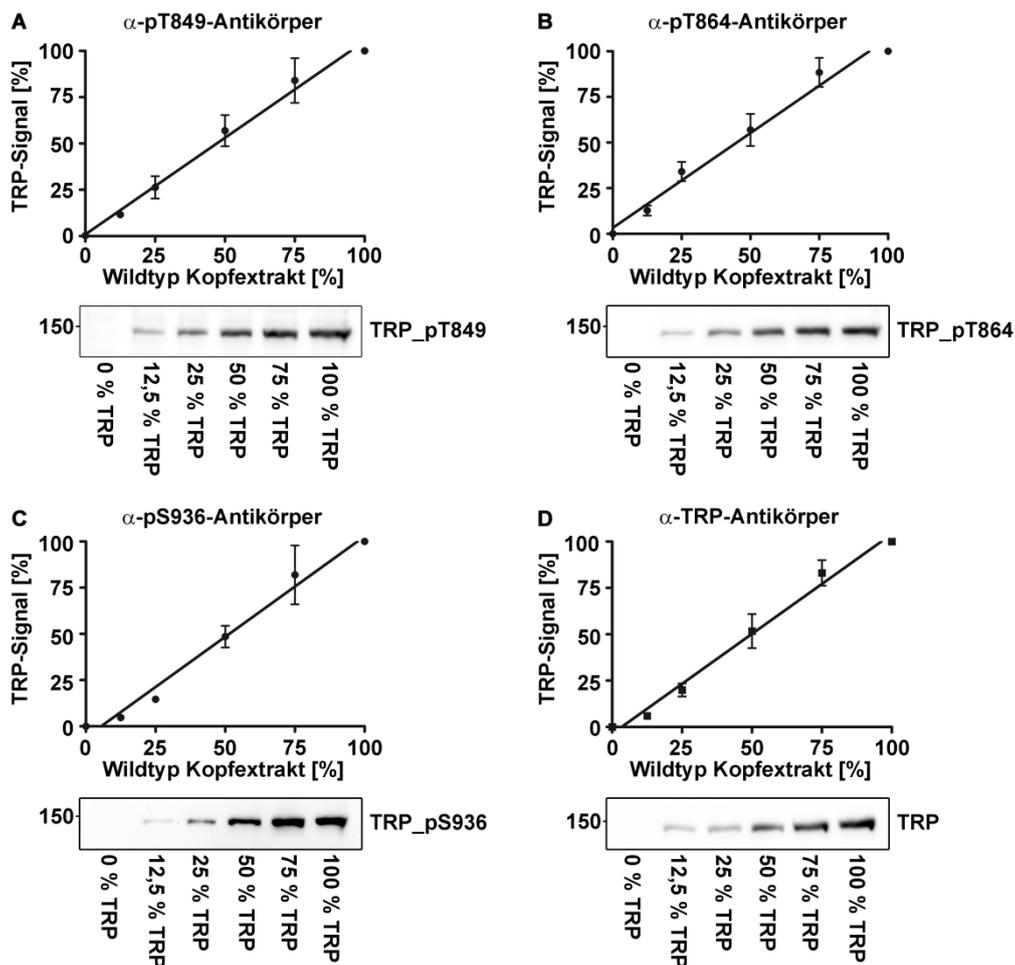
TRP-Menge	Wildtyp-Extrakt	<i>trp</i> <sup>P343</sup> -Extrakt
100 %	40 $\mu$ l	0 $\mu$ l
75 %	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l
50 %	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

## Ergebnisse

TRP-Menge	Wildtyp-Extrakt	<i>trp</i> <sup>P343</sup> -Extrakt
25 %	10 µl	30 µl
12,5 %	5 µl	35 µl
0 %	0 µl	40 µl

**Tabelle 6.1: Mischungsverhältnis der Extrakte** für die Validierung der phosphospezifischen Antikörper  $\alpha$ -pT849,  $\alpha$ -pT864,  $\alpha$ -S936 und des  $\alpha$ -TRP-Antikörper.

Die Antikörpersignale von drei Replikaten wurden gemittelt und die höchste Signalintensität, die bei der 100 %igen TRP-Konzentration auftritt, wurde auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 6.1: Linearitätsprüfung der phosphospezifischen TRP-Antikörper  $\alpha$ -T849,  $\alpha$ -T864,  $\alpha$ -S936 und des panspezifischen  $\alpha$ -TRP-Antikörpers.** Überprüfung der Linearität des AK-Signals mit zunehmender TRP-Menge. Es wurden unterschiedliche TRP-Mengen in den Extrakten durch Mischung von Wildtyp-Kopfextrakten mit Kopfextrakten der *trp*-Nullmutante eingestellt (siehe Tabelle 6.1). Die so hergestellten Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit dem  $\alpha$ -TRP-Antikörper und anschließend einem der phosphospezifischen Antikörper  $\alpha$ -T849,  $\alpha$ -T864 oder  $\alpha$ -S936 untersucht. In den Diagrammen ist der Zusammenhang zwischen dem TRP-Gehalt in den Kopfextrakten und der Signalstärke der AK in Prozent angegeben ( $\pm$  Standardfehler). Die Ausgleichsgerade wurde aus den ermittelten Werten errechnet. Unterhalb der Graphen sind repräsentative ECL-Aufnahmen gezeigt. Auf der linken Seite der Westernblots ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben **A-C:** Validierung der phosphospezifischen AK pT849 (**A**), pT864 (**B**) und pS936 (**C**) ( $n = 3$ ) **D:** Validierung des panspezifischen monoklonalen TRP-Antikörpers ( $n = 6$ ).

Wie in der Abbildung 6.1 zu erkennen ist, zeigen alle getesteten Antikörper einen linearen Anstieg der Signalintensität proportional zu der TRP-Menge, die im Extrakt enthalten ist.

### 6.1.2 Ergebnisse des Screens zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals

Nach der Validierung der phosphospezifischen AK für die drei zu untersuchenden Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 sowie des panspezifischen TRP-AK wurden diese verwendet, um einen Screen nach Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals durchzuführen. Dafür wurden Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) mit einer Mutation in einer Kinase oder Phosphatase verwendet, die im Auge von *Drosophila melanogaster* exprimiert werden, da man sonst alle 251 Kinasen und 86 Phosphatasen (Morrison et al., 2000) untersuchen müsste. Diese Fliegen wurden mittels FlyBase und FlyAtlas ermittelt und mussten im „*Drosophila* gene expression atlas“ (flyatlas.org) mindestens einen mRNA Wert von 70 im Auge vorweisen, da zum Beispiel das im Auge relevante *ninaC*-Gen, das für zwei Kinasen kodiert (Montell and Rubin, 1988), wovon eine direkt an das Gerüstprotein INAD bindet und dessen Mangel zur Störung in der Phototransduktion führt (Wes et al., 1999), einen mRNA-Wert von  $72 \pm 16$  aufweist, während die für das *Drosophila*-Auge eher irrelevante Shark-Kinase, die an der dorsalen Schließung im Embryo beteiligt ist (Fernandez et al., 2000), einen mRNA-Wert von nur  $39 \pm 0$  zeigt. Wenn es noch keine Daten zu den entsprechenden Mutanten gab, wurden diese in den Screen aufgenommen. Bei einer Verfügbarkeit mehrerer Allele wurden diejenigen ausgewählt, bei denen der Verlust der Kinase oder Phosphatase am stärksten war. Eine weitere Bedingung für die Mutanten war, dass die Fliegen in unserer laboreigenen Stammsammlung vertreten oder die Fliegen frei erhältlich waren, d.h. entweder im „Bloomington *Drosophila* Stock Center“ der Universität von Indiana oder im „Vienna *Drosophila* Resource Center“. Nach diesen Kriterien wurden 53 Kinasen, 26 Phosphatasen und sechs weitere Mutanten, die möglicherweise die Phosphorylierung des TRP-Kanals beeinflussen könnten, identifiziert. Bei der Durchführung des Screens wurden ein bis fünf Tage alte Fliegen entweder mindestens 16 Stunden dunkeladaptiert und dann für eine Stunde belichtet oder sie wurden mindestens 16 Stunden belichtet und dann für eine Stunde dunkeladaptiert (siehe 5.1.1). Die Fliegenköpfe dieser Fliegen wurden einer Westernblotanalyse unterzogen, wobei der Phosphorylierungszustand der Stellen T849, T864 und S936 des TRP-Proteins mit Hilfe der phosphospezifischen Antikörper untersucht wurde. Die Gesamt-TRP-Menge wurde mit Hilfe des panspezifischen  $\alpha$ -TRP-Antikörpers ermittelt und diente zusätzlich noch als Ladekontrolle. Mutanten, deren Phosphorylierungsniveau der Stellen T849, T864 und/oder S936 nach dem ersten Durchgang des Screens geringer als 50 % oder höher als 200 % im Vergleich zum Wildtyp war (in den Tabellen 6.2 bis 6.4 rot markiert), wurden im Rahmen eines Rescreens erneut

## Ergebnisse

untersucht. Wobei der verwendete Wildtyp für den gesamten Screen *Drosophila melanogaster* Fliegen mit einer *white*-Mutation waren. Diese Mutation generiert in den Fliegen weiße Augen und wurde deshalb benutzt, da der überwiegende Teil der zu untersuchenden Mutanten ebenfalls eine *white*-Mutation trugen und/oder weiße Augen hatten.

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
AMP-aktivierte Proteinkinase $\alpha$ Untereinheit ( <i>AMPK<math>\alpha</math>1</i> )	Nein	Punktmutation	247	0	128	1	4	105
Aktivierte Cdc42 Kinase ( <i>ack</i> )	Ja	P-Element Insertion	142	6	92	14	7	84
Akt1 ( <i>akt1</i> )	Nein	P-Element Insertion	124	1	83	1	2	94
Argininekinase ( <i>argk</i> )	Ja	P-Element Insertion	116	2	87	6	3	31
	Nein	P-Element Insertion	206	7	94	27	3	0
Augen-Proteinkinase C ( <i>inaC</i> )	Ja	Nullmutation	17	6	101	41	2	78
Atypische Proteinkinase C ( <i>aPKC</i> )	Nein (RNAi)	RNAi-Konstrukt	101	1	85	7	3	143
CAMP-abhängige Proteinkinase 1 ( <i>pka-c1</i> )	Ja	Punktmutation	88	1	149	13	6	77
CAMP-abhängige Proteinkinase 3 ( <i>pka-c3</i> )	Ja	P-Element Insertion	88	1	117	8	2	52

Ergebnisse

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Caki ( <i>cask</i> )	Ja	P-Element Insertion	153	12	59	2	5	111
	Nein	Deletion	255	12	66	2	0	113
Calcium/- Calmodulin- abhängige protein- kinase I ( <i>camkI</i> )	Ja	P-Element Insertion	102	2	92	8	1	116
seinkinase Iα ( <i>ckIα</i> )	Ja	P-Element Insertion	70	1	17	4	2	117
Caseinkinase IIα ( <i>ckIIα</i> )	Nein (RNAi)	RNAi- Konstrukt	108	1	163	9	2	43
CG7766 ( <i>cg7766</i> )	Ja	P-Element Insertion	49	1	56	8	2	62
Downstream von raf1 ( <i>Dsor1</i> )	Ja	P-Element Insertion	61	1	74	5	2	124
Foraging ( <i>for</i> )	Ja	P-Element Insertion	54	1	58	5	2	118
Fps oncogene analog ( <i>fps85d</i> )	Ja	P-Element Insertion	29	1	59	1	1	78
Germinal centre kinase III ( <i>gckIII</i> )	Nein	P-Element Insertion	78	1	56	4	3	74
Genghis khan ( <i>gek</i> )	Ja	P-Element Insertion	105	1	89	9	14	134
Gilgamesh ( <i>gish</i> )	Ja	P-Element Insertion	231	2	87	9	6	138
	Ja	P-Element Insertion	179	2	110	13	12	96

Ergebnisse

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
	Heat shock	P-Element Insertion	49	9	89	9	5	138
G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 1 ( <i>gprk1</i> )	Heat shock	P-Element Insertion	136	8	108	6	4	200
	Nein (RNAi)	RNAi-Konstrukt	178	2	103	3	2	72
	Nein (RNAi)	RNAi-Konstrukt	92	1	59	3	2	84
G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 ( <i>gprk2</i> )	Ja	P-Element Insertion	109	3	116	21	4	62
Grapes ( <i>grp</i> )	Ja	P-Element Insertion	117	3	95	9	3	87
Hopscotch ( <i>hop</i> )	Ja	P-Element Insertion	132	3	119	15	3	45
Hippo ( <i>hpo</i> )	Ja	P-Element Insertion	321	3	101	12	12	146
Licorne ( <i>lic</i> )	Nein	P-Element Insertion	88	8	23	3	2	66
Lightoid ( <i>ltd</i> )	Ja	P-Element Insertion	91	3	104	16	12	79
MAP Kinase aktivierte Proteinkinase 2 ( <i>mapk-ak2</i> )	Ja	P-Element Insertion	104	2	120	4	3	101
MAP-Kinase Kinase 4 ( <i>mkk4</i> )	Nein	P-Element Insertion	104	2	120	4	3	101
Mekk1 ( <i>mekk1</i> )	Ja	P-Element Insertion	151	2	114	11	2	90

Ergebnisse

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Mpk2 ( <i>mpk2</i> )	Ja	P-Element Insertion	76	2	97	3	3	117
Mushroom bodies tiny ( <i>mbt</i> )	Ja	P-Element Insertion	164	3	166	11	2	23
Neither inactivation nor after-potential C ( <i>ninaC</i> )	Ja	Punktmutation	71	3	69	2	3	123
P38b ( <i>p38b</i> )	Ja	P-Element Insertion	136	25	72	30	5	176
Pak3 ( <i>pak3</i> )	Ja	P-Element Insertion	141	4	89	11	2	118
Par-1 ( <i>par-1</i> )	Ja	P-Element Insertion	133	3	65	9	2	64
PTEN-induzierte Putative Kinase 1 ( <i>pink1</i> )	Ja	P-Element Insertion	118	3	76	9	2	59
Proteinkinase-like 17E ( <i>pk17E</i> )	Ja	P-Element Insertion	114	2	95	10	3	76
Phosphoinositide- abhängige Kinase 1 ( <i>pdk1</i> )	Ja	P-Element Insertion	145	1	207	8	2	128
Proteinkinase an 92B ( <i>pk92B</i> )	Ja	P-Element Insertion	48	1	96	15	8	139
Proteinkinase C 53E (br) ( <i>pkc53e</i> )	Ja	P-Element Insertion	43	1	59	2	6	99
	Nein (RNAi)	RNAi	60	1	91	6	2	108
Proteinkinase C 98E ( <i>pkc98e</i> )	Nein	P-Element Insertion	96	2	96	13	3	100

Ergebnisse

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Proteinkinase C 98E ( <i>pkc98e</i> )	Nein (RNAi)	RNAi-Konstrukt	108	1	110	7	2	118
Proteinkinase verwandt mit Proteinkinase N ( <i>pkn</i> )	Nein (RNAi)	RNAi-Konstrukt	99	1	78	5	6	127
Proteinkinase D ( <i>pkd</i> )	Ja	P-Element Insertion	88	4	139	27	5	50
Pyruvate-dehydrogenase-kinase ( <i>pdk</i> )	Ja	P-Element Insertion	144	0	130	3	2	65
Rolled ( <i>rl</i> )	Ja	Loss of function	260	0	120	1	2	106
RPS6-p70-Proteinkinase ( <i>sk6</i> )	Nein	P-Element Insertion	100	11	93	10	2	100
Saxophone ( <i>sax</i> )	Nein	P-Element Insertion	297	1	101	3	0	108
Shaggy ( <i>sgg</i> )	Nein Dominant Negativ	Dominant negativ	110	2	125	14	1	150
	Nein Dominant Negativ	Dominant negativ	248	6	100	20	10	138
	Nein Dominant Negativ	Dominant negativ	283	8	88	16	10	133
	Nein Dominant Negativ	Dominant negativ	206	15	88	27	10	156

## Ergebnisse

Kinasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Salt-induzierbare-Kinase 3 ( <i>sik3</i> )	Ja	P-Element Insertion	127	4	113	19	2	90
Smell impaired 35A ( <i>smi35a</i> )	Ja	P-Element Insertion	87	1	121	8	4	85
TGF- $\beta$ aktivierte Kinase 1 ( <i>tak1</i> )	Ja	Loss of function	87	1	92	5	3	137
Tao ( <i>tao-1</i> )	Ja	P-Element Insertion	101	1	23	2	3	90
Ziel von Rapamycin ( <i>tor</i> )	Ja	P-Element Insertion	61	4	111	1	2	91

**Tabelle 6.2 Überprüfte Kinasen:** Aufgelistet sind die 53 überprüften Kinasen-Mutanten, die unmutiert mindestens einen mRNA Wert von über 70 im Auge von *Drosophila melanogaster* vorweisen können, ob diese Kinase Mutationen homozygot waren, was für eine Art von Mutation in diesen Fliegen vorlag und das Phosphorylierungsniveau (in Prozent) dieser Mutanten an den Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 im Vergleich zum jeweiligem Wildtypniveau im Hellen von den Stelle T849 und T864 und im Dunkeln für die Stelle S936. Dies wurde bei Fliegen, die mind. 16 h im Dunkeln und anschließend 1h belichtet wurden (hell), und bei Fliegen, die mind. 16 h belichtet wurden und dann 1 h im Dunkel gehalten wurden (dunkel), durchgeführt. In Rot markiert sind die Phosphorylierungsniveaus mit weniger/gleich 50 % oder über/gleich 200 % des Phosphorylierungsniveaus des Wildtyps.

Nach der ersten Westernblotanalyse der Kinasen zeigten die Mutanten für die AMP-aktivierte Protein Kinase  $\alpha$  Untereinheit, die Kinasen Arginine Kinase, Caki, Gilgamesh, Hippo, Rolled, Saxophone und Saggy, ein um über 200 % erhöhtes Phosphorylierungsniveau an der Phosphorylierungsstelle T849 im Vergleich zum Wildtyp, während die Kinasen CG7766, die Augen Protein Kinase C (ePKC), Fps oncogene analog, die Protein Kinase an 92B und die Protein Kinase C 53E(br) (PKC53E(br)), ein um mindestens 50 % verringertes Phosphorylierungsniveau an der Stelle T849 aufwiesen.

Das Fehlen der Caseinkinase I $\alpha$  oder der Kinase Licorne führte zu einer Verringerung der Phosphorylierung an der Stelle T864, während es ohne die Phospho-inositide-abhängigen Kinase 1 zu einer erhöhten Phosphorylierung an dieser Stelle kam.

## Ergebnisse

Eine Beeinträchtigung der Arginine Kinase, der Caseinkinase II $\alpha$ , der Augen Protein Kinase C, Hopscotch, Mushroom bodies tiny oder der Protein Kinase D führte zu einer Verringerung der Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S936 um mindestens 50 %.

Die Ergebnisse der 26 gescreenten Phosphatase-Mutanten sind in der Tabelle 6.3 dargestellt. Es zeigten sich auch hier bei einigen Mutanten Abweichungen im Phosphorylierungsniveau vom Wildtyp (Tab. 6.3 rot markiert). Die Mutante für die Metallophosphoesterase zeigte an den Phosphorylierungsstellen T864 und S936 jeweils ein verringertes Phosphorylierungsniveau. Die Mutante für die Phosphatase Primo-2 zeigte für die Stelle T849 eine verringerte Phosphorylierung, während die Phosphatase Retinal degeneration C (RDGC) an der Stelle S936 eine starke Erhöhung der Phosphorylierung in belichteten Fliegen aufwies.

Phosphatasen ( <i>Gen</i> )	homo- zygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
5Ptase I ( <i>5PtaseI</i> )	Ja	P-Element Insertion	63	2	75	10	3	101
Alphabet ( <i>alph</i> )	Ja	P-Element Insertion	136	4	108	14	2	91
CG10376 ( <i>cg10376</i> )	Ja	P-Element Insertion	117	3	74	1	2	119
CG17746 ( <i>cg17746</i> )	Ja	P-Element Insertion	90	2	118	14	3	76
CG7115 ( <i>cg7115</i> )	Ja	P-Element Insertion	113	3	132	15	3	88
Corkscrew ( <i>csw</i> )	Ja	P-Element Insertion	106	1	85	7	7	95
Flapwing ( <i>flw</i> )	Ja	Hypermorphes Allel	156	6	105	21	2	62
Leukocyte-Antigen-verwante-like ( <i>lar</i> )	Ja	P-Element Insertion	97	4	101	14	3	91
lethal (1) G0232 ( <i>l(1)G0232</i> )	Ja	P-Element Insertion	117	3	112	15	5	169

Ergebnisse

Phosphatasen (Gen)	homo-zygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Metallophospho-esterase ( <i>mpps</i> )	Ja	P-Element Insertion	118	1	42	2	5	10
Microtubule star ( <i>mts</i> )	Ja	P-Element Insertion	98	6	147	14	3	106
	Nein	Gen Deletion	100	2	51	7	3	90
Mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase 3 ( <i>mkp3</i> )	Ja	P-Element Insertion	107	2	75	10	3	106
Primo-1 ( <i>primo-1</i> )	Ja	P-Element Insertion	121	1	108	7	1	141
Primo-2 ( <i>primo-2</i> )	Ja	P-Element Insertion	19	14	61	33	7	110
PP2A-B' ( <i>pp2a-b'</i> )	Ja	P-Element Insertion	-	-	-	-	2	81
PRL-1 ( <i>prl-1</i> )	Ja	P-Element Insertion	150	7	41	4	2	107
Proteinphosphatase 1 bei 87B ( <i>pp1-87b</i> )	Ja	P-Element Insertion	99	2	89	5	4	183
Proteinphosphatase 1 $\alpha$ bei 96A ( <i>pp1<math>\alpha</math>-96a</i> )	Nein	Null Allel	90	1	87	7	3	82
Proteinphosphatase 2A bei 29B ( <i>pp2a-29b</i> )	Nein	P-Element Insertion	75	1	68	9	7	148
Proteinphosphatase 2B bei 14D ( <i>pp2b-14d</i> )	Ja	P-Element Insertion	132	8	122	16	4	78
Proteinphosphatase 19C ( <i>pp4-19c</i> )	Ja	P-Element Insertion	100	4	89	13	1	198
Proteinphosphatase D3 ( <i>ppd3</i> )	Ja	P-Element Insertion	168	3	80	9	3	128

## Ergebnisse

Phosphatasen (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Protein Tyrosine Phosphatase-ERK/Enhancer von Ras1 (ptp-er)	Ja	P-Element Insertion	154	4	81	13	7	149
Pyruvatedehydrogenase Phosphatase ( <i>pdp</i> )	Ja	P-Element Insertion	108	2	127	21	2	110
Retinal degeneration C ( <i>rdgC</i> )	Nein	Null Allel	231	1	75	1	2	91
	Ja	Null Allel	101	9	130	42	141	106
Synaptojanin ( <i>syn</i> )	Ja	Überexpression unter <i>rh1</i> -Promotor	10	4	14	15	13	150
	Nein	P-Element Insertion	63	1	103	11	2	121

**Tabelle 6.3 Überprüfte Phosphatasen:** Aufgelistet sind die 26 überprüften Phosphatase-Mutanten, die unmutiert mindestens einen mRNA Wert von über 70 im Auge von *Drosophila melanogaster* vorweisen können, ob diese Phosphatase Mutationen homozygot waren, was für eine Art von Mutation in diesen Fliegen vorlag und das Phosphorylierungsniveau (in Prozent) dieser Mutanten an den Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 im Vergleich zum jeweiligem Wildtypniveau in Hellen vor die Stelle T849 und T864 und im Dunkeln für die Stelle S936. Dies wurde bei Fliegen, die mind. 16 h im Dunkeln und anschließend 1h belichtet wurden (hell), und bei Fliegen, die mind. 16 h belichtet wurden und dann 1 h im Dunkel gehalten wurden (dunkel), durchgeführt. In Rot markiert sind die Phosphorylierungsniveaus mit weniger/gleich 50 % oder über/gleich 200 % des Phosphorylierungsniveaus des Wildtyps.

Die Ergebnisse für die sonstigen Mutanten, die einen indirekten Einfluss auf eventuelle Phosphorylierung haben könnten, da sie entweder Kinasen oder z.B. den Calciumspiegel beeinflussen, sind in Tabelle 6.4 aufgelistet. Hier zeigte die Mutante 14-3-3zeta an der Stelle T864 eine verringerte Phosphorylierung. Bei der Mutante für den Natrium/Calcium-Austauscher in den Photorezeptorzellen, Calx, zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung der hauptsächlich im Hellen phosphorylierten Stelle T864 in dunkeladaptierten Fliegen und zusätzlich noch eine verringerte Phosphorylierung an der Stelle S936. Die Neurocalcin Mutante zeigte nach der ersten Screen-Runde für die Phosphorylierungsstelle S936 ein deutlich erhöhtes Phosphorylierungsniveau, ebenso wie die Mutante für  $\kappa$ B-Ras, die aber zusätzlich auch noch eine erhöhte Phosphorylierung an der Stelle T849 aufwies.

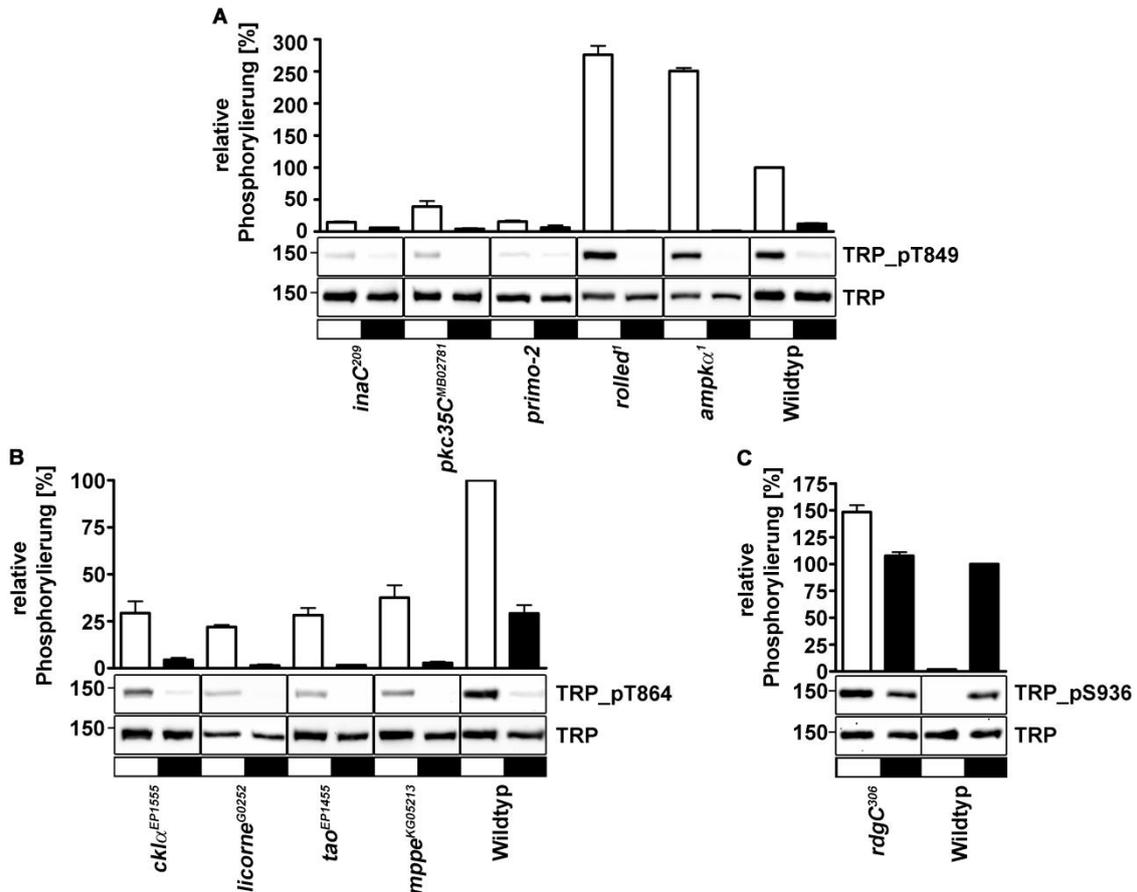
Sonstiges (Gen)	homozygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
14-3-3zeta (14-3-3z)	Ja	P-Element Insertion	105	2	36	3	5	141
Calx (calx)	Ja	Null-Mutante	68	32	80	78	8	43
Ca-P60A (ca-P60A)	Ja	P-Element Insertion	197	1	62	1	2	104
CG2862 (cg2862)	Ja	P-Element Insertion	143	1	75	4	1	159
Neurocalcin (nca)	Ja	P-Element Insertion	146	3	78	12	7	321
kB-Ras (kB-Ras)	Ja	P-Element Insertion	209	3	106	14	6	326

**Tabelle 6.4 Sonstige Mutanten:** Aufgelistet sind die sechs überprüften Proteine, die im Auge von *Drosophila melanogaster* mutiert sind und von denen bekannt ist, dass sie Kinasen oder den  $\text{Ca}^{2+}$  Haushalt beeinflussen, ob diese Mutation homozygot war, was für eine Art von Mutation in diesen Fliegen vorlag und das Phosphorylierungsniveau (in Prozent) dieser Mutanten an den Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 im Vergleich zum jeweiligem Wildtypniveau in Hellen vor die Stelle T849 und T864 und im Dunkeln für die Stelle S936. Dies wurde bei Fliegen, die mind. 16 h im Dunkeln und anschließend 1h belichtet wurden (hell), und bei Fliegen, die mind. 16 h belichtet wurden und dann 1 h im Dunkel gehalten wurden (dunkel), durchgeführt. In Rot markiert sind die Phosphorylierungsniveaus mit weniger/gleich 50 % oder über/gleich 200 % des Phosphorylierungsniveaus des Wildtyps.

### 6.1.3 Die signifikante Beeinflussung des Phosphorylierungsniveaus des TRP-Kanals durch Kinasen und Phosphatasen

Die Mutanten, deren Phosphorylierungsniveaus nach der ersten Westernblotanalyse unter 50 % oder über 200 % des Wildtypniveaus lagen, wurden noch zwei weitere Male, wie für den ersten Screen-Durchgang schon beschrieben, per Westernblot auf die Phosphorylierung der auffälligen Phosphorylierungsstelle hin untersucht. Danach wurden die Ergebnisse aller drei Durchgänge gemittelt und einer statistischen Auswertung mittels t-Test mit Welch-Korrektur unterzogen.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.2: Im Screen identifizierte Kinasen und Phosphatasen, die die TRP-Phosphorylierung beeinflussen.** Westernblotanalyse und Quantifizierung von Kinasen und Phosphatasen mit einer signifikant erhöhten oder verringerten Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp. Im Balkendiagramm wird die relative Quantifizierung der Blotsignale im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Unter den Balkendiagrammen werden repräsentative Westernblots der Kopfextrakte der Mutanten gezeigt, die mit dem jeweiligen phosphospezifischen und dem panspezifischen TRP-Antikörper inkubiert wurden. Alle Signale der Mutanten in **A** und **B** wurden auf den belichteten Wildtypkopfextrakt normalisiert ( $\pm$  Standardfehler), wohingegen die Signale der Mutanten in **C** auf den dunklen Wildtypkopfextrakt normalisiert wurden ( $\pm$  Standardfehler). Die weißen und schwarzen Balken zeigen die Belichtungsbedingungen der jeweiligen Kopfextrakte. Weiß steht für einen Extrakt aus Fliegen, die 16 h dunkeladaptiert und anschließend 1 h belichtet wurden. Schwarz steht für die umgekehrte Bedingung. Auf der linken Seite ist das Molekulargewicht (in kDa) angegeben. **A:** Signifikant veränderte Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T849 im Vergleich zum Wildtyp ( $n = 3$ ). **B:** Signifikant veränderte Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T864 im Vergleich zum Wildtyp ( $n = 3$ ). **C:** Signifikant veränderte Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S936 im Vergleich zum Wildtyp ( $n = 3$ ).

Für die Phosphorylierungsstelle T849 des TRP-Kanals wurden folgende Kinasen und Phosphatasen gefunden, die die Phosphorylierungen dieser Stelle signifikant beeinflussten (Abbildung 6.2A). Zum einen ist die Augen Protein Kinase C (*inaC*) zu nennen, die am INAD-Komplex der visuellen Signaltransduktionskaskade fixiert ist (Huber et al., 1996a; Tsunoda et al., 1997) und von der gezeigt ist, dass sie *in vitro* sowohl den TRP-Kanal als auch das Gerüstprotein INAD phosphorylieren kann (Huber et al., 1996b). Sie zeigt eine deutlich verringerte Phosphorylierung. Auch die Protein Kinase C 53E(br) (*pkc53e*), eine verwandte Kinase der ePKC, die wahrscheinlich aus einer *inaC*-Duplikation hervorging (Smith et al., 1991a), zeigte eine deutliche Verringerung der Phosphorylierungsniveaus. Die Phosphatase Primo-2 (*primo-2*), eine Tyrosin Phosphatase, die eine wichtige Rolle bei vielen

Zellsignalwegen während der Entwicklung inne hat (Miller et al., 2000), zeigte ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung. Zu nennen sind noch die Kinase Rolled (*rolled*), eine Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase, die eine wichtige Rolle in der Rezeptortyrosinkinase vermittelten Signaltransduktion spielt (Biggs et al., 1994) und die AMP-aktivierte Protein Kinase  $\alpha$  Untereinheit (*ampk $\alpha$* ) des AMP-Kinase Komplexes, der ein wichtiger Regulator im ATP-Haushalt von *Drosophila melanogaster* ist (Pan and Hardie, 2002). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Kinasen führt der Verlust dieser beiden Kinasen zu einer deutlich erhöhten Phosphorylierung des TRP-Kanals an der Phosphorylierungsstelle T849

Die Phosphorylierung der Phosphorylierungsstelle T864 wird durch folgende Proteine beeinflusst (Abbildung 6.2B): zum einen von der Kinase Casein Kinase Ia (*ckI $\alpha$* ), eine Serin/Threonin Kinase, von der gezeigt wurde, dass sie eine Rolle im Zellzyklus (Gross et al., 1997) und im Membrantransport spielt (Gross et al., 1995), dann die Kinase Licorne (*licorne*), eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, die einen Einfluss auf die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* haben soll (Suzanne et al., 1999). Es gab noch die Kinase Tao (*tao*), eine Kinase, die ein wichtiger Regulator für die Stabilität von Mikrotubuli inne hat (Hutchison et al., 1998) und die Diesterase Metallophosphoesterase (*mppe*) von der bekannt ist, dass sie das Rhodopsin1 in Photorezeptoren deglykosyliert (Cao et al., 2011). Bei all diesen Mutanten kam es zu einer signifikanten Verringerung der Phosphorylierung an der Stelle T864 des TRP-Kanals im Vergleich zum Wildtyp.

Für die vorwiegend im Dunkeln phosphorylierte Stelle S936, zeigte nur der Verlust der Phosphatase Retinal degeneration C (*rdgC*) eine signifikante Änderung im Phosphorylierungsniveau. In dieser Mutante kam es zur Erhöhung der Phosphorylierung im Hellen (Abbildung 6.2C). Von RDGC ist ja bereits bekannt, dass es sich dabei um eine Phosphatase handelt, die Rhodopsin, einen wichtigen Teil der Signaltransduktionskaskade, dephosphoryliert (Steele and O'Tousa, 1990, Vinos, 1997, 1997). Somit kann man davon ausgehen, dass es auch noch weitere Komponenten dieser Kaskade beeinflusst, wie es auch bei der ePKC der Fall ist, die sowohl den TRP-Kanal als auch das Gerüstprotein INAD phosphorylieren kann (Huber et al., 1996b).

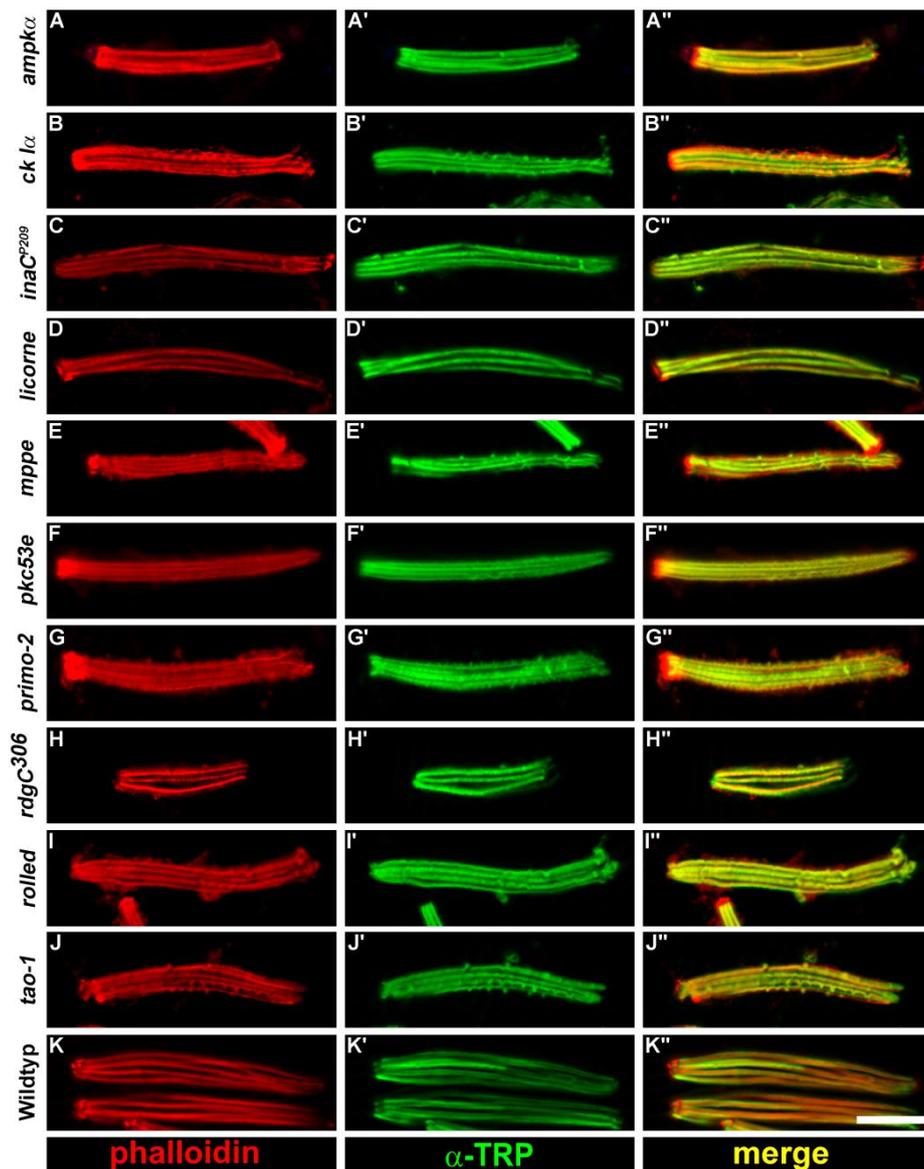
### **6.1.4 Charakterisierung der im Screen identifizierten Phosphatase- und Kinasemutanten**

#### **6.1.4.1 TRP-Lokalisation in der Photorezeptorzelle in den identifizierten Kinase und Phosphatase Mutanten**

Nach der Identifizierung von sieben Kinasen und zwei Phosphatasen, die das Phosphorylierungsniveau des TRP-Kanals an den Stellen T849, T864 oder S936 beeinflussen, stellte sich die Frage, ob das veränderte Phosphorylierungsniveau

## Ergebnisse

gegebenenfalls daraus resultiert, dass der TRP-Kanal subzellulär nicht korrekt lokalisiert war. Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation von TRP wurden Ommatidien aus den Augen der Mutanten mit signifikanten Änderungen im Phosphorylierungsverhalten und des Wildtyps isoliert und immunzytochemisch die Lokalisation des TRP-Kanals untersucht (siehe 5.2.1). Der TRP-Kanal wurde mit dem panspezifischen  $\alpha$ -TRP-Antikörper markiert und dieser wiederum mit einem sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörper detektiert, während die Rhabdomere, die F-Aktin enthalten, mit Hilfe von Alexa Fluor 546-gekoppeltem Phalloidin detektiert wurden.



**Abbildung 6.3 TRP-Lokalisation in isolierten Ommatidien der angegebenen Mutanten**, die eine signifikante Veränderung der Phosphorylierung des TRP-Kanals zeigten und des Wildtyps. **A-K**: Fluoreszenzsignal der Rhabdomere durch ein mit Alexa Fluor 546-gekoppeltes Phalloidin (in rot). **A'-K'**: Der TRP-Kanal wurde mit dem panspezifischen TRP-AK markiert, der von einem Cy5-gekoppelten sekundären AK detektiert wurde (in grün). **A''-K''**: Überlagerung des Phalloidinsignals mit dem TRP-Signal in Gelb. Der Größenmarker (weißer Balken in K'') entspricht 20  $\mu$ m.

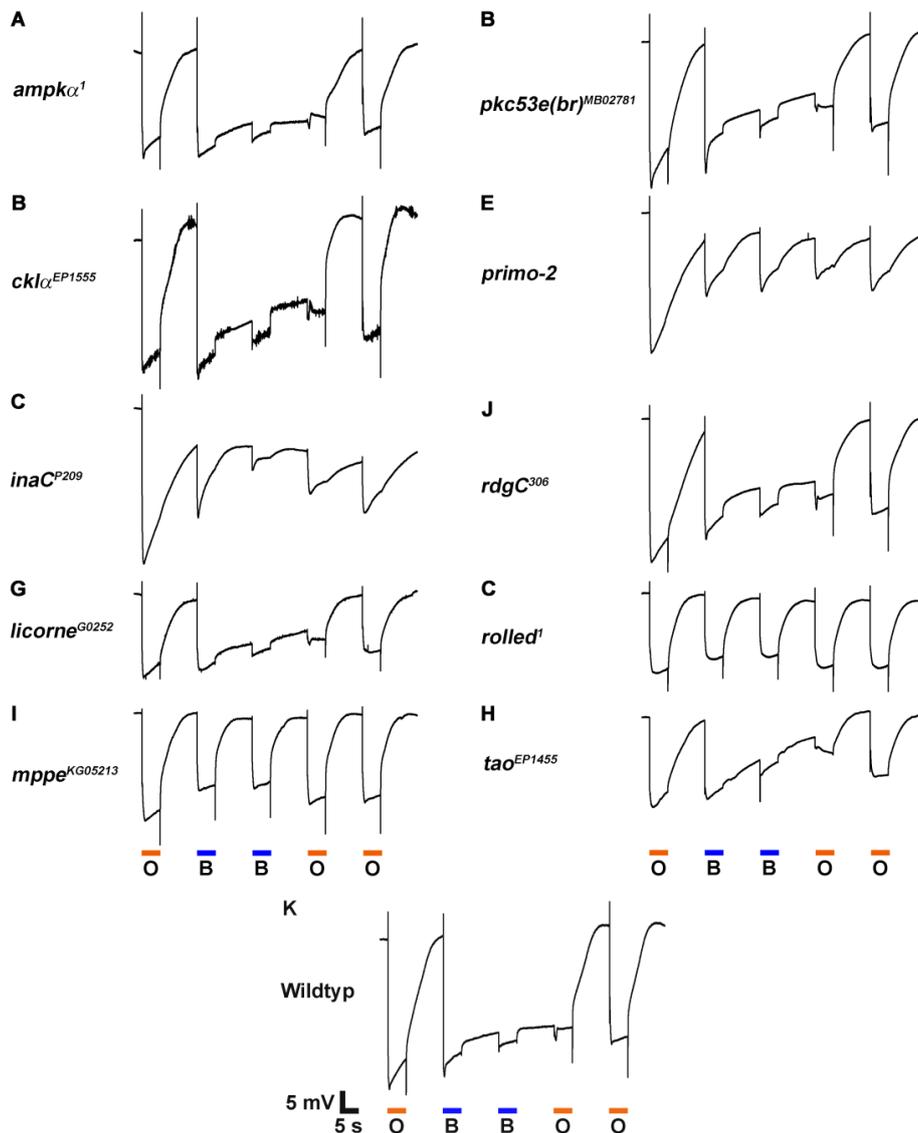
Wie in der Abbildung 6.3 zu sehen ist, war das mit Phalloidin markierte Aktin-Zytoskelett der Rhabdomere aller Mutanten intakt (rotes Signal) und die Expression des TRP-Kanals der Mutanten entsprach der des Wildtyps (grünes Signal). Durch die Überlagerung des roten Phalloidin-Signals mit dem grünen TRP-Signal (in Gelb) konnte auch gezeigt werden, dass der TRP-Kanal sowohl im Wildtyp (K<sup>''</sup>) als auch in den Mutanten (A<sup>''</sup>-J<sup>''</sup>) vollständig in den Rhabdomeren lokalisiert war und somit eine Mislokalisierung ausgeschlossen werden konnte.

### **6.1.4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der identifizierten Kinase- und Phosphatase-Mutanten**

Jetzt stellt sich die Frage, ob das veränderte Phosphorylierungsniveau physiologische Auswirkungen auf die Signalantwort der Photorezeptoren hat. Es ist bereits bekannt, dass das Fehlen der Augen Proteinkinase C (ePKC) (Pak, 1979), die den TRP-Kanal phosphoryliert und der Phosphatase RDGC (Steele and O'Tousa, 1990), die den TRP-Kanal dephosphoryliert, in *Drosophila melanogaster* zu sichtbaren Phänotypen in einem Elektretinogramm (ERG) führen. Deshalb wurde an allen Mutanten, die eine signifikante Veränderung in der Phosphorylierung des TRP-Kanals gezeigt haben, eine sogenannte OBBOO-Messung zur Überprüfung der Funktionalität der Photorezeptorzellen durchgeführt. Dafür wurden die Fliegen fünf aufeinander folgenden jeweils fünf Sekunden andauernden Lichtpulsen (der erste mit orangenem, der zweite und dritte mit blauem und der vierte und fünfte wieder mit orangenem Licht), mit jeweils einer zehn Sekunden andauernden Pause dazwischen, ausgesetzt. Weißäugige Wildtyp-Fliegen bilden zu Beginn des ersten orangenen Lichtpulses einen sogenannten On-Transienten aus, der daran zu erkennen ist, dass das ERG-Signal einen sehr kurzen positiven Peak ausbildet, der anschließend sofort in die Depolarisation des ERGs übergeht. Noch während der Lichtreiz andauert, wandert das Rezeptorpotential langsam in Richtung Baseline zurück. Das ist ein Vorgang, der Inaktivierung genannt wird. Nach Beendigung des Lichtreizes kommt es zum sogenannten Off-Transienten, der daran zu erkennen ist, dass das ERG einen negativen Peak generiert, an den sich dann die Deaktivierungsphase anschließt, während der das ERG wieder auf die Baseline zurückgeht. Auf den darauffolgenden Blaulichtreiz kommt es wieder zu einem On-Transient, einer daran anschließenden Depolarisierung und einer darauffolgenden Inaktivierung. Nach Beendigung des Blaulichtpulses kommt es aber weder zu einer Ausbildung eines Off-Transienten noch zu einer Deaktivierungsphase, sondern zu einer anhaltenden Depolarisation, die PDA (Prolonged Depolarizing Afterpotential) genannt wird. Der Grund für dieses PDA liegt in der massiven Umwandlung von Rhodopsin in Meta-Rhodopsin, das nicht vollständig durch Arrestin inaktiviert werden kann und daher weiter die Signalkaskade aktiviert (Minke et al., 1975b), wobei das PDA eine Besonderheit in weißäugigen Fliegen ist, da das rote Schirmpigment in rotäugigen Fliegen die massive Umwandlung von Rhodopsin zu Metarhodopsin normalerweise verhindert (Langer H., 1967;

## Ergebnisse

Stark, 1973; Strother and Casella, 1972). Ein weiterer Blaulichtpuls wird nur durch eine sehr schwache Depolarisation beantwortet, da die Rezeptorzellen R7 und R8 bei Blaulicht kein PDA ausbilden und somit noch eine normale Lichtantwort geben können. Der darauffolgende orange Lichtpuls beendet das PDA durch Zurückwandlung des Meta-Rhodopsins in Rhodopsin. Daher kommt es auch wieder zu einem Off-Transienten mit einer anschließenden Repolarisation (Stephenson et al., 1983), da nun die Arrestin Menge wieder ausreicht, um das gebildete Metarhodopsin zu inaktivieren (Abb. 6.4K). Die bereits beschriebenen Phänotypen der *inaC*<sup>P209</sup>-Mutante (Abb. 6.4; Pak, 1979) und der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante (Abb. 6.4H; Steele et al., 1992) konnten bei diesen Messungen betätigt werden.

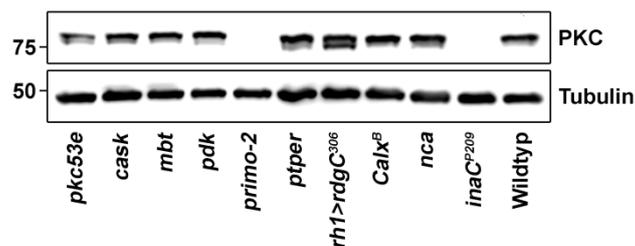


**Abbildung 6.4 Elektroretinogramme** der jeweiligen Mutanten (links angegeben), die eine signifikante Veränderung der Phosphorylierung des TRP-Kanals gezeigt haben. Es wurden OBBOO-Messungen zur Identifizierung eventueller Veränderungen im ERG durch die Mutation der Kinasen (A-I) oder der Phosphatase (J) durchgeführt. K: Zeigt ein typisches Wildtypisches ERG einer OBBOO-Messung. Die farbigen Boxen unter dem ERG stehen für einen fünf Sekunden andauernden Lichtpuls der jeweilig abgegebenen Farbe (O = Orange; B = Blau). Alle OBBOO-Messungen wurden identisch durchgeführt.

Die *inaC*<sup>P209</sup>-Mutante zeigte den erwarteten und auch schon bekannten sogenannten „ina“ (inactivation but no afterpotential) Phänotyp (siehe Abschnitt 3.3.1), den hier auch die *primo-2*-Mutante zeigte, während die *rdgc*-Mutante eine leicht verlängerte Deaktivierungszeit ausbildete. Die *ampkα*- (Abb. 6.4A), die *cklα*- (Abb. 6.4B), die *licorne*- (Abb. 6.4D) und die *pkc53e(br)*-Mutante (Abb. 6.4F) zeigten ein unauffälliges ERG, das dem einer weißäugigen Wildtyp-Flye (Abb. 6.4K) entspricht. Bei den Mutanten Rolled (Abb. 6.4I) und Mppe (Abb. 6.4E) ist zu sehen, dass sie beide kein PDA (prolonged depolarizing afterpotential) nach einer Blaubelichtung ausbilden, sondern ihr ERG, nach Beendigung des Blaulichtpulses, wieder auf die Baseline zurückkehrt und mit der gleichen Amplitude sowohl auf einen erneuten Blaulichtpuls als auch auf einen Orangelichtpuls antworten. Auffällig sind auch die beiden Mutanten für Primo-2 und Tao-1. Die *primo-2*-Mutante (Abb. 6.4G) zeigte genau den gleichen Phänotyp, den auch die *inaC*-Mutante (Abb. 6.4C) aufwies. Die letzte Auffälligkeit zeigte die *tao-1*-Mutante, die weder einen on- noch einen off-Transienten ausbildete (Abb. 6.4H).

### 6.1.4.3 Test der identifizierten Kinase-Mutanten für die Phosphorylierungsstelle T849 auf Proteinkinase C-Expression

Da die *primo-2*-Mutante einen der *inaC*-Mutante frappierend ähnlichen ERG-Phänotypen aufwies, stellte sich die Frage, ob die *primo-2*-Mutante eventuell zusätzlich eine *inaC*-Mutation trug. Um dies für die *primo-2*-Mutante und alle anderen Mutanten zu überprüfen, die eine verringerte Phosphorylierung an der Stelle T849 zeigten, wurden Westernblotanalysen unter Verwendung eines  $\alpha$ -ePKC-Antikörpers durchgeführt.



**Abbildung 6.5 Test auf Eye-Proteinkinase C der Mutanten mit verringerter Phosphorylierung an der Stelle T849:** Test auf ePKC-Expression in den Mutanten, die eine mind. 100 % erhöhte oder um mind. 50 % verringerte Phosphorylierung des TRP-Kanals an der Phosphorylierungsstelle T849 zeigten. Die Westernblotsignale auf Höhe von ca. 75 kDa zeigen die Anwesenheit der ePKC. Auf der Höhe von 50 kDa ist die Ladekontrolle mit einem Tubulin-AK zu sehen. Auf der linken Seite ist das Molekulargewicht (in kDa) angegeben.

Wie sich herausstellte, zeigte die *primo-2*-Mutante, genau wie die *inaC*-Mutante auch, nach Inkubation mit einem  $\alpha$ -ePKC-Antikörper kein Signal auf der Höhe von ca. 75 kDa. Indessen zeigten alle anderen Mutanten und der Wildtyp ein PKC Signal (Abb. 6.5). Daraus folgt, dass der Phänotyp der *primo-2*-Mutante, der stark verlängerten Deaktivierung des ERGs, sehr wahrscheinlich auf das Fehlen der ePKC zurückzuführen ist. Daraufhin wurde in der *primo-2*-Mutante das 2.Chromosom, auf dem das mutierte *inaC*-Gen lokalisiert ist, mit dem einer

Wildtypfliege getauscht (siehe Methoden Kreuzung 5.5.3.4), um dann anschließend noch einmal mit den drei phosphospezifischen AK untersucht zu werden. Diese Untersuchung ergab, dass die *primo-2*-Mutation keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsniveau des TRP-Kanals hat (Tabelle 6.5), da sie die Bedingungen für einen Rescreen, mit einem Phosphorylierungsniveau von unter/gleich 50% oder über/gleich 200% im Vergleich zum Wildtyp, nicht erfüllt.

Phosphatase (Gen)	homo- zygot	Mutation	Relative Phosphorylierung des TRP-Kanals im Verhältnis zum Wildtyp an den Aminosäuren [%]					
			T849		T864		S936	
			hell	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel
Primo-2 mit <i>inaC<sup>P209</sup></i> -Mutation ( <i>w;inaC;primo-2</i> )	Ja	P-Element insertion	19	14	61	33	7	110
Primo-2 ohne <i>inaC</i> -Mutation ( <i>w;+;primo-2</i> )	Ja	P-Element insertion	124	3	172	12	2	115

**Tabelle 6.5 Primo-2 Untersuchung:** Gezeigt ist die Primo-2 Mutation vor den Austausch des 2. Chromosoms (1. Zeile) und die Primo-2 Mutation nach den Austausch des 2. Chromosoms (2. Zeile) mit dem Wildtyp, ob die Mutation homozygot war, was für eine Art von Mutation in der *primo-2*-Mutante vorlag und das Phosphorylierungsniveau (in Prozent) dieser Mutanten an den Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 im Vergleich zum jeweiligem Wildtypniveau in Hellen vor die Stelle T849 und T864 und im Dunkeln für die Stelle S936. Dies wurde bei Fliegen, die mind. 16 h im Dunkeln und anschließend 1h belichtet wurden (hell), und bei Fliegen, die mind. 16 h belichtet wurden und dann 1 h im Dunkel gehalten wurden (dunkel), durchgeführt. In Rot markiert sind die Phosphorylierungsniveaus mit weniger/gleich 50 % oder über/gleich 200 % des Phosphorylierungsniveaus des Wildtyps.

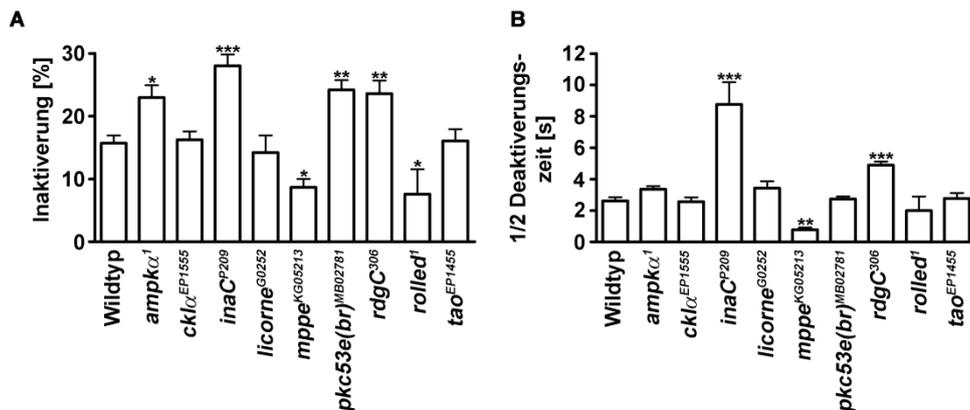
#### 6.1.4.4 Auswertung der Elektretinogramme der identifizierten Kinase- und Phosphatase-Mutanten des TRP-Kanals

Zur genaueren Charakterisierung der elektrophysiologischen Phänotypen der Kinase- und Phosphatasemutanten wurden die aufgenommenen Elektretinogramme ausgewertet. Zur Bestimmung der halben Deaktivierungszeit wurden andere Aufnahmen als die gezeigten OBBOO-Messungen verwendet, in denen der Lichtreiz nur 500 ms lang war, damit es zu keiner beeinflussenden Inaktivierung kommen kann.

Bei den Mutanten der Kinasen AMPK $\alpha$ , ePKC, PKC53E(br) und der Phosphatase RDGC zeigte sich, dass die Fliegen deutlich stärker inaktivieren, d.h. das Rezeptorpotential geht während einer fünf Sekunden andauernden Belichtung mit orangenem Licht deutlich stärker in Richtung Baseline zurück als beim Wildtyp. Dahingegen ist bei den Mutanten der Kinasen Rolled und der Phosphatase Mppe eine schwächere Inaktivierung nachgewiesen worden (Abb.6.6 A), d.h. das ERG-Signal geht weniger stark zurück als bei einer wildtypischen

## Ergebnisse

Fliege. Wie in der Abbildung 6.6B zu sehen ist, zeigten einige der Kinase- bzw. Phosphatasemutanten auch eine Veränderung der halben Deaktivierungszeit im Vergleich zum Wildtyp. Die Deaktivierungszeit eines ERGs ist die Zeit, die das ERG-Signal benötigt, um nach Beendigung des Lichtreizes wieder auf das Baseliniveau zurückzukehren. Die *inaC*-Mutante zeigte, wie auch schon in anderen Arbeiten beschrieben (Pak, 1979), eine drastisch verlängerte halbe Deaktivierungszeit. Interessanterweise zeigt auch die *rdgC*-Mutante einen, wenn auch nicht ganz so starken, Deaktivierungsdefekt wie der der *inaC*-Mutante. Die halbe Deaktivierungszeit in der *mppe*-Mutante war dagegen stark verkürzt, d.h. das ERG-Signal ging deutlich schneller wieder auf die Baseline zurück.



**Abbildung 6.6: Auswertung der Elektoretinogramme** der mutanten Fliegen, die eine signifikante Erhöhung oder Verringerung des Phosphorylierungsniveaus am TRP-Kanal zeigten. **A:** Zeigt die relative Inaktivierung der Mutanten und des Wildtyps während andauernder Belichtung von fünf Sekunden, d.h. die prozentuale Abnahme des Signals während der Orangelichtung (n = 3;  $\pm$  Standardfehler; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001). **B:** Zeigt die halbe Deaktivierungszeit der Mutanten und des Wildtyps. Die halbe Deaktivierungszeit ist die Zeit, die das ERG-Signal benötigt, um nach Beendigung eines 500 ms andauernden Orangelichtpulses sich wieder auf das halbe Niveau der maximalen Amplitude zu erholen (n = 3;  $\pm$  Standardfehler; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

### 6.1.5 Zusammenfassung der Screen Ergebnisse

Nach eingehender Prüfung der durch den Screen identifizierten Kinase- und Phosphatase-Mutanten, die eine signifikante Änderung des Phosphorylierungsniveaus an einer der Phosphorylierungsstellen (T849, T864 oder S936) des TRP-Kanals im Vergleich zum Wildtyp gezeigt hatten, die durch Bestimmung der TRP-Lokalisation mittels Immunzytochemie, die Aufnahme von ERGs zur Überprüfung der physiologischen Aktivität und durch den Test auf ePKC-Expression zeigten, kann zusammenfassend gesagt werden, dass neun Proteine gefunden wurden, die entweder eine direkte oder eine indirekte Änderung im Phosphorylierungsniveau der untersuchten TRP-Stellen hervorrufen. Dabei handelt es sich um die Kinasen ePKC, PKC53E, Rolled und AMPK $\alpha$  für die Phosphorylierungsstellen T849, die Kinasen Ckl $\alpha$ , Licorne und Tao-1, sowie die Phosphatase Mppe für die Phosphorylierungsstelle T864 und die Phosphatase RDGC für die Phosphorylierungsstellen S936.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird ein genauerer Blick auf die Phosphorylierungsstellen T849 geworfen, genauer gesagt auf die beiden identifizierten PKCs, der ePKC und der PKC53E(br). Außerdem wird auch die Phosphorylierungsstelle S936, bei der die Phosphatase RDGC identifiziert werden konnte, näher beleuchtet.

### **6.2 Die Kinasen für die Phosphorylierungsstelle T849**

Der Screen nach Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals brachte vier Kinase-Kandidaten für das vornehmlich im Hellen phosphorylierte Threonin an der Position 849 zu Tage, wobei die Mutanten für die Kinasen ePKC und PKC53E(br) eine deutlich verringerte Phosphorylierung dieser Stelle aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Mutanten für AMPK $\alpha$  und Rolled ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhtes Phosphorylierungsniveau. Da es sich bei einem gesteigerten Phosphorylierungsniveau, verursacht durch das Fehlen einer Kinase, nur um einen indirekten Effekt handeln kann und somit TRP offenbar kein direktes Substrat der Kinasen AMPK $\alpha$  und Rolled zu sein scheint, wird das Augenmerk für die Phosphorylierungsstelle T849 in diese Arbeit nur auf die beiden Kinasen ePKC und PKC53E(br) gelegt, da diese beiden unmittelbar an der Phosphorylierung von TRP-T849 beteiligt sein könnten.

#### **6.2.1 PKC53E(br) als alternative Kinase für die Phosphorylierungsstelle T849**

Wie *in vitro*-Experimente schon gezeigt haben (Huber et al., 1998), kann die ePKC den TRP-Kanal direkt phosphorylieren. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass diese Phosphorylierung auch *in vivo* beobachtet werden kann, da die Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T849 bei einer ePKC-Mutante deutlich abgeschwächt ist (Abb. 6.2a). Es kommt aber immer noch zu einer lichtabhängigen Phosphorylierung, was darauf schließen lässt, dass es mindestens eine weitere Kinase geben muss, die diese Stelle lichtabhängig phosphoryliert. Da der Screen nach Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals noch eine weitere Kinase zu Tage geführt hat, die das Phosphorylierungsniveau an dieser Stelle beeinflusst, liegt der Schluss nahe, dass es diese Kinase ist, die die Restphosphorylierung bewerkstelligt. Bei dieser Kinase handelt es sich um die PKC53E(br).

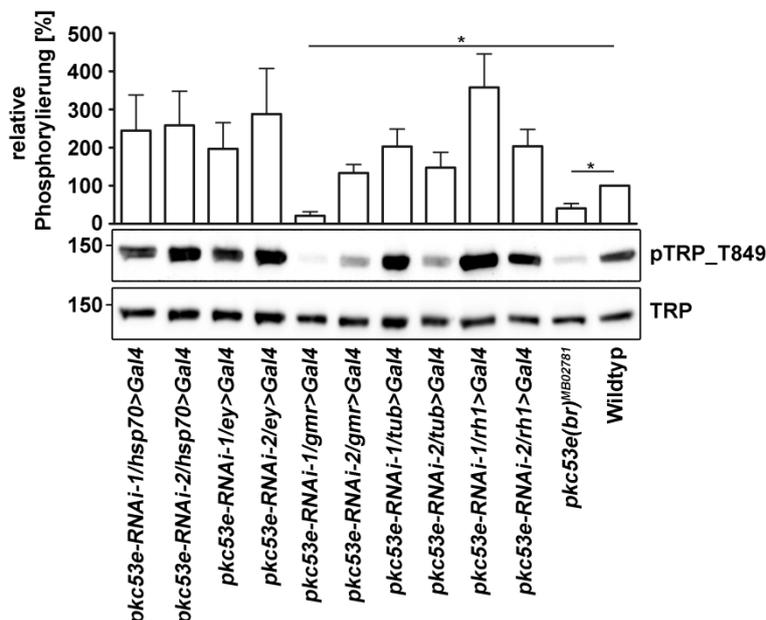
#### **6.2.2 Gal4-Treiberstamm- und PKC53E(br)-RNAi-Test**

Es ist nun leider sehr schwer möglich eine Mutante herzustellen, die die Mutation beider PKCs, der ePKC und der PKC53E(br) beherbergt. Das liegt daran, dass die beiden Gene nur 25k Basenpaare weit auseinanderliegenden und somit nur mit einer Wahrscheinlichkeit von unter einem Prozent rekombinieren (1% Rekombinationswahrscheinlichkeit entspricht bei *Drosophila melanogaster* etwa 400k bp, siehe Molekulare Zellbiologie 2. Auflage). Daher

## Ergebnisse

wurde sich dafür entschieden, eine Fliege herzustellen, die eine *inaC<sup>P209</sup>*-Mutation trägt und bei der die PKC53E(br) mittels RNAi herunterreguliert ist.

Um festzustellen, welcher der beiden verfügbaren *pkc53e*-RNAi-Stämme und welcher Promotor für die Gal4-Expression am besten geeignet ist, wurden Westernblotanalysen durchgeführt, innerhalb derer die beiden zur Verfügung stehenden RNAi-Stämme mit unterschiedlichen Gal4-Promotorfliegen verkreuzt und das Phosphorylierungsniveau an der Stelle T849 mit dem der PKC53E(br)- $\beta$ Mutante und dem Wildtyp verglichen wurden. Es wurden folgende Promotoren für eine Gal4 Expression getestet: der *heat shock*-Promotor (*hsp70*), der zu einer Gal4-Expression in der gesamten Fliege führen würde, jedoch nur nachdem ein heat shock bei 37°C durchgeführt wurde, der *eyeless* Promotor (*ey*), bei dem das Gal4 ausschließlich im Auge exprimiert wird, ebenso wie bei dem *gmr* (Glass Multimer Reporter) Promotor, bei dem es zu einer Gal4-Expression ebenfalls hauptsächlich im Auge kommt, die aber deutlich früher in der Entwicklung startet als bei dem *eyeless* Promotor. Des Weiteren wurde der *Rhodopsin1*-Promotor (*rh1*) getestet, der zu einer exklusiven Expression in den Photorezeptorzellen R1-6 führt, sowie der Promotor von Tubulin (*tub*), der zu einer ubiquitären Expression von Gal4 führt.



**Abbildung 6.7: Gal-4 Treiberstamm- und RNAi-Test.** Gezeigt ist die durchschnittliche Phosphorylierung aller getesteten Fliegen in Prozent (links angegeben) an der Phosphorylierungsstelle T849 ( $\pm$  Standardfehler). Die Westernblots zeigen jeweils das Signal des  $\alpha$ -pT849-AKs (oberer Westernblot) und des panspezifischen TRP-AK (unterer Westernblot). Auf der linken Seite ist das Molekulargewicht (in kDa) angegeben. Die Fliegen der angegebenen Genotypen wurden mind. 16 h dunkeladaptiert und anschließend 1 h belichtet ( $n = 3$ ; \*:  $p > 0,05$ ).

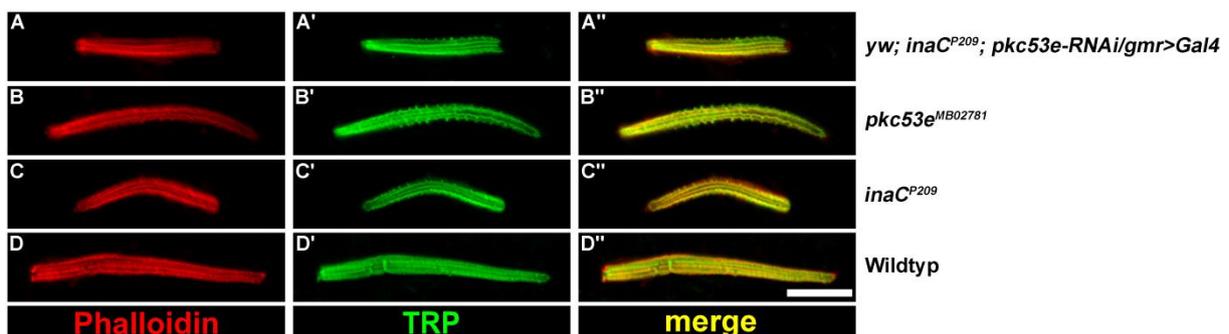
Diese Gal4-Promotorstämme wurden mit den beiden verfügbaren RNAi-Stämmen verkreuzt und die F1-Generation wurde dann zur Untersuchung der TRP Phosphorylierung an der Stelle T849 verwendet. Die Fliegen der F1-Generation wurden wie für den Kinase- und Phosphatase-Screen beschrieben behandelt. Es wurden aber nur Extrakte aus den Köpfen

belichteter Fliegen hergestellt, da die zu untersuchende Veränderung nur in belichteten Fliegen erwartet wurde. Es kam nur bei einer RNAi-Gal4-Promotor-Kombination, nachdem drei Replikate getestet wurden, zur gewünschten signifikanten Verringerung des Phosphorylierungsniveaus, vergleichbar mit dem der *pkc53e*-Mutante. Diese Verringerung zeigte sich bei der Kreuzungen mit dem *gmr*-Treiberstamm und der *pkc53e*-RNAi-1 (Abb. 6.7). Alle anderen Kombinationen führten zu keinen signifikanten Änderungen im Phosphorylierungsniveau im Vergleich zum Wildtyp.

Mit diesem RNAi-Stamm und dem *gmr>Gal4* Treiberstamm, der über *vermillion* markiert ist und somit immer roter Augen generiert, wurde dann die Fliege ohne PKC und mittels RNAi herunterreguliertem PKC53E(br) zusammengekreuzt.

### 6.2.3 Untersuchung der TRP-Phosphorylierung einer *inaC;pkc53e*-RNAi-Fliege

Zur Herstellung einer Fliege ohne ePKC und mit mittels RNAi herunter regulierter PKC53E(br) wurde eine Mutante mit dem Genotyp *yw; inaC<sup>P209</sup>; pkc53e-RNAi/gmr>Gal4* hergestellt (siehe 5.5.3.5 A bis D), die im Folgenden als PKC-Doppelnulmutante bezeichnet wird. Um zu überprüfen, ob die übermäßige Gal4-Expression einen Einfluss auf die Lokalisation des TRP-Kanals hatte, wurden isolierte Ommatidien präpariert und mit dem  $\alpha$ -TRP-Antikörper (Abb. 6.8A'-D' in Grün) und einem mit Alexa Fluor 546-gekoppeltem Phalloidin (Abb. 6.8A'-D' in Rot) inkubiert, um die Lokalisation der Rhabdomere sichtbar zu machen. Wie beim Wildtyp (Abb. 6.8D''), der Einzelmutante für die ePKC (Abb. 6.8C'') und für PKC53E(br) (Abb. 6.8B'') zeigte auch die PKC-Doppelnulmutante (Abb. 6.8A'') eine Kolo-kalisation des TRPs mit dem Rhabdomer.

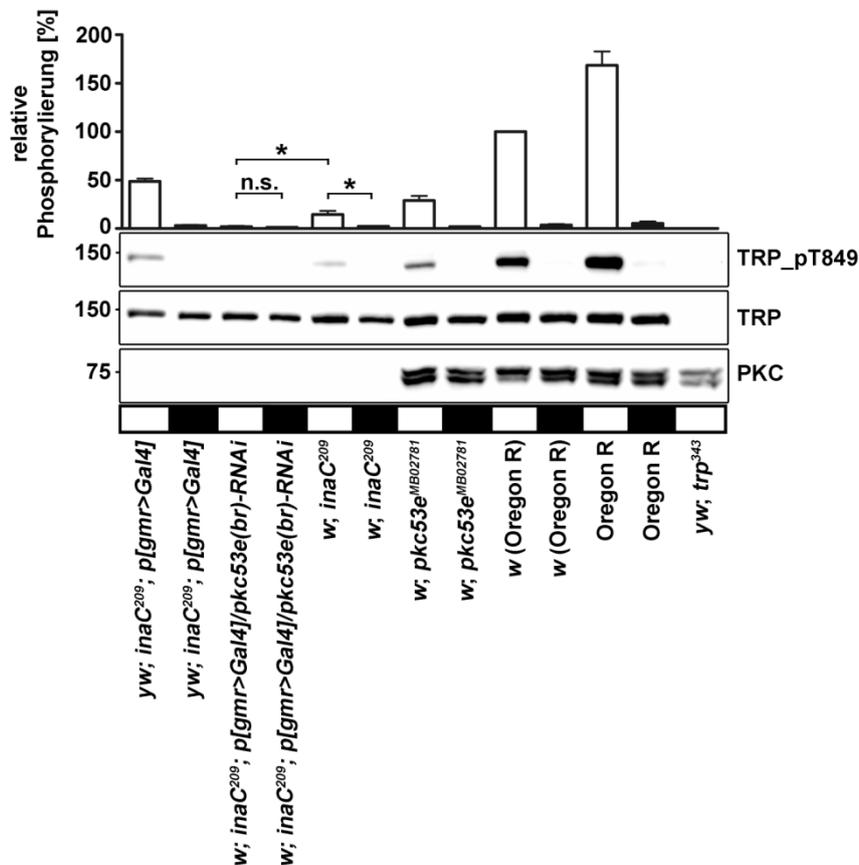


**Abbildung 6.8 TRP-Lokalisation** in einzelnen Ommatidien der PKC-Mutanten und im Wildtyp **A-D**: Fluoreszenz-Signal der Rhabdomere durch ein mit Alexa Fluor 546-gekoppeltem Phalloidin (in rot). **A'-D'**: Der TRP-Kanal wurde durch den panspezifischen TRP-AK markiert, der von einem Cy5 gekoppelten sekundären AK detektiert wurde (in grün). **A''-D''**: Überlagerung des Phalloidinsignals mit dem TRP-Signal in Gelb. Der Größenmarker (weißer Balken in K'') entspricht 20  $\mu$ m.

Anschließend wurde das Phosphorylierungsniveau der PKC-Doppelnulmutante ermittelt. Da die PKC-Doppelnulmutante wegen der Insertion des P-Elementvektors *p[gmr>Gal4]*, der durch *vermillion* markiert ist, rote Augen hat, wurde neben der Wildtypkontrolle mit weißen

## Ergebnisse

Augen auch noch eine Wildtypfliege mit roten Augen mitgeführt. Zusätzlich wurden auch eine weißäugige und eine rotäugige *inaC*-Mutante als Kontrollen verwendet. Aus diesen Fliegen wurden, wie für den Kinase- und Phosphatase-Screen beschrieben, Extrakte hergestellt und mittels des  $\alpha$ -T849-AKs dreimal untersucht. Das mit dem panspezifischen  $\alpha$ -TRP-Antikörper erhaltene Signal wurde als Ladekontrolle zur Normalisierung verwendet. Zur Überprüfung, ob die verwendeten *inaC*-Mutanten und die PKC-Doppelnullmutante auch wirklich kein ePKC mehr exprimieren, wurde eine mögliche ePKC-Expression mit einem  $\alpha$ -ePKC-Antikörper-Nachweis widerlegt.



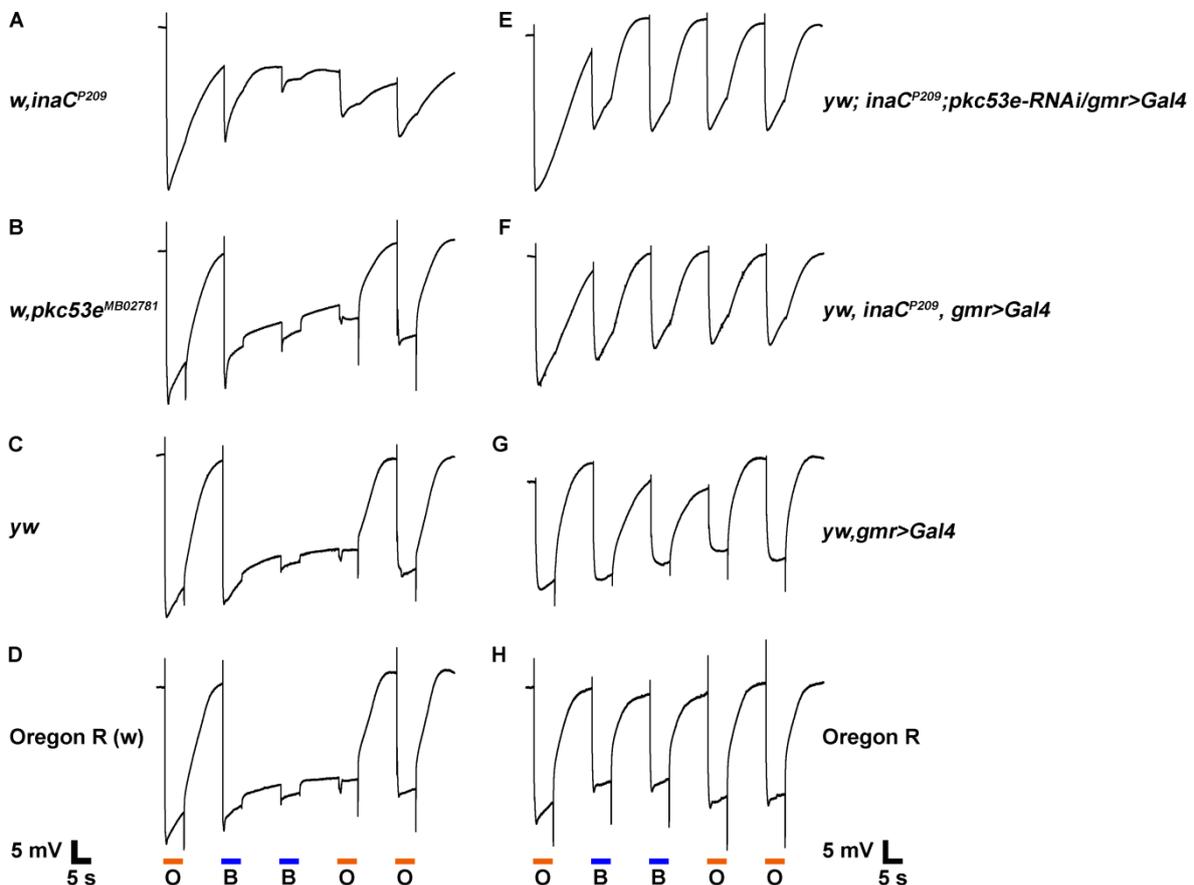
**Abbildung 6.9 Westernblotanalyse der PKC-Doppelnullmutante:** Das Balkendiagramm zeigt die quantitative Auswertung der Phosphorylierung von TRP\_T849 in der PKC-Doppelnullmutante und in Kontrollen ( $\pm$  Standardfehler,  $n = 3$ ; \*:  $p < 0,05$ ). Das phosphospezifische Signal wurde durch den phosphospezifischen AK, der die Phosphorylierungsstelle T849 detektiert (oberer Westernblot), generiert, das TRP-Signal durch den panspezifischen TRP-AK (mittlerer Westernblot) und das PKC Signal durch einen PKC-AK (unterer Westernblot). Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten *inaC*-Mutanten keine ePKC mehr exprimierten (Abb. 6.9 unterer Westernblot) und somit, wie beabsichtigt, die *inaC*<sup>P209</sup>-Mutation tragen. Die Westernblotanalyse des phosphospezifischen Signals für die Stelle T849 zeigte (Abb. 6.9 oberer Westernblot), dass die PKC-Doppelnullmutante keine lichtabhängige Phosphorylierung mehr generiert und dass diese Phosphorylierung auch deutlich geringer ausfällt als bei der einfachen *inaC*<sup>P209</sup>-Mutation. Es kann also gesagt werden, dass ausschließlich die beiden Kinasen PKC53E(br) und ePKC zusammen den TRP-Kanal an der

Stelle T849 phosphorylieren, da es zu keiner lichtabhängigen Phosphorylierung mehr kommt, wenn beide Kinasen fehlen.

### 6.2.4 Elektoretinographische Untersuchung der PKC-Doppelnullmutante

Da festgestellt wurde, dass die PKC-Doppelnullmutante keine lichtabhängige Phosphorylierung mehr an der Phosphorylierungsstelle T849 zeigt, stellte sich die Frage, ob sich dieses Ergebnis in einem elektrophysiologischen Phänotyp manifestiert, da ja schon die normale PKC-Nullmutante einen drastischen ERG-Phänotyp zeigt (Abb. 6.10A). Zur Klärung dieser Fragestellung wurden OBBOO-Messungen dieser Mutanten, wie schon in Abschnitt 6.1.4.2 beschrieben, durchgeführt (Abb. 6.10E).

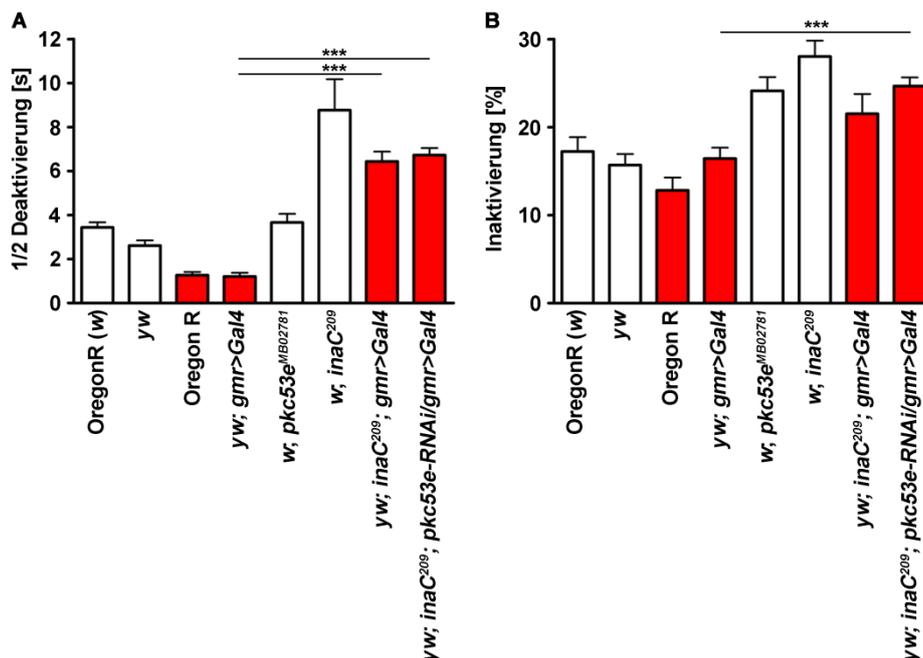


**Abbildung 6.10 Elektoretinogramme der PKC-Doppelnullmutante** und ihrer Kontrollen (rechts und links angegeben). Es wurden OBBOO-Messungen zur Identifizierung eventueller Veränderungen im ERG durch die Mutation der beiden PKCs (E) und den Kontrollen einer weißäugigen *inaC*-Mutante (A), der PKC53E(br)-Mutante (B), der Wildtypen *yw* (C) und *white* (D), einer rotäugigen *inaC*-Mutante (F) und der rotäugigen *gmr>Gal4* Treiberstamm Mutante (G) durchgeführt. H: Zeigt ein typisches wildtypisches ERG einer OBBOO-Messung von einer rotäugigen *Drosophila melanogaster*. Die farbigen Boxen unter dem ERG stehen für einen fünf Sekunden andauernden Lichtpuls der jeweiligen Farbe. Alle OBBOO-Messungen wurden gleich durchgeführt.

Als Kontrollen wurden rot- (Abb. 6.10F) und weißäugige (Abb. 6.10A) *inaC*<sup>P209</sup>-Mutanten, die PKC53E(br)-Mutante (Abb. 6.10B), weißäugigen Wildtypen *yw* (Abb. 6.10C) und *white* (Abb. 6.10B), die rotäugige *gmr>Gal4* Mutante (Abb. 6.10G) und der rotäugige Wildtyp Oregon R

## Ergebnisse

(Abb. 6.10H), gemessen. Auf den ersten Blick sieht man keinen Unterschied zwischen den rotäugigen *inaC*-Mutanten und der ebenfalls rotäugigen PKC-Doppelnullmutante. Im Gegensatz zu dem offensichtlichen Unterschied zwischen weißäugigen (Abb. 6.10 A-D) und rotäugigen (Abb. 6.10 E-H) Fliegen, von denen die letztgenannten kein PDA ausbildeten. Nach der Quantifizierung und statistischen Auswertung der ERGs (Abb. 6.11) sieht man noch weitere Unterschiede zwischen den rotäugigen (rote Balken in der Abb. 6.11) und den weißäugigen (weiße Balken in der Abb. 6.11) Fliegen. Die Kontrollen in der Abbildung 6.11 zeigen, dass rotäugige Fliegen weniger lang für die Deaktivierung des ERG-Signals brauchen als die weißäugigen Fliegen (A) und außerdem eine schwächere Inaktivierung aufweisen (B). So ist es nicht verwunderlich, dass die rotäugige PKC-Doppelnullmutante (E) eine langsamere halbe Deaktivierungszeit zeigte als die weißäugige *inaC*-Mutante (A). Es kommt aber zu dem erwarteten De- und Inaktivierungsdefekt, wenn man die jeweils weiß- oder rotäugigen Wildtypen mit der jeweiligen gleichfarbigen ePKC-Mutante vergleicht. Der Vergleich der rotäugigen ePKC-Mutante mit der ebenfalls rotäugigen PKC-Doppelnullmutante zeigt aber, dass das vollständige Fehlen der Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T849 keinen Unterschied im ERG generiert, im Vergleich zur stark verringerten, aber immer noch vorhandenen, Phosphorylierung in der ePKC-Mutante.



**Abbildung 6.11: Auswertung der Elektretinogramme der PKC-Doppelnullmutante und ihrer Kontrollen** (unten angegeben). Weiße Balken stehen für Fliegen mit weißen Augen, während rote Balken für Fliegen mit roten Augen stehen. **A:** Halbe Deaktivierungszeit in Sekunden; das ist die Zeit, die das ERG benötigt, um nach dem Ausschalten des 500 ms andauernden orangenen Lichtpulses wieder auf das halbe Niveau zurückzukehren. (n = 9; ± Standardfehler; \*\*\*: p < 0,001). **B** Relative Inaktivierung in Prozent: der Prozentsatz, um den sich das Signal während des fünfsekündigen Orangelichtstimulus abschwächt (n = 9; ± Standardfehler; \*\*\*: p < 0,001).

Zur genaueren Untersuchung des Deaktivierungsdefekts der ePKC-Mutanten wurden Messungen durchgeführt, bei denen ein nur 500 ms andauernder orangener Reizlichtpuls

gegeben wurde. Aus diesen Messungen wurde dann die halbe Deaktivierungszeit bestimmt. Es stellte sich heraus, dass sich die beobachteten Phänomene aus den OBBOO-Messungen (Abb. 6.10) auch statistisch niederschlagen. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen weißäugigen und rotäugigen *Drosophila melanogaster* Mutanten (gezeigt in Abb. 6.11 weiße und rote Balken). Die rotäugigen Fliegen zeigten eine deutlich kürzere halbe Deaktivierungszeit als die weißäugigen Fliegen mit dem ansonsten identischen Genotyp. Wie schon zuvor in Abb. 6.10A zu erkennen war, zeigt sich jetzt auch statistisch, dass es keinen Unterschied in der halben Deaktivierungszeit zwischen der einfachen PKC-Nullmutante und der PKC-Doppelnullmutante gibt. Die Augenfarbe der Mutanten zeigt keinen Einfluss auf die Inaktivierung. Die rotäugigen Mutanten mit ePKC zeigen genau wie die weißäugigen Fliegen mit ePKC eine schwächere Inaktivierung im Vergleich zu den jeweiligen Mutanten ohne ePKC oder ohne ePKC und PKC53E(br). Die ePKC-Nullmutante und PKC-Doppelnullmutante zeigen auch untereinander keine unterschiedliche Inaktivierung (Abb. 6.12B). Das bedeutet, dass das zusätzliche Fehlen der PKC53E(br) keinen zusätzlichen physiologischen Effekt auf das Fliegenauge zu haben scheint.

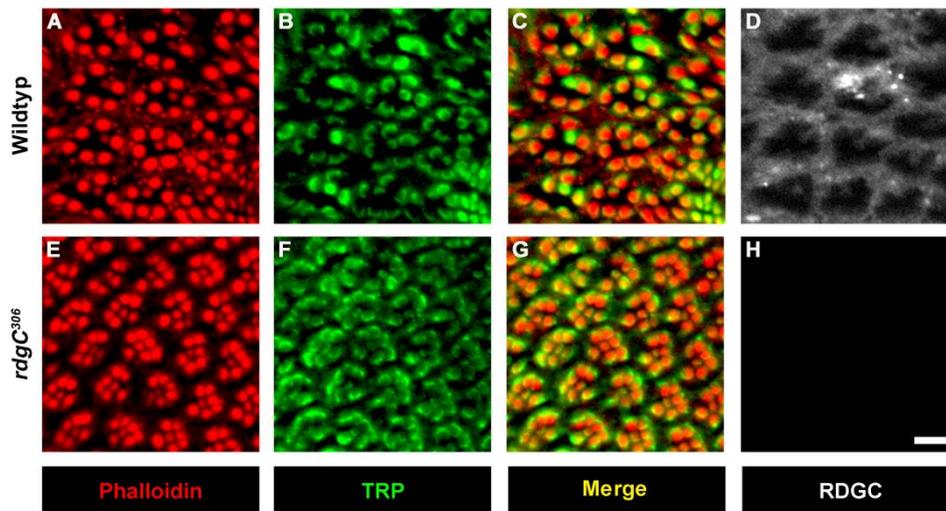
### 6.3 Untersuchung der Phosphorylierungsstelle S936

Der Screen nach Kinasen und Phosphatasen für den TRP-Kanal legte eine Beteiligung der Phosphatase RDGC an der Dephosphorylierung der Stelle S936 nahe. Von RDGC ist bereits bekannt, dass sie Rhodopsin 1 dephosphoryliert (Steele and O'Tousa, 1990). Es stellt sich daher die Frage nach der Spezifität der Phosphatase RDGC im Auge von *Drosophila*. Außerdem ist für die *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante bekannt, dass die Photorezeptoren degenerieren (Steele and O'Tousa, 1990). Es war daher zu klären, ob der Phosphorylierungsphänotyp auf andere Defekte und nicht auf eine direkte enzymatische Rolle von RDGC bei der TRP-Dephosphorylierung zurückgeführt werden kann.

#### 6.3.1 Lokalisation von TRP und RDGC in der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante

Zuerst wurden die TRP- und die RDGC-Lokalisation in der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante im Vergleich zum Wildtyp genauer untersucht, um sicher zu stellen, dass sowohl TRP als auch RDGC in den richtigen Kompartimenten lokalisiert sind, was beim TRP hauptsächlich das Rhabdomer (Niemeyer et al., 1996) und beim RDGC überwiegend das Zytosol ist. Um die Lokalisation genauer zu überprüfen, wurden von Wildtyp-Fliegen und *rdgC*<sup>306</sup>-Mutanten Gefrierschnitte mit einem Kryotom angefertigt (siehe 5.5.2), da mit dieser Methode präziser gezeigt werden kann, wo genau die zu untersuchenden Komponenten lokalisiert sind. Die verwendeten *rdgC*<sup>306</sup>-Mutanten waren dabei nicht älter als ein Tag, da sie mit zunehmendem Alter eine fortschreitende Degeneration der Retina zeigen (Steele and O'Tousa, 1990).

## Ergebnisse



**Abbildung 6.12 TRP- und RDGC-Lokalisation in Wildtypen und der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante:** Gezeigt sind Querschnitte durch das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* des links angegebenen Genotypen. **A** und **E**: Fluoreszenzsignal der Rhabdomere durch ein mit Alexa Fluor 546-gekoppeltem Phalloidin AK (rot). **B** und **F**: Der TRP-Kanal wurde durch den panspezifischen TRP-AK markiert, der von einem Alexa Fluor 488 gekoppelten sekundären AK detektiert wurde (grün). In **C** und **G** ist die Überlagerung dieser beiden Signale zu erkennen (gelb). **D** und **H**: RDGC wurde durch einen RDGC-AK markiert, der von einem Alexa Fluor 680 gekoppelten sekundären AK detektiert wurde (weiß). Der Größenmarker in **H** entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Die Schnitte wurden zuerst mit dem panspezifischen  $\alpha$ -TRP-AK und anschließend mit einem sekundären Alexa Fluor 488 gekoppelten sekundären AK inkubiert, um die TRP-Lokalisation zu visualisieren (Abb. 6.12 B und F). Zur Visualisierung der Rhabdomere wurden die Schnitte mit dem Pilzgift Phalloidin, an das ein Alexa Fluor 546 gekoppelt ist und das F-Aktin der Rhabdomere erkennt, inkubiert (Abb. 6.12 A und E). Zusätzlich wurde die Lokalisation des RDGCs mit Hilfe eines RDGC-AKs und eines sekundären AKs mit gekoppelten Alexa Fluor 680 (Abb. 6.12 D und H) bestimmt. Das Überlagerungsbild des Phalloidinsignals und des TRP-Signals zeigt in der Abbildung 6.12 in Gelb die Kolo-kalisation von TRP mit dem Rhabdomer und zeigt somit die korrekte Lokalisation des TRP-Kanals im Wildtyp (C) und der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante (G). Das RDGC ist im Zytosol lokalisiert, wie in der Abbildung 6.13D zu erkennen ist, und es ist außerdem sichergestellt, dass der RDGC-AK nur RDGC erkennt und er kein Signal in der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante generiert (Abb. 6.12 H).

### 6.3.2 Untersuchung der Phosphorylierungsniveaus verschiedener RDGC-Mutanten

Um zu klären, ob zwischen den Phosphorylierungsniveaus der drei Stellen T849, T864 und S936 und der in den Photorezeptoren vorhandenen Menge an RDGC ein quantitativer Zusammenhang besteht, wurden Fliegen mit verschiedenen RDGC-Expressionsleveln untersucht. Hierzu wurde eine heterozygote *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante geprüft, um zu klären, ob die Phosphataseaktivität einem Dosis-Effekt unterliegt. Darüber hinaus wurde eine transgene Fliege untersucht, bei der RDGC mit dem Promotor für Rhodopsin 1 überexprimiert wurde (Dissertation Schillo, 2007). Zusätzlich wurden ein bis fünf Tage alte *rdgC*<sup>306</sup>-Mutanten, die

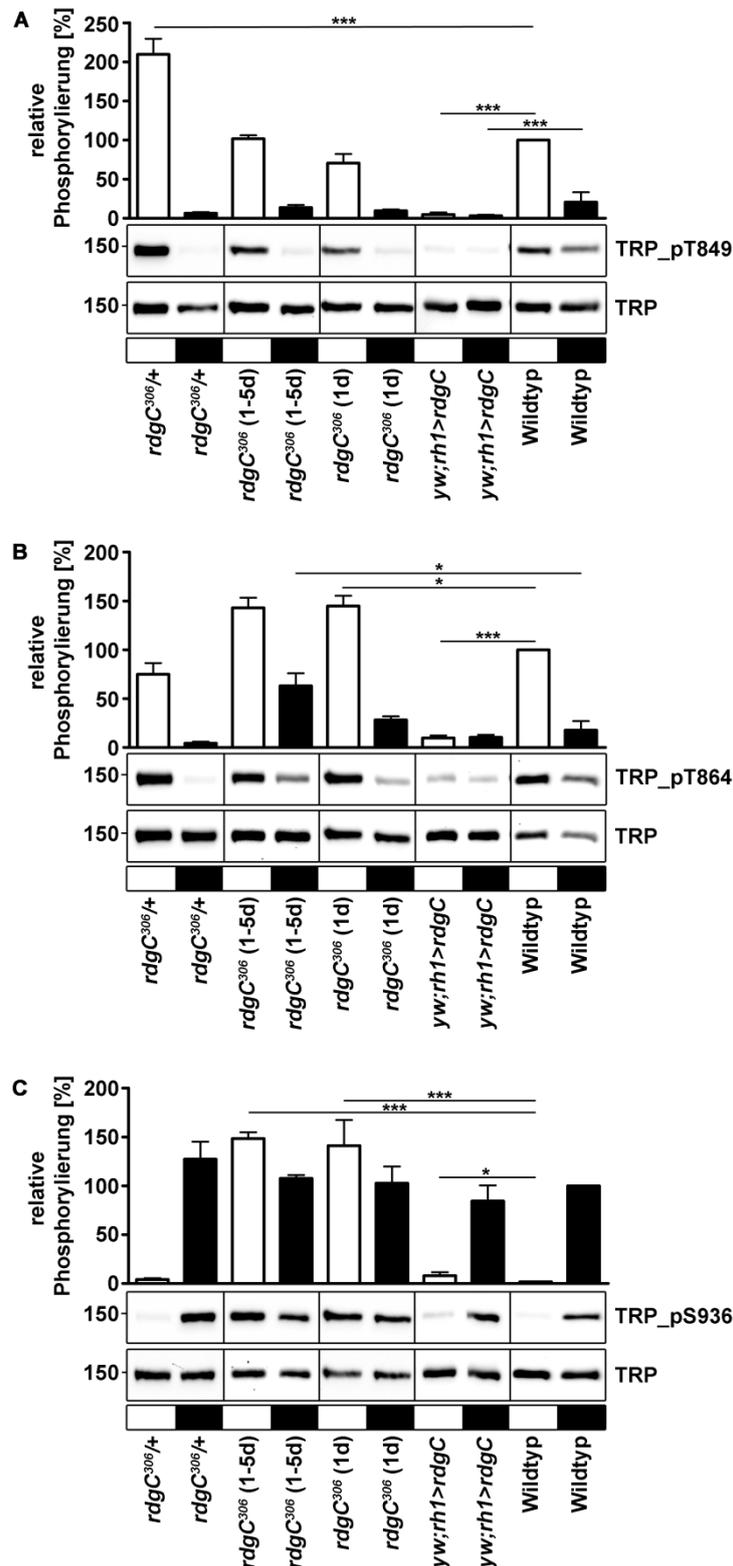
## Ergebnisse

den Belichtungsbedingungen ausgesetzt waren, die für alle Mutanten des Screen galten, und einen Tag alte *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten, die im Dunkeln aufgezogen wurden, verwendet. Dadurch sollte der Einfluss einer etwaigen Retinadegeneration in den belichteten Mutanten auf der TRP-Phosphorylierung untersucht werden. Die Extrakterstellung wurde genauso wie für den Screen schon beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme des Dunkelextraktes aus den *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten, die nur einen Tag alt waren. Diese wurden nicht, wie für den Screen beschrieben, mind. 16 Stunden belichtet, sondern durchgehend im Dunkeln gehalten bis einschließlich zur Extrakterstellung, die ebenfalls im Dunkeln stattfand. Die so hergestellten Extrakte wurden, genauso wie für den Screen beschrieben, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit den Antikörpern, die auch im Screen benutzt wurden, inkubiert.

Diese Westernblotanalyse ergab, dass es keinen Unterschied im Phosphorylierungsniveau zwischen den unbelichteten ein Tage alten und den 1-5 Tage alten RDGC-Mutanten gibt, egal welche Phosphorylierungsstelle (T849, T864 oder S936) man sich angeschaut hatte (Abb. 6.13 A-C). Daraus ergibt sich dann, dass die ein bis fünf Tage alten *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten entweder unter diesen Bedingungen nicht degenerieren oder deren Degeneration keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des TRP-Kanals hat. Die RDGC-Nullmutanten zeigten den bereits im Screen entdeckten Phänotyp an der Phosphorylierungsstelle S936, nämlich dass die belichteten Mutanten, egal ob sie belichtet oder nicht belichtet wurden, nicht mehr dephosphoryliert werden konnten (Abb. 6.13C). Es stellte sich sogar heraus, dass die Phosphorylierung im Hellen sogar etwas stärker ist als die Phosphorylierung im Dunkeln. Zusätzlich dazu zeigten die einen Tag alten homozygoten *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten neben dem schon genannten Phänotyp, auch noch ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau an der Stelle T864 auf 141 %  $\pm$ 13 (Abb. 6.13B). Die heterozygoten *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten (RDGC/+) zeigten hingegen keine Hyperphosphorylierung der Stelle S936 im Licht. Bei ihnen kommt es jedoch an der Stelle T849 zu einer signifikanten Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus auf 210%  $\pm$ 20 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.13A). An der Phosphorylierungsstelle T864 kam es zu einer Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus im Dunkeln auf 68 %  $\pm$ 22, obwohl diese Phosphorylierungsstelle normalerweise nur im Hellen phosphoryliert wird und es eigentlich bei dunkeladaptierten Fliegen nur zu einem Phosphorylierungsniveau von 17 %  $\pm$ 9 an dieser Stelle kommt (Abb. 6.13B).

Die stärkste Veränderung zeigt jedoch die transgene Fliege, in der RDGC mit Hilfe des Rhodopsin 1-Promotors überexprimiert wurde. Diese Überexpression führte bei den beiden vorwiegend im Hellen phosphorylierten Stellen T849 und T864 dazu, dass es zu keiner lichtabhängigen Phosphorylierung mehr an diesen beiden Stellen kam (Abb. 6.13 A+B). Die vorwiegend im Dunkeln phosphorylierte Stelle S936 zeigte eine leichte, aber signifikante Erhöhung der Phosphorylierung bei hell adaptierten Fliegen (Abb. 6.13C).

## Ergebnisse

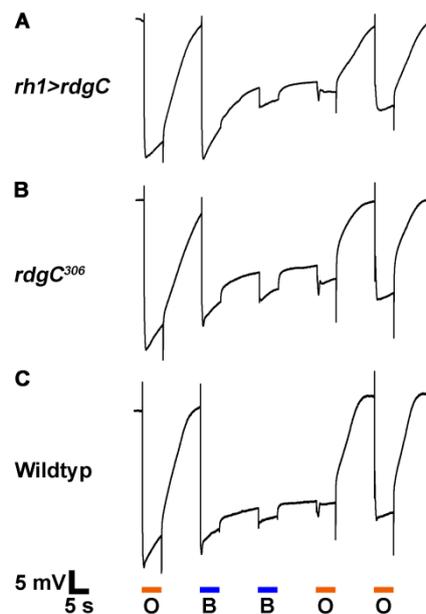


**Abbildung 6.13 Westernblotanalyse von Fliegen mit unterschiedlichen RDGC-Leveln:** Gezeigt ist die Westernblotanalyse von homozygoten ein bis fünf Tage alter *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten, homozygoter einen Tag alter *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten, heterozygoter *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten und Fliegen, die das RDGC überexprimieren. Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung der RDGC-Westernblots im Vergleich zum Wildtyp. Die oberen Westernblots zeigen die jeweiligen phosphospezifischen TRP-AKs für die Stellen T849 in **A**, T864 in **B** und S936 in **C** ( $n = 3$ ;  $\pm$  Standardfehler; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Die unteren Westernblots zeigen das Signal des panspezifischen TRP-AKs. Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben. Die weißen Balken stehen für Fliegen, die mind. 16 h im Dunkeln waren und anschließend 1 h belichtet wurden. Die schwarzen Balken hingegen stehen für Fliegen, die mind. 16 h belichtet wurden und anschließend 1 h im Dunkeln gehalten wurden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das Alter und die Haltungsbedingungen der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutanten keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsniveau des TRP-Kanals haben. Es konnte zusätzlich dazu gezeigt werden, dass aber die RDGC-Menge im Photorezeptor durchaus einen Effekt auf das Phosphorylierungsniveau des TRP-Kanal an den getesteten Phosphorylierungsstellen hat.

### 6.3.3 Elektrophysiologische Untersuchung der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante

Als Nächstes wurde die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante elektrophysiologisch charakterisiert, da bereits bekannt ist, dass der Ausfall von Proteinen, die an der Signaltransduktion in *Drosophila melanogaster* beteiligt sind, zu verschiedenen Phänotypen führt, die mittels ERG-Messung sichtbar gemacht werden können (Pak et al., 1969). Für die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante ist auch schon bekannt, dass sie eine verlängerte Deaktivierungszeit zeigt (Steele and O'Tousa, 1990). Interessant ist jetzt, ob sie noch weitere Phänotypen generiert und was eine Überexpression von RDGC im Auge von *Drosophila* elektrophysiologisch bewirkt.



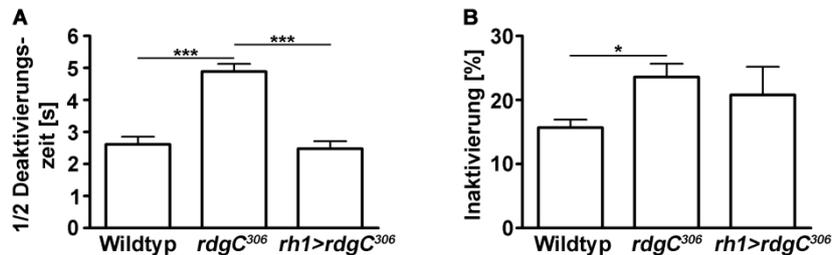
**Abbildung 6.14: Elektoretinogramme der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante, einer transgenen Fliege, die RDGC überexprimiert und dem Wildtyp.** Es wurden OBBOO-Messungen zur Identifizierung eventueller Veränderungen im ERG durchgeführt. **A:** ERG einer OBBOO-Messung von einer RDGC-Überexpressions-Fliege. **B:** ERG einer OBBOO-Messung der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante. **C:** Wildtyp-ERG einer OBBOO-Messung. Die farbigen Boxen unter dem ERG stehen für einen fünf Sekunden andauernden Lichtpuls der jeweiligen Farbe (O = Orange; B = Blau). Alle OBBOO-Messungen wurden gleich durchgeführt.

Als Erstes wurden OBBOO-Messungen durchgeführt (siehe 5.6.2.2 und 6.1.4.2). Die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante, der die Phosphatase RDGC fehlt, zeigt nach der OBBOO-Messung ein vergleichbares ERG wie der Wildtyp (Abb. 6.14B und C; siehe auch Steele and O'Tousa, 1990) und die Überexpressionsmutante (Abb. 6.14A). Alle drei Fliegen zeigen ein typisches ERG für eine OBBOO-Messung, wobei alle Fliegen mit einer ähnlichen Amplitude auf einen

## Ergebnisse

Lichtreiz antworten und das für weißäugige Fliegen typische PDA zeigen (siehe Abschnitt 6.2.4).

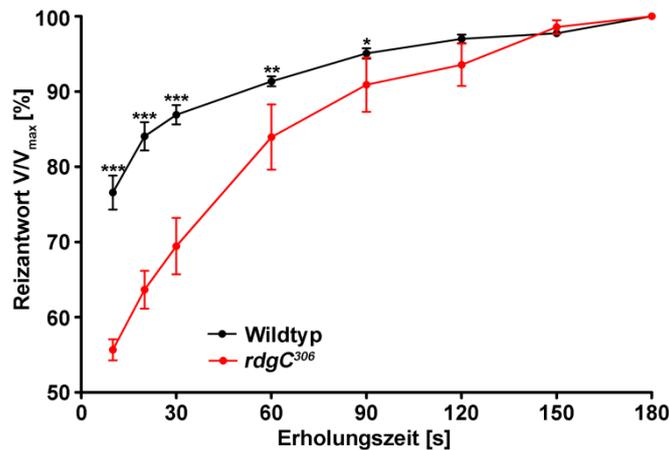
Für die statistische Auswertung der halben Deaktivierungszeit wurden, zusätzlich zu den OBBOO-Messungen, Messungen durchgeführt, bei denen ein nur 500 ms andauernder orangener Reizlichtpuls gegeben wurde. Aus diesen Messungen wird dann die halbe Deaktivierungszeit bestimmt (siehe 5.6.2.1), während die Inaktivierung aus den OBBOO-Messungen bestimmt wurde (siehe 5.6.2.2). Nach der statistischen Auswertung zeigt sich eine verlängerte halbe Deaktivierungszeit der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante (Abb. 6.15A) und zusätzlich noch eine verstärkte Inaktivierung (Abb. 6.15B). Interessanterweise hat die RDGC-Überexpressionsfliege keinen ERG-Phänotyp und ist in jeglicher Hinsicht wildtypisch (Abb. 6.15A und B) und wird somit für weitere Messungen nicht weiter berücksichtigt.



**Abbildung 6.15 Auswertung der Elektoretinogramme**, der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante und ihrer Kontrolle (unten angegeben). **A:** Halbe Deaktivierungszeit in Sekunden: das ist die Zeit, die das ERG benötigt, um nach Ausschalten des 500 ms andauernden Orangelichtpulses sich wieder auf das halbe Niveau zu erholen. (n = 4; ± Standardfehler; \*\*\*: p < 0,001). **B** Relative Inaktivierung in Prozent: der Prozentsatz, um den sich das Signal während des fünfsekündigen Orangelichtstimulus abschwächt (n = 4; ± Standardfehler; \*: p < 0,05).

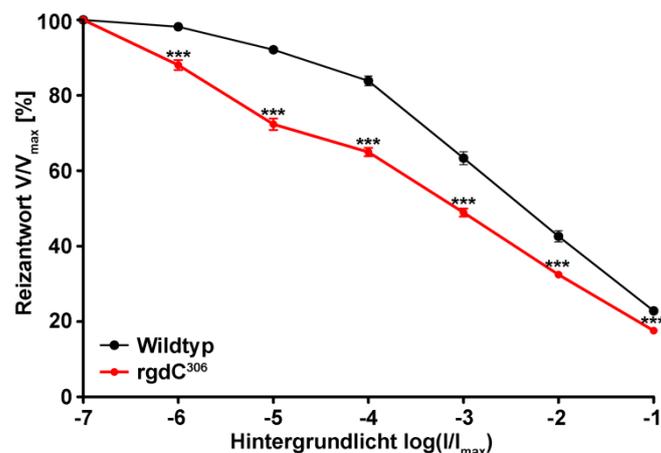
Als Nächstes wurde überprüft, wie viel Erholungszeit die Fliegen benötigen, um nach einem fünfsekündigen Lichtreiz wieder eine volle Reizantwort zu geben. Dafür wurden die Fliegen vor jeder Messung nach einem einzigen fünfsekündigen Lichtreiz drei Minuten dunkel adaptiert und anschließend nach 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Sekunden wieder einem fünf Sekunden andauernden Lichtreiz ausgesetzt und nachgemessen, wie stark die Reizantwort der Fliege auf diesen Reiz ausgefallen war. Dafür wurden die Amplituden der jeweiligen Zeitpunkte (10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s) mit der Amplitude nach drei Minuten Dunkeladaptation (180 s) verglichen. Daraus ergibt sich, dass die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante nach kurzen Erholungspausen von nur zehn Sekunden bis zu eineinhalb Minuten eine signifikant kleinere Amplitude generiert, also eine schwächere Reizantwort gibt als der Wildtyp. Erst nach zwei Minuten Dunkeladaptation unterscheiden sich die Amplituden der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante und die des Wildtyps nicht mehr (Abb. 6.16). Die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante hat somit im Vergleich zum Wildtyp eine längere Refraktärzeit.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.16 Refraktärzeit der *rdgC<sup>306</sup>*-Fliegen:** Gezeigt ist die relative Refraktärzeit in Sekunden, normalisiert auf die maximale Reizantwort mit 3 min Erholungszeit nach einem 5 s andauernden Orangelicht-Stimulus. Vor jeder Messung wurden die Fliegen einem 5 Sekunden andauernden Lichtpuls ausgesetzt und anschließend für die in der x- Achse angegebene Zeit (10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s und 180 s) dunkel adaptiert, um daraufhin wieder mit einem fünf Sekunden andauernden Orangelicht gereizt zu werden. In rot sind die ERG-Amplituden der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante und in schwarz des Wildtyps nach dem zweitem Lichtpuls gezeigt (*rdgC<sup>306</sup>*: n = 4 und Wildtyp: n = 9; ± Standardfehler; \*\*\*: p < 0,001; \*\*: p < 0,01; \*: p < 0,05).

Anschließend wurde die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante noch auf ihre Adaptationsfähigkeit hin untersucht. Die Adaptation bezeichnet die Fähigkeit, sich auf einen andauernden Reiz einzustellen, um anschließend, noch während dieser Reiz andauert, auf einen neuen Reiz reagieren zu können. In diesem Fall handelt es sich natürlich um einen Lichtreiz, d.h. es wird überprüft, wie gut die Mutanten einen definierten Lichtreiz wahrnehmen, während sie unterschiedlichen Hintergrund-Beleuchtungen ausgesetzt sind. Dafür wurden die Fliegen zunächst drei Minuten dunkeladaptiert. Anschließend wurde ein 35 Sekunden andauerndes orangenes Hintergrundlicht angeschaltet, das um den Faktor 10 bis 10.000.000 schwächer war als das fünf Sekunden andauernde Reizlicht, welches erst nach 30 Sekunden dazukam und dessen Reizantwort dann gemessen und ausgewertet wurde.

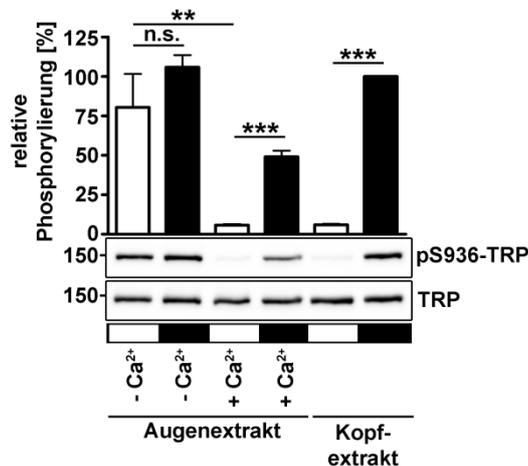


**Abbildung 6.17 Adaptation von *rdgC<sup>306</sup>*-Fliegen:** Gezeigt ist die relative Reizantwort, normalisiert auf die maximale Reizantwort ohne orangenes Hintergrundlicht auf einen 5 s andauernden Orangelicht-Stimulus in Abhängigkeit von der Hintergrundlicht-Stärke ( $\log(I/I_{max})$ ). Vor jeder Messung wurden die Fliegen drei Minuten dunkel adaptiert, dann wurde das orangene Hintergrundlicht für 35 s eingeschaltet und nach 30 s Hintergrundbeleuchtung wurde das orangene Reizlicht zugeschaltet (n = 9; ± Standardfehler; \*\*\*: p < 0,001).

Hier zeigte sich, dass die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante, egal bei welchem Hintergrundlicht, schlechter adaptiert als der Wildtyp, d.h. die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante generiert eine kleinere Amplitude auf das Reizlicht als die Wildtypfliegen, die einer schwächeren Reizantwort entspricht (Abb. 6.17).

### 6.3.4 Calciumabhängigkeit der Dephosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S936

Nachdem gezeigt wurde, dass die Phosphatase RDGC an der Dephosphorylierung des TRP-Kanals an der Phosphorylierungsstelle S936 beteiligt ist, und bekannt ist, dass RDGC calciumabhängig aktiviert wird (Lee and Montell, 2001), stellt sich die Frage, ob somit auch die Dephosphorylierung des TRP-Kanals an dieser Stelle calciumabhängig vonstattengeht. Um zu beweisen, dass Calcium einen direkten Einfluss auf die Dephosphorylierung hat, wurden von *Drosophila melanogaster* Wildtypen die Augen in dunkelrotem Licht ( $\lambda > 680$  nm) präpariert (siehe 5.3), was, da *Drosophila melanogaster* diese Wellenlänge des Lichts nicht sehen kann (Bentrop et al., 1997; Oberegelsbacher et al., 2011), Dunkelbedingungen entspricht und anschließend entweder in einer Ringerlösung (Standardlösung) mit Calcium (siehe 4.3) oder in einer calciumfreien Lösung (siehe 4.3) wie nachfolgend beschrieben inkubiert. Die Augen wurden nun 20 min im Dunkeln gelassen oder für 20 min belichtet. Die nachfolgende Extraktion des TRP-Kanals erfolgte, wie sie für die Screens bereits beschrieben wurde (siehe 5.1.1 bis 5.1.3.2).



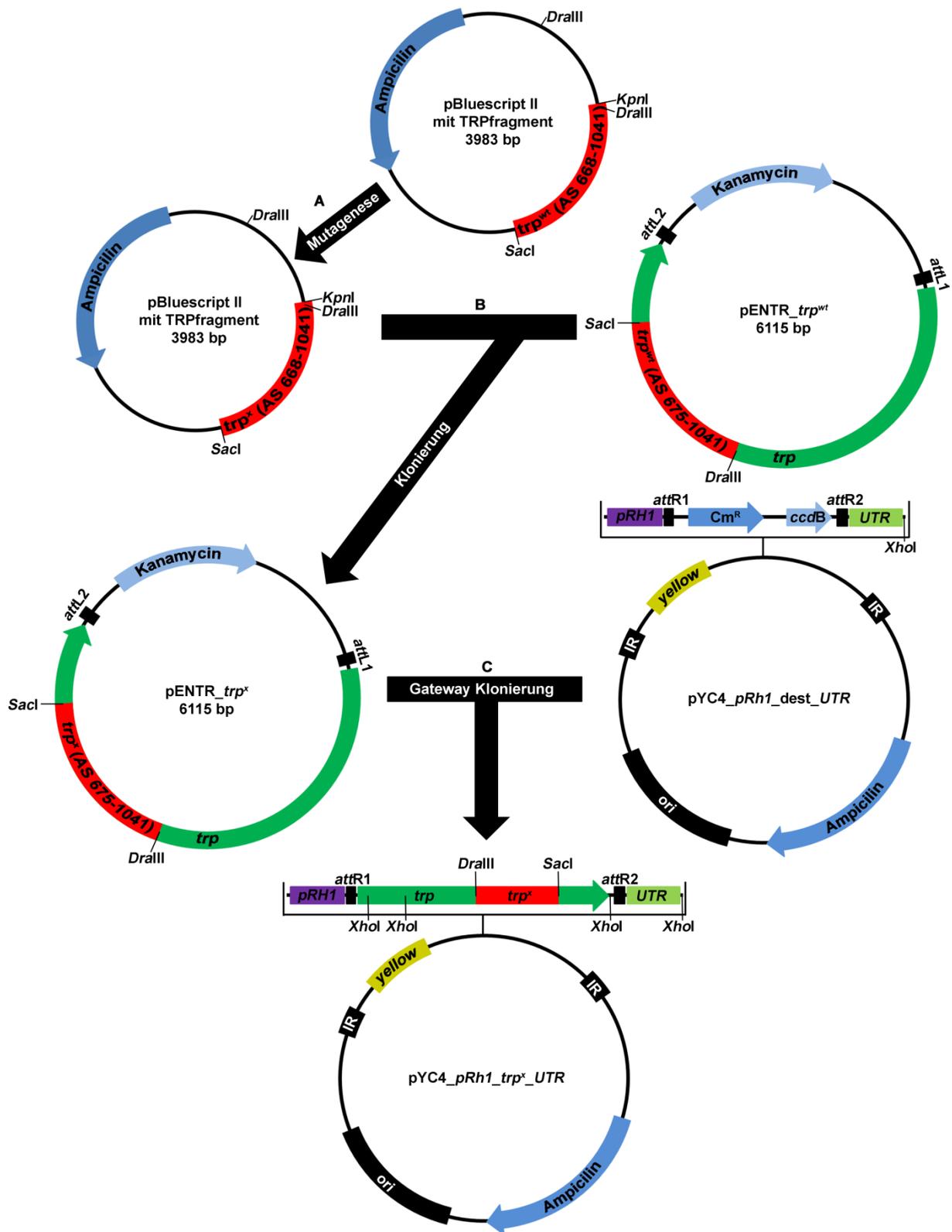
**Abbildung 6.18 Calciumabhängige Dephosphorylierung der Phosphorylierungsstelle S936 des TRP-Kanals *in situ*:** Das Balkendiagramm zeigt das relative Phosphorylierungsniveau in Prozent der Wildtypaugen- bzw. Wildtypkopfextrakte an. Die Augenextrakte wurden aus im Rotlicht präparierten Augen hergestellt, die zuvor in Lösungen mit und ohne Ca<sup>2+</sup> inkubiert wurden und währenddessen 20 min hell oder dunkel adaptiert wurden. (Ca<sup>2+</sup>-freie Augenextrakte: n = 5; normale Augen- und Kopfextrakte: n = 8 ; ± Standardfehler; n.s.: p > 0,05 (nicht signifikant); \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001). Der obere Westernblot zeigt das Signal des phosphospezifischen Antikörpers gegen die Phosphorylierungsstelle S936. Der untere Westernblot zeigt das Signal des panspezifischen TRP-AKs und auf der linken Seite ist das Molekulargewicht (in kDa) angegeben. Die weißen Balken stehen für Fliegen bzw. Augen die belichtet wurden, während die schwarzen Balken für Fliegen/Augen stehen, die nicht belichtet wurden „- Ca<sup>2+</sup>“: ohne Ca<sup>2+</sup>; „+ Ca<sup>2+</sup>“: mit Ca<sup>2+</sup>.

Wie die Abbildung 6.18 zeigt, kam es bei den Augenextrakten, die ohne Calcium belichtet wurden, nicht zu einer lichtabhängigen Dephosphorylierung der vorwiegend im Dunkeln phosphorylierten Stelle S936. Bei den Augenextrakten mit Calcium in der Inkubationslösung fand hingegen bei Belichtung eine Dephosphorylierung statt. Die Kopfextrakte des Wildtyps zeigen das für *Drosophila melanogaster* typische Phosphorylierungsmuster für die Stelle S936, eine sehr schwache Phosphorylierung im Licht und eine starke Phosphorylierung im Dunkeln.

#### 6.4 Herstellung der transgenen Fliegen *trp*<sup>T849A</sup>, *trp*<sup>T849D</sup> und *trp*<sup>S936D</sup>

Nachdem gezeigt wurde, dass die ePKC an der Phosphorylierung der Stelle T849 (siehe Abschnitt 6.1.5) und RDGC an der Dephosphorylierung von S936 beteiligt sind (siehe Abschnitt 6.3.2) und es Hinweise darauf gibt, dass RDGC auch an der Dephosphorylierung der beiden anderen getesteten Phosphorylierungsstellen (T849 und T864) direkt oder indirekt beteiligt ist (Abb. 6.13 A+B), wurde entschieden, mehrere Mutanten herzustellen, die diese Phosphorylierungszustände imitieren. Der Grund dafür ist der, dass das Fehlen der ePKC oder von RDGC zu einem deutlich messbaren ERG-Phänotyp führt, z.B. einer deutlich verlängerten Deaktivierungszeit (Abb. 6.11 und 6.16). Es stellt sich daher die Frage, ob diese Phänotypen durch die fehlerhafte Phosphorylierung bzw. die mangelnde Dephosphorylierung der jeweiligen Phosphorylierungsstellen zustande kommen oder andere Ursachen zugrunde liegen. Das heißt im Einzelnen, dass eine transgene TRP-Fliege hergestellt werden soll, bei der das Threonin an der Position 849 durch Alanin ersetzt werden sollte (*trp*<sup>T849A</sup>) und somit keine Phosphorylierung an dieser Position mehr möglich ist, da die Aminosäure Alanin keine OH-Gruppe besitzt, an der ein Phosphat gebunden werden kann. Diese *trp*<sup>T849A</sup>-Mutante würde dann für die Stelle T849 des TRP-Kanals einer PKC-Doppelnullmutante entsprechen, der die beiden Kinasen PKC und PKC53E(br) fehlen, die für die Phosphorylierung dieser Stelle verantwortlich sind. Außerdem soll eine Fliege mit einem mutanten TRP hergestellt werden, dessen Phosphorylierung des TRP-Kanals an der S936 immer der der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante entspricht. Da der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante die Phosphatase RDGC fehlt, die das Serin an der Position 936 dephosphoryliert, muss, um diesen Effekt zu generieren, dieses Serin mit der Aminosäure Asparaginsäure ausgetauscht werden (*trp*<sup>S936D</sup>). Dieser Austausch bewirkt dann eine sogenannte Phosphomimese, die daher zustande kommt, dass die Aminosäure Asparaginsäure, ähnlich wie eine Phosphorylgruppe, bei physiologischen Bedingungen deprotoniert wird und negativ geladen ist. Zusätzlich dazu haben Asparaginsäure und ein phosphoryliertes Serin auch noch eine vergleichbare Größe. Als Kontrolle wurde dann noch eine Fliege hergestellt, die phosphomimetisch für die Stelle T849 ist, d.h. das Threonin an dieser Stelle wurde gegen Asparaginsäure ausgetauscht (*trp*<sup>T849D</sup>). Die Kontrolle für die Phosphorylierungsstelle S936, bei der das Serin zu Alanin umgewandelt wurde (*trp*<sup>S936A</sup>), wurde bereits vor dieser Arbeit hergestellt und im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

## Ergebnisse

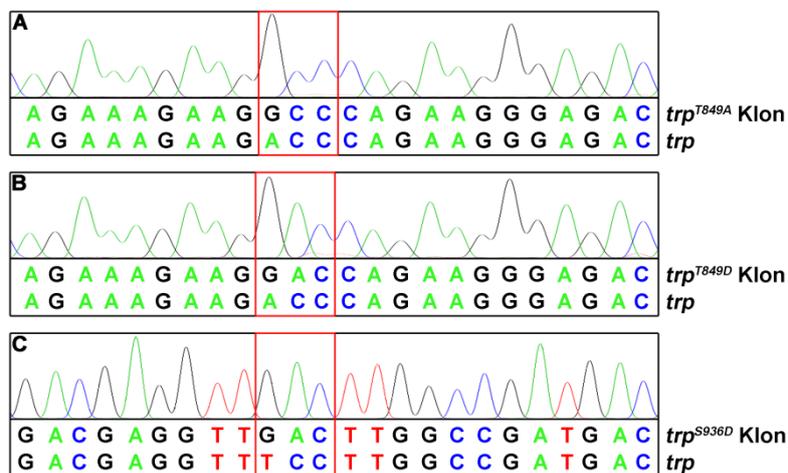


**Abbildung 6.19: Klonierungsstrategie** zur Generierung eines P-Element-Vektors, der das *trp*-Gen und einen vorangeschalteten Rhodopsin1-Promotors trägt. **A:** Die Mutagenese wird im pBluescript II Vektor, der ausschließlich das C-terminale Ende des *trp*-Gens enthält, durchgeführt. Der so neu entstandene Vektor hat nun einen mutierten *trp*-3'-Bereich (*trp*<sup>x</sup>). **B:** Dieses mutierte *trp*-Fragment wurde anschließend in den pENTR-*trp*<sup>wt</sup>-Vektor, der die gesamte wildtypische TRP-Sequenz enthält, mittels der Schnittstellen *SacI* und *DrallI* kloniert. Somit wurde der wildtypische 3'-Bereich durch den mutierten 3'-Bereich ausgetauscht. **C:** Das mutierte *trp*-Gen im pENTR-*trp*<sup>x</sup>-Vektor wurde anschließend mittels Gateway-Klonierung in den Injektionsvektor pYC4-*Rh1\_dest\_UTR* Vektor kloniert, der den Rhodopsin1-Promotor und den *yellow*<sup>+</sup>-Marker enthält.

## Ergebnisse

Um eine *Drosophila melanogaster* Mutante herzustellen, die einen punktuellen Aminosäureaustausch an einer bestimmten Stelle im TRP trägt, wurde eine *in vitro* Mutagenese durchgeführt. Das dadurch erzeugte DNA-Konstrukt wurde anschließend in *yellow,white* Fliegen unter der Kontrolle des Rh1-Promotors exprimiert. Dafür wurde die Sequenz, die für den C-Terminus des TRP-Kanals kodiert, der die Phosphorylierungsstellen T849 und S936 enthält, mittels der Schnittstellen *SacI* und *KpnI* in den Mutagenesevektor pBluescript II kloniert.

Unter Zuhilfenahme dieses Vektors (pBluescript II mit TRP-Fragment) wurden anschließend drei Mutagenesen durchgeführt (Abb. 6.19A). Zur Erzeugung des Aminosäureaustausches (siehe 5.4.7) an der Position 849 von Threonin nach Alanin wurde das Basentriplett ACC, das für die Aminosäure Threonin kodiert, mit Hilfe des Mutageneseprimers „TRP\_T849A“ (Materialteil Tabelle 4.15) in das Basentriplett GCC mutagenisiert, welches für die Aminosäure Alanin kodiert. Für den Aminosäureaustausch nach Asparaginsäure an der gleichen Position wurde der Mutageneseprimer „TRP\_T849D“ (Materialteil Tabelle 4.15) verwendet, der das Basentriplett ACC in das Basentriplett GAC ändert, das für die Aminosäure Asparaginsäure kodiert. Für den Aminosäureaustausch an der Position 936 von Serin (TCC) nach Asparaginsäure (GAC) wurde der Mutageneseprimer „TRP\_S936D“ (Materialteil Tabelle 4.15) verwendet. Zur Bestätigung der Mutagenese wurden die potenziell mutagenisierten pBluescript II (pB II)-Vektoren sequenziert (Abb. 6.20).

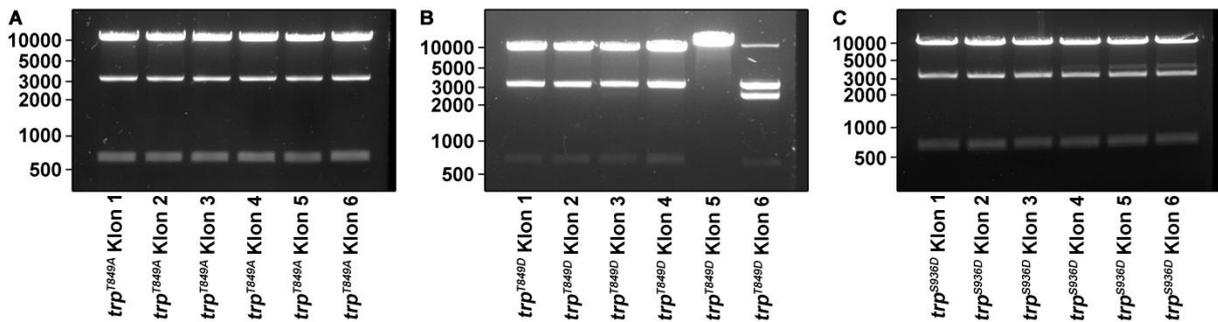


**Abbildung 6.20 Sequenzierungen der Mutagenesen der TRP-Fragmente in den pBluescript II Vektoren:** Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Chromatogramm des mutierten TRP-Fragments mit der jeweiligen Sequenz. Unterhalb der Chromatogramm-Sequenz ist zur Kontrolle die wildtypische Sequenz für diesen Bereich des TRP-Kanals angegeben. Der rote Kasten markiert das mutierte Basentriplett. **A:** Sequenzierung des Mutagenese Klons  $trp^{T849A}$  mit der Mutation von Threonin nach Alanin an der Position 849. **B:** Sequenzierung des Mutagenese Klons  $trp^{T849D}$  mit der Mutation von Threonin nach Asparaginsäure an der Position 849. **C:** Sequenzierung der Mutagenese Klons  $trp^{S936D}$  mit der Mutation von Serin nach Asparaginsäure an der Position 936.

Aus diesen Klonen wurde anschließend das mutierte *trp*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *DraIII* herausgeschnitten (siehe 5.4.4 bis 5.4.6) und in den pENTR\_*trp*<sup>wt</sup>-Vektor kloniert (siehe 5.4.8; Abb. 6.19B). Dieser Vektor enthält die vollständige

## Ergebnisse

wildtypische TRP-Sequenz, die zur weiteren Klonierung von att-sites flankiert ist. Die daraus entstandenen pENTR\_*trp*<sup>x</sup>-Vektoren, wobei das „x“ für die jeweilig mutierte Aminosäure steht (T849A, T849D oder S936D), wurden anschließend mittels Gateway-Klonierung (siehe 5.4.9) in den P-Element-Vektor pYC4\_prh1\_dest\_UTR, der ein zur Erkennung notwendiges *yellow*-Gen und den zur Expression des transgenen TRP-Kanals notwendigen Rhodopsin1-Promotor trägt, kloniert (Abb. 6.19C).



**Abbildung 6.21: Diagnostischer *Xho*I Verdau zur Kontrolle der Gateway-Klonierung.** 4 Banden: >10000 bp, 3057 bp, 645 bp und <250 bp

Zur Überprüfung, ob die Gateway-Klonierung erfolgreich war, wurde ein *Xho*I-Verdau durchgeführt (siehe 5.4.4), um sicherzustellen, dass der mutierte TRP-Kanal auch im Injektionsvektor enthalten ist. Den Erfolg der Klonierung kann man daran erkennen, dass der Vektor in vier Teile geschnitten wurde, wovon aufgrund der Tatsache, dass das kleinste Fragment (< 250 bp) aus dem Gel herausläuft, nur drei zu erkennen sind. Diese Fragmentierung kommt dadurch zu Stande, dass zwischen den att-sites im pENTR Vektor drei *Xho*I-Schnittstellen enthalten sind, die jetzt zusätzlich zu der einen bereits Vorhandenen in den pYC4-Vektor eingebracht werden. Das Enzym *Xho*I schneidet den Vektor in vier unterschiedlich große Teile mit der Größe von über 10000 Basenpaaren (bp), 3057 bp, 645 bp und unter 250 bp, wobei zu beachten ist, dass dieses Fragment so klein ist, dass es auf dem Gel nicht sichtbar ist. Alle Klone der Mutation T849A (Abb. 6.21A) und S936D (Abb. 6.21C) und die Klone eins bis vier der Mutation T849D (Abb. 6.21B) zeigen das korrekte Bandenmuster, was bedeutet, dass die Gateway-Klonierung aus dem pENTR-Vektor in den pYC4-Vektor erfolgreich abgeschlossen wurde.

Die so hergestellten Injektionsvektoren **pYC4\_prh1\_ *trp*<sup>T849A</sup>\_dest\_UTR**, **pYC4\_prh1\_ *trp*<sup>T849D</sup>\_dest\_UTR** und **pYC4\_prh1\_ *trp*<sup>S936D</sup>\_dest\_UTR** wurden zusammen mit dem Helferplasmid pUC, das für eine Transposase kodiert, in je 1000 *yellow, white* (*yw*) *Drosophila melanogaster*-Embryonen pro Konstrukt, injiziert (siehe 5.5.2). Die daraus schlüpfenden Fliegen wurden dann in Einzelkreuzungen mit *yellow, white* (*yw*)-Mutanten verkreuzt. Da die *yellow*-Mutation dafür sorgt, dass die Fliegen einen hellen Thorax und helle Flügel haben, kann man den Nachkommen ansehen, ob sie das transgene *trp* tragen oder nicht, da mit den transgenen *trp* zusammen auch ein neues und intaktes *yellow*-Gen

(*yellow*<sup>+</sup>) eingebracht wurde und diese Fliegen somit wieder einen dunklen Thorax und dunkle Flügel haben. Diese Fliegen wurden anschließend gemapped, um festzustellen auf welchem Chromosom die Insertion erfolgt ist (siehe 5.5.3.1). Daraufhin wurden alle mutanten Linien, die die Insertion auf den 2. Chromosom tragen, weiter verwendet. Diese Mutanten (*yw*; *p[trp<sup>x</sup>]/+*; +) wurden dann in einen TRPnull Hintergrund gekreuzt (siehe 5.5.3.2), damit der neu eingebrachte transgene TRP-Kanal der einzige TRP-Kanal im *Drosophila melanogaster*-Auge ist.

Die so entstanden transgenen *Drosophila melanogaster*-Mutanten mit den Genotypen *yw;p[rh1>trp<sup>T849A</sup>,y<sup>+</sup>];trp<sup>P343</sup>*, *yw;p[rh1>trp<sup>T849D</sup>,y<sup>+</sup>];trp<sup>P343</sup>*, *yw;p[rh1>trp<sup>S936D</sup>,y<sup>+</sup>];trp<sup>P343</sup>* und die bereits vor dieser Arbeit hergestellte transgene *Drosophila melanogaster*-Mutante *yw;p[rh1>trp<sup>S936A</sup>,y<sup>+</sup>];trp<sup>P343</sup>* werden ab jetzt als TRP\_T849A, TRP\_T849D, TRP\_S936A und TRP\_S936D bezeichnet.

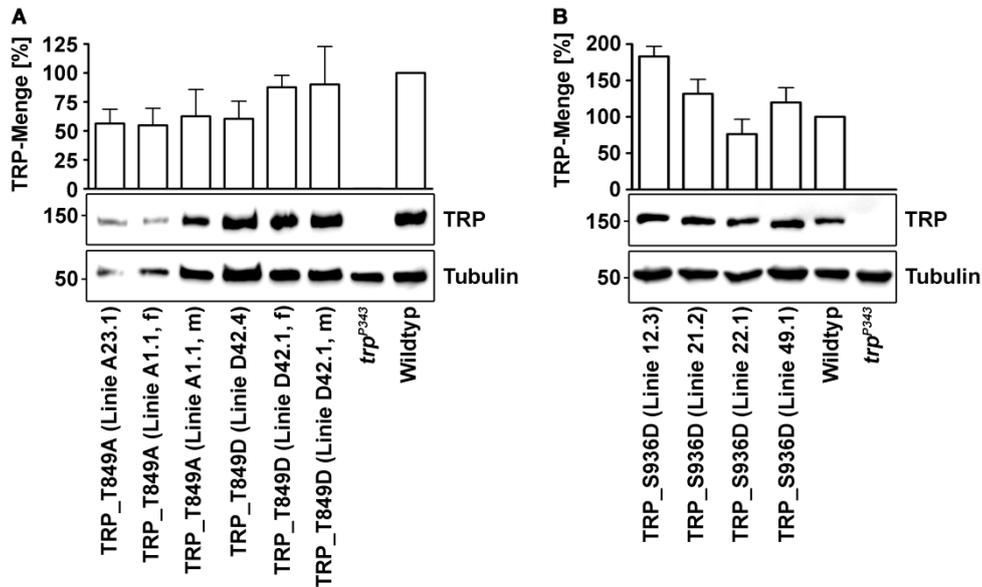
## 6.5 Charakterisierung der transgenen Fliegen TRP\_T849A, TRP\_T849D und TRP\_S936D

Für eine Charakterisierung der transgenen Fliegen wurde zunächst untersucht, ob die mutierten TRP-Kanäle in ausreichender Menge exprimiert wurden, die Kanal-Untereinheiten multimerisieren und an INAD binden konnten, die sonstigen Bestandteile der Signaltransduktionskaskade in den Photorezeptorzellen der transgenen Fliegen nicht beeinträchtigt wurden und der transgene TRP-Kanal korrekt in den Rhabdomeren der Photorezeptorzellen lokalisiert war.

### 6.5.1 Expressionsniveau der mutierten TRP-Kanäle

Als erstes wurden die verschiedenen Linien der transgenen Fliegen aus den Kreuzungen 6.3 auf ihren TRP-Gehalt hin überprüft, um zu prüfen, ob die Mutanten eine dem Wildtyp vergleichbare Menge an mutiertem TRP exprimieren. Dieser Punkt ist daher von Bedeutung, da gezeigt wurde, dass eine zu niedrige Expressionsrate des TRP-Kanals einen erheblichen Einfluss auf das elektrophysiologische Verhalten der Photorezeptoren haben kann (Wang et al., 2005). Getestet wurden die in Abb. 6.22 angegebenen transgenen *trp*-Linien, die in den TRPnull-Hintergrund gekreuzt wurden, d.h. dass die Expression des nativen TRP-Kanal durch die null Mutation *trp<sup>P343</sup>* verhindert wird.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.22 Bestimmung der transgenen TRP-Menge:** Das Balkendiagramm zeigt die relative TRP-Menge der getesteten transgenen Fliegen (n = 3; Linie 12.3 n = 2; ± Standardfehler). Der obere Westernblot zeigt das Signal des panspezifischen TRP-AKs auf der Höhe von ca. 150 kDa und der untere Westernblot zeigt das Signal des  $\beta$ -Tubulin AKs, der zur Normierung verwendet wurde. **A:** TRP-Menge in den mutanten Linien 42.4 und 42.1 mit der Mutation T849A und 1.1 und 23.1 mit der Mutation T849D in Relation zur wildtypischen TRP-Menge (f = weibliche Fliegen; m = männliche Fliegen). **B:** TRP-Menge in den mutanten Linien 12.3, 21.2, 22.1 und 49.1 mit der Mutation S936D.

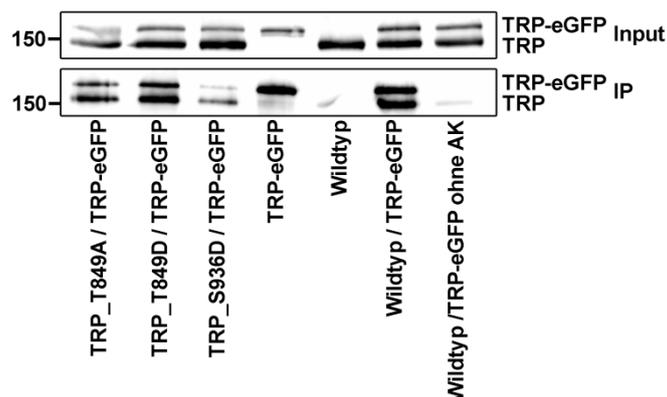
Da es für die Mutationen an der Stelle T849 jeweils nur eine Insertion des Transgens auf dem 2. Chromosom gab (die Linie A23.1 für die Mutation und Linie D42.4 für die Mutation zur Asparaginsäure), wurden hier auch Mutanten untersucht, bei der die Insertion nicht auf dem 2. Chromosom, sondern auf dem 1. Chromosom lokalisiert waren und die im TRPnull-Hintergrund waren, was bei der Linie A1.1 für die Alanin Mutation T849A und für die Linie D42.1 für die Mutation T849D der Fall war. Da das 1. Chromosom bei *Drosophila melanogaster* das Geschlechtschromosom ist und Männchen daher nur ein X-Chromosom besitzen, auf der die Insertion stattgefunden hat, wurden in diesem Fall die zu untersuchenden Mutanten nach Geschlechtern getrennt, um sicher zu überprüfen, ob ein Unterschied zwischen den hemizygoten Männchen (m) und den homozygoten Weibchen (f) besteht. Als Kontrolle für diesen Test wurden Wildtyp-Fliegen und eine Fliege ohne TRP-Kanal, die *trp*-Nullmutante *trp*<sup>P343</sup>, verwendet.

Keine der mittels Westernblot (siehe 5.1.3.1) getesteten Linien zeigte für die Mutationen an der Stelle 849 ein signifikant unterschiedliches Expressionsniveau ihres transgenen TRP-Kanals im Vergleich zur wildtypischen Expression (Abb. 6.22A). Es wurden für die Mutationen der Stelle T849 die beiden Linien A23.1 und D42.4 für die weiteren Experimente gewählt, da diese Mutanten den mutierten TRP-Kanal auf dem 2. Chromosom tragen und dieser Umstand für spätere Kreuzungen von Vorteil ist. Für die Mutation an der Stelle S936 zu Asparaginsäure (S936D) gab es mehr Auswahl für ein Insertionsereignis auf dem 2. Chromosom. Auch hier zeigte keine dieser Linien einen signifikanten Unterschied im Expressionsniveau im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde daher die Linie D49.1 zur weiteren

Untersuchung ausgewählt, da die Expressionsrate dieser Linie dem wildtypischen Expressionsniveau am nächsten war (Abb. 6.22B).

### 6.5.2 Multimerisierungstest der mutierten TRP-Kanäle

Ein funktioneller TRP-Kanal ist ein Multimer aus vier gleichen Untereinheiten (Katz et al., 2013). Es wurde daher geprüft, ob die mutierten TRP Kanäle Multimere ausbilden können. Für diesen Test wurden die Mutanten mit einer transgenen Fliege gekreuzt, die einen TRP-Kanal exprimiert, an den ein eGFP (green fluorescence protein) fusioniert ist und somit ein um 25 kDa höheres Molekulargewicht aufweist. Wenn die zu untersuchenden mutierten TRP Kanäle zu einer Multimerisierung fähig sind, entsteht durch diese Kreuzung der TRP-eGFP-Mutanten mit einer der transgenen TRP-Mutanten (TRP\_T849A, TRP\_T849D und TRP\_S936D) ein TRP-Kanal Multimer, das sowohl aus den mutierten TRP-Untereinheiten besteht als auch aus TRP-eGFP-Untereinheiten. Dieses Heteromultimer kann mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) nachgewiesen werden, da der mit eGFP gekoppelte TRP-Kanal etwas größer ist als der mutierte TRP-Kanal und somit bei einer SDS-PAGE etwas höher wandert als das mutierte TRP.



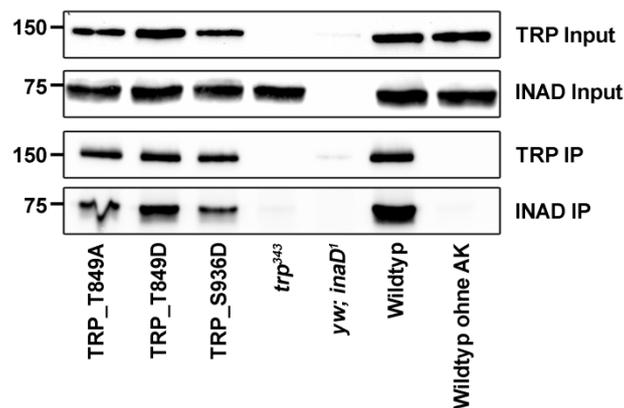
**Abbildung 6.23 TRP-Co-Immunopräzipitation:** Der obere Westernblot zeigt die Kopfextrakte der unten angegebenen Fliegen, bevor er auf die mit TRP-eGFP-AK gekoppelten Beads für die Immunopräzipitation gegeben wurde (Input), während der untere Westernblot die Proteine zeigt, die tatsächlich an den AK der Beads gebunden waren (IP). Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben und unterhalb der Westernblots der jeweils untersuchte Fliegenstamm.

Für diesen Nachweis wurde eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt (siehe 5.1.4), bei der der eGFP-AK, der gegen den GFP-Teil des TRP-eGFP gerichtet ist, an Agarosebeads gekoppelt wurde. Als Kontrollen für diese IPs dienten die homozygote TRP-eGFP-Mutante, der Wildtyp, eine heterozygote TRP\_eGFP Mutante und eine heterozygote TRP\_eGFP Mutante, bei der keine eGFP-AK an die Agarosebeads gekoppelt wurden, um ausschließen zu können, dass der TRP-Kanal auch ohne AK an die Agarosebeads koppeln kann. Der Extrakt der Mutanten, die das transgene und das eGFP-TRP exprimieren (der obere Westernblot in Abb. 6.23), wurde daraufhin zu den Beads gegeben und anschließend mittels Westernblot-Analyse und einem polyklonalen TRP-AK, der auch das TRP-eGFP erkennen kann, überprüft, welche Proteine aus dem Extrakt präzipitiert wurden. Wie der Abbildung

6.23 (IP) zu entnehmen ist, wurde in den Mutanten das TRP-eGFP präzipitiert, das direkt an den gekoppelten eGFP-AK bindet und das mutierte TRP wurde copräzipitiert, womit gezeigt werden konnte, dass der transgene TRP-Kanal in allen Mutanten zu einer Multimerisierung mit dem wildtypischen TRP fähig ist.

### 6.5.3 Interaktionstest der mutierten TRP-Kanäle mit dem Gerüstprotein INAD

Anschließend wurde auch die Interaktionsfähigkeit der transgenen TRP-Kanäle mit dem Gerüstprotein INAD überprüft, da die Interaktion für die korrekte Signalweiterleitung wichtig ist. Das INAD ist an das TRP, das als Membrananker für den Signalkomplex dient, gekoppelt. Nur so ist gewährleistet, dass alle wichtigen Komponenten der Signaltransduktionskaskade in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sind. Ohne diese räumliche Nähe wäre die überaus schnelle Signalweiterleitung nicht möglich und die Fliege hätte eine deutlich verschlechterte zeitliche Bildauflösung, welche sich auch in der Elektrophysiologie niederschlagen würde (Pak et al., 2012).

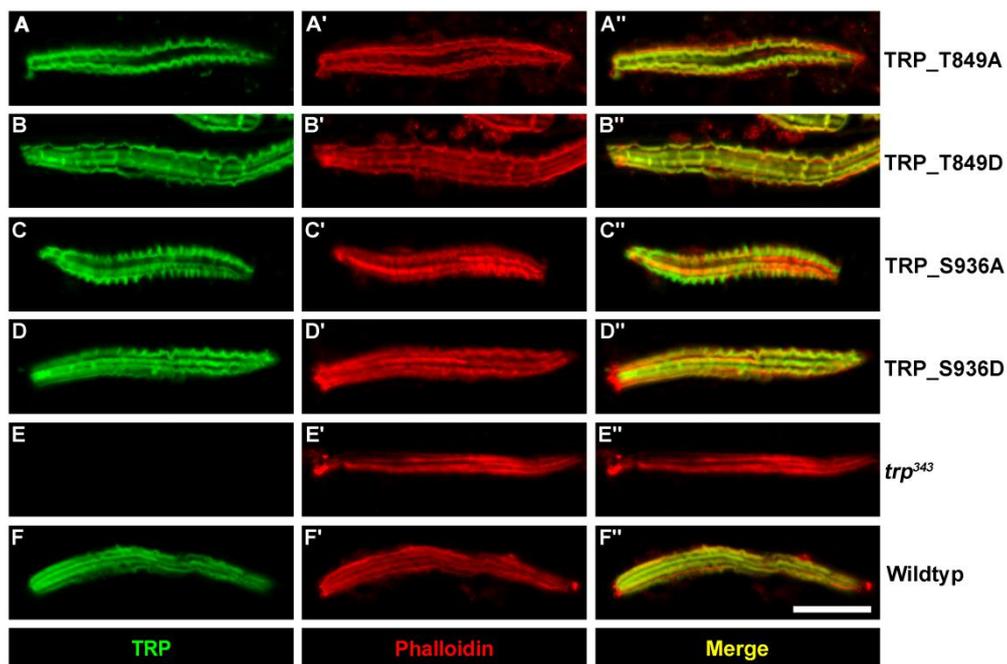


**Abbildung 6.24 INAD-Co-Immunopräzipitation:** Die beiden oberen Westernblots zeigen den Kopfextrakt der jeweiligen Fliegen (unten angegeben), bevor dieser auf die Beads für die Immunopräzipitation gegeben wurde (Input), an die der INAD-AK gekoppelt wurde. Die unteren beiden Westernblots zeigen die Proteine, die an die AK der Beads gebunden waren (IP). Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben und unterhalb der Westernblots der jeweils untersuchte Fliegenstamm.

Für dieses Experiment wurde der monoklonale TRP-AK an die Agarosebeads gekoppelt und per Westernblot nachgeschaut, ob das INAD mit dem jeweilig in der Fliege exprimierten TRP copräzipitiert wurde. Als Kontrollen dienten hier die Mutanten *trp*<sup>P343</sup>, die Mutante ohne TRP-Kanal, der Wildtyp, die *inaD*<sup>1</sup>-Mutante, die kein INAD exprimieren kann und der Wildtyp ohne TRP-AK auf den Agarosebeads, um auszuschließen, dass das INAD auch ohne gekoppeltes TRP an die Beads gebunden werden kann. Wie das positive Signal der transgenen TRP-Mutanten der Westernblotanalyse für die IP in Abbildung 6.24 zeigt, binden die transgenen TRP-Kanäle genau wie der wildtypische TRP-Kanal auch an INAD.

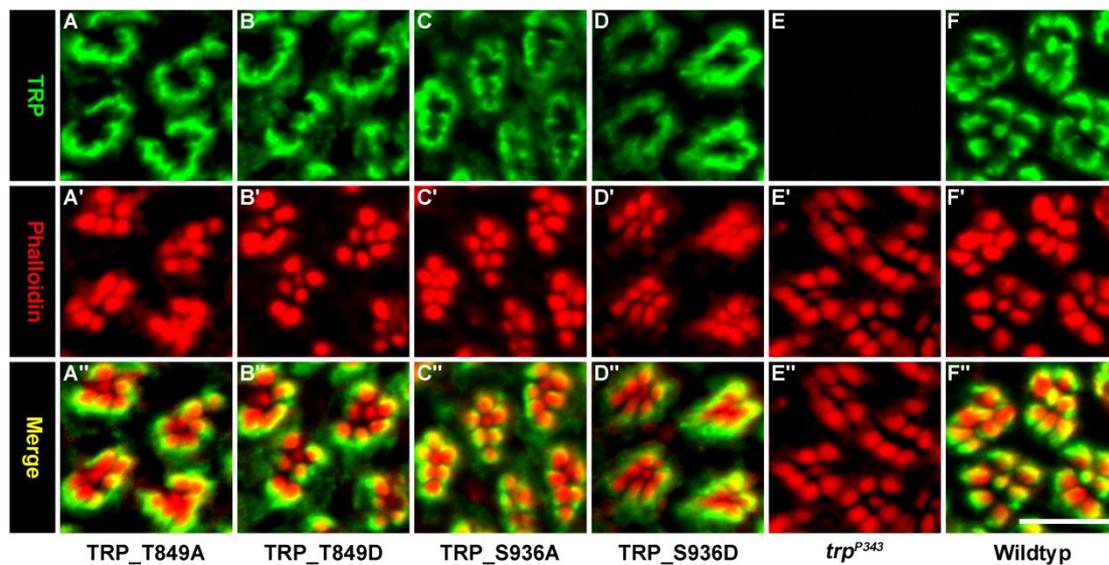
### 6.5.4 Subzelluläre Lokalisation der transgen exprimierten TRP-Kanäle

Um zu überprüfen, ob die mutierten TRP-Kanäle auch an der richtigen Stelle im *Drosophila melanogaster*-Auge lokalisiert sind, wurden Ommatidien vereinzelt und mittels Immunfluoreszenz untersucht (siehe 5.2.1). Zuerst wurde der TRP-Kanal mit dem Fluorophor Cy5 markiert, der an einen sekundären Anti-Maus-Antikörper gekoppelt ist und somit den in Mauszellen hergestellten TRP-AK erkennt, mit dem die mutierten TRP-Kanäle markiert wurden (Abb. 6.25A-F in Grün). Als Zweites wurde das Rhabdomer mit dem Fluorophor Alexa 488 markiert, der wiederum an das Pilzgift Phalloidin gekoppelt ist, das an das F-Aktin bindet, aus dem die Rhabdomere zu Teil bestehen (Abb. 6.25A'-F' in Rot). Anhand der Überlagerungsbilder in Abb. 6.25A''-F'' ist zu erkennen (in Gelb), dass die mutierten TRP-Kanäle TRP\_T849A, TRP\_T849D, TRP\_S936A und TRP\_S936D (A-D) an der gleichen Stelle lokalisiert sind wie auch die TRP-Kanäle im Wildtyp (F). Um sicherzustellen, dass der TRP-AK keine unspezifischen Signale generiert, wurde eine TRPnull-Mutante untersucht, die keine unspezifischen Signale zeigt (E).



**Abbildung 6.25 TRP-Lokalisation in isolierten Ommatidien:** Gezeigt sind Isolierte Ommatidien der transgenen Fliegen TRP\_T849A (A), TRP\_T849D (B), TRP\_S936A (C), TRP\_S936D (D), der TRPnull Mutante  $trp^{P343}$  (E) und des Wildtyps (F). In Grün ist die TRP-Lokalisation mittels Cy5 Markierung, vermittelt durch einen sekundären Antikörper, des monoklonalen TRP-AKs zu sehen (A-F). In Rot ist die Phalloidin-Markierung der Rhabdomere mittels Alexa Fluor 488 zu erkennen (A'-F'). A''-F'' zeigt die Überlagerung dieser beiden Signale (in Gelb).

Nach der Feststellung, dass in allen transgenen Fliegen das mutierte TRP korrekt im Rhabdomer lokalisiert ist, wurden zur genaueren Bestimmung, wo genau im Rhabdomer das mutierte TRP lokalisiert ist, mit einem Kryostat Gefrierschnitte hergestellt (siehe 5.5.2), die einen Querschnitt durch die Ommatidien ermöglicht und somit einen Blick hinein.



**Abbildung 6.26 TRP-Lokalisation in Querschnitten:** Gezeigt sind Kryotom Dünnschnitte durch das Auge der transgenen Fliegen TRP\_T849A (A), TRP\_T849D (B), TRP\_S936A (C), TRP\_S936D (D), der TRPnull Mutante  $trp^{P343}$  (E) und des Wildtyps (F). In Grün ist die TRP-Lokalisation mittels Cy5 Markierung, vermittelt durch einen sekundären Antikörper, des monoklonalen TRP-AKs zu sehen (A-F). In Rot ist die Phalloidin-Markierung der Rhabdomere mittels Alexa Fluor 488 zu erkennen (A'-F'). A''-F'' zeigt die Überlagerung dieser beiden Signale (in Gelb).

Die Dünnschnitte wurden anschließend mittels Phalloidin zur Lokalisierung der Rhabdomere (Abb. 6.26 in Rot) und mit dem panspezifischen  $\alpha$ -TRP-AK zur Bestimmung der Lokalisation des TRPs (Abb. 6.26 in Grün) markiert. Die Überlagerung dieser beiden Signale zeigt die genaue Lokalisation des TRPs im Rhabdomer, die bei allen transgenen Fliegen dem Ort des Wildtyps gleichen (Abb. 6.26 in Gelb).

### 6.5.5 Expression der Komponenten der Phototransduktionskaskade in den transgenen Fliegen

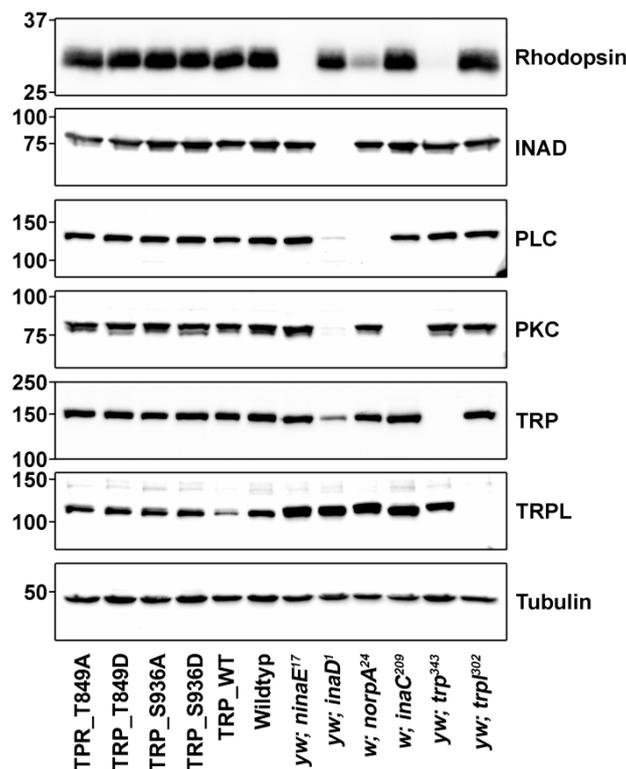
Zuletzt wurde noch überprüft, ob die Mutation des TRP-Kanals an der Stellen T849 oder S936 zu Expressionsstörungen der Proteine in der Signaltransduktionskaskade führt. Es wurde mittels Westernblot-Analyse (siehe 5.1.3.2) überprüft, ob die wichtigen Proteinkomponenten der visuellen Signaltransduktionskaskade in den mutierten Fliegen noch exprimiert werden und ob diese Expression den wildtypischen Mengen entspricht. Dabei wurden Rhodopsin 1, INAD, PLC, PKC, TRP und TRPL auf ihre Expression hin untersucht (Abb. 6.27). Als Ladekontrolle wurde der  $\beta$ -Tubulin-Antikörper verwendet.

Es kam bei keiner der transgenen TRP-Mutanten zu Auffälligkeiten in der Expression der untersuchten Signaltransduktionsproteine (Abb. . Alle untersuchten Proteine zeigten normale Expression. Als Kontrollen für die verwendeten Antikörper auf allen Westernblots dienten hier folgende *Drosophila melanogaster*-Stämme: Eine Fliege, bei der ein wildtypisches TRP unter Kontrolle eines Rhodopsin1-Promotors exprimiert wird (TRP\_WT), der normale Wildtyp, die *ninaE*<sup>17</sup>-Mutante, eine Mutante ohne Rhodopsin 1, die *inaD*-Nullmutante (*inaD*<sup>1</sup>),

## Ergebnisse

*norpA*<sup>24</sup>, eine Mutante ohne die Phospholipase C (PLC), die *inaC*<sup>P209</sup>-Mutante, die Mutante, die keine ePKC mehr exprimiert, die Mutante, die kein TRP mehr exprimiert (*trp*<sup>P343</sup>) und *trpl*<sup>302</sup>, die Mutante die kein TRPL mehr exprimiert.

Bei der *inaD*<sup>1</sup>-Mutante ist eine verringerte Expression von PLC, PKC und TRP zu beobachten. Das ist darauf zurückzuführen, dass diese Proteine alle am INAD verankert sind. Wenn das INAD fehlt, unterliegen diese Proteine einer zeitlich abhängigen Degradation (Chevesich et al., 1997; Tsunoda et al., 1997). Die *trp*<sup>P343</sup>-Mutante zeigte, wie schon von beschrieben, eine verringerte Rhodopsin-Expression (Sengupta et al., 2013).



**Abbildung 6.27 Überprüfung der visuellen Signaltransduktionskaskade** der transgenen *Drosophila melanogaster*: Gezeigt sind Westernblots der verschiedenen transgenen TRP-Mutanten TRP\_T849A und D, TRP\_S936A und D zusammen mit den Kontrollen TRP\_WT, Wildtyp, *ninaE*<sup>17</sup>, *inaD*<sup>1</sup>, *norpA*<sup>24</sup>, *inaC*<sup>P209</sup>, *trp*<sup>P343</sup> und *trpl*<sup>302</sup> (unter den Westernblots). Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben und auf der rechten Seite der jeweils benutzte Antikörper.

### 6.5.6 Herstellung von transgenen Fliegen ohne natives TRP und TRPL

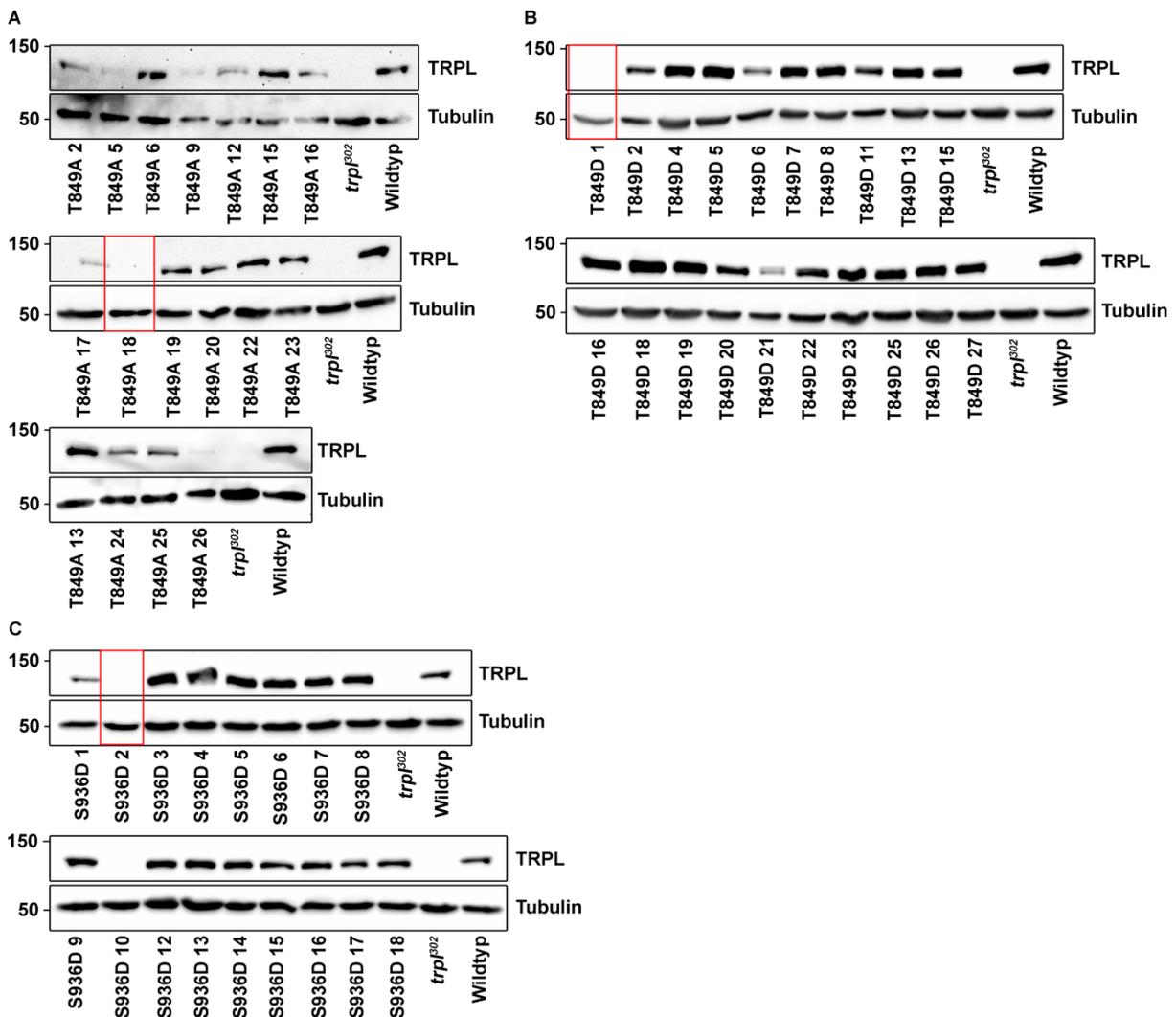
Um sicherzustellen, dass die eventuell auftretende ERG-Phänotypen der transgenen TRP-Mutanten TRP\_T849A, TRP\_T849D, TRP\_S936A und TRP\_S936D auch auf die Mutation im TRP-Kanal zurückzuführen sind, wurden aus diesen Mutanten auch noch der TRPL-Kanal entfernt, der auch an der Erzeugung der Reizantwort nach einer Belichtung beteiligt ist (Niemeyer et al., 1996).

Um eine solche Mutante herzustellen, die einen mutierten TRP Kanal in einem *trpl*<sup>P302</sup>; *trp*<sup>P343</sup> Null-Hintergrund exprimiert, wurden die bereits oben hergestellten transgenen Fliegen mit

## Ergebnisse

der P-Element-Insertion auf dem 2. Chromosom und mit der  $trp^{P343}$ -Mutation, mit dem  $trpl^{302}$ -Allel im  $trp^{343}$ -Hintergrund rekombiniert (siehe 5.5.3.3).

Um zu überprüfen, ob die Rekombination in der F1-Generation (Kreuzung 5.5) stattgefunden hatte, wurden Einzelkreuzungen für die F2-Generation angesetzt, bei der die potentiell rekombinierten Männchen, die heterozygot eine P-Element-Insertion mit einem der transgenen TRP-Kanäle und eine homozygote  $trpl^{302}$ -Mutation trugen, mit der  $trpl^{302};trp^{343}$ -Doppelmutante verkreuzt. Die Nachkommen aus dieser F2-Generation, die dunkle Flügel hatten und somit den transgenen TRP-Kanal tragen, wurden dann mittels Westernblotanalyse (siehe 5.1.3.1) auf die Abwesenheit von TRPL und somit auf eine erfolgreiche Rekombination getestet.



**Abbildung 6.28: Rekombinationstest von TRP\_T849A, TRP\_T849D und TR\_S936D mit  $trpl^{302}$ :** Test auf die Rekombination vom P-Element-Vektor  $p[rh1>trp^{T849A}, y+]$  mit  $trpl^{302}$  in **A**, von  $p[rh1>trp^{T849D}, y+]$  mit  $trpl^{302}$  in **B** und  $p[rh1>trp^{S936D}, y+]$  mit  $trpl^{302}$  in **C**. Der jeweils obere Westernblot zeigt das Signal eines TRPL-Antikörpers und der jeweils untere Westernblot das Signal eines  $\beta$ -Tubulin-Antikörpers (als Ladekontrolle). Die roten Boxen markieren die erfolgreich rekombinierten Linien, die für diese Arbeit weiter verwendet wurden. Unterhalb der Westernblots sind die jeweiligen getesteten Rekombinationsansätze und die Kontrollen ( $trpl^{302}$ -Mutante und der Wildtyp) angegeben. Auf der linken Seite ist das jeweilige Molekulargewicht (in kDa) angegeben.

Es kam bei allen transgenen TRP-Stämmen zu mind. einer nachweisbaren Rekombination, die an der fehlenden TRPL-Expression zu erkennen ist. Für die transgene TRP-Mutante T849A zeigte die Linie „T849A 18“ kein Signal für den TRPL-AK (Abb. 6.28A rote Box), für die transgene TRP-Mutation T849D die Linie „T849D 1“ (Abb. 6.28B rote Box) und für die transgene TRP-Mutante S936D die Linien „S936D 2“ und „S936D 10“, wobei die Linie „S936D 2“ weiter verwendet wurde (Abb. 6.28C rote Box).

Anschließend wurden die ausgewählten Linien homozygot für die P-Element-Insertion gekreuzt (Kreuzung 5.6). Die so entstandenen transgenen  $trpl^{P302};trp^{P343}$ -Doppelnullmutanten  $yw;p[rh1>trp^{T849A},y^+],trpl^{302};trp^{P343}$ ,  $yw;p[rh1>trp^{T849D},y^+],trpl^{302};trp^{P343}$  und  $yw;p[rh1>trp^{S936D},y^+],trpl^{302};trp^{P343}$ , sowie die bereits vor dieser Arbeit hergestellte transgene Fliege  $yw;p[rh1>trp^{S936D},y^+],trpl^{302};trp^{P343}$  werden im Folgenden nur noch TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN, TRP\_S936A DN und TRP\_S936D DN genannt, wobei das „DN“ für den  $trpl^{302};trp^{343}$ -„Doppelnull“-Hintergrund der transgenen Fliegen steht.

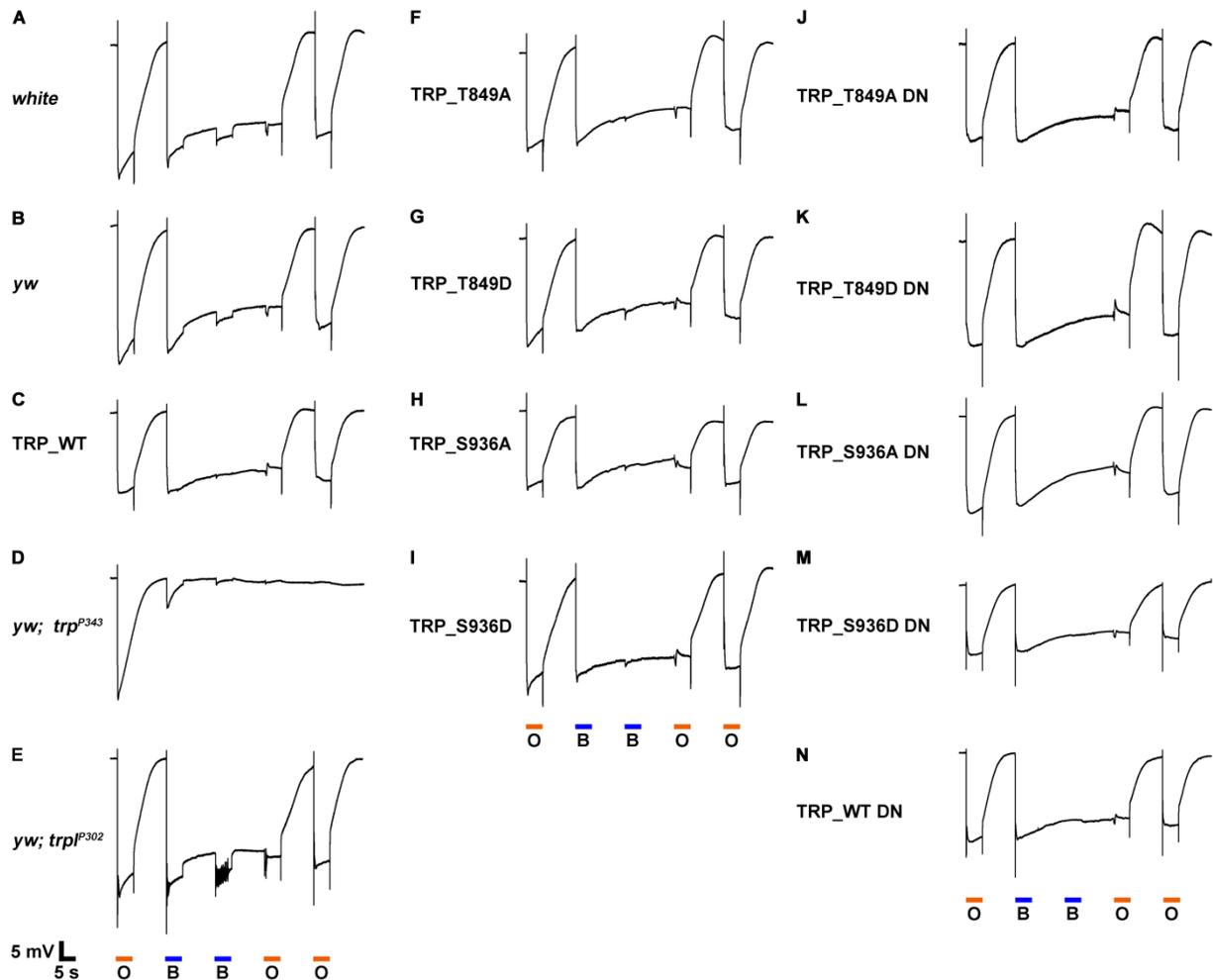
## 6.6 Elektoretinogramme aller mutierten TRP-Mutanten

Nachdem abgeklärt wurde, dass die mutierten TRP-Kanäle ein ähnliches Expressionslevel wie der Wildtyp aufweisen, sie mit TRP multimerisieren und mit INAD interagieren, die visuelle Signaltransduktionskaskade nicht beeinträchtigt zu sein scheint und noch transgene Fliegen hergestellt wurden, die auch kein TRPL mehr exprimieren, wurde nun die Physiologie aller mutierten TRP-Kanäle (TRP\_T849A, TRP\_T849A DN, TRP\_T849D, TRP\_T849D DN, TRP\_S936A, TRP\_S936A DN, TRP\_S936D und TRP\_S936D DN) mittels ERG-Messungen genauer untersucht (siehe 5.6).

Als erstes wurde zur allgemeinen Überprüfung der Lichtantwort der verschiedenen Mutanten die Diagnosemessung des OBBOO-Protokolls, wie in Abschnitt 6.1.4.2 schon beschrieben, durchgeführt (Abb. 6.29). Diese Messungen ergaben, dass die transgenen Mutanten nicht den  $trp^{P343}$  Phänotyp zeigten, so wie er in Abb. 6.29D zu erkennen ist, sondern ein ERG genauso wie bei der transgenen  $trp^{WT}$ -Fliege (Abb. 6.29C), die, genau wie die transgenen  $trp$ -Mutanten auch, ihren TRP-Kanal unter dem  $rh1$ -Promotor exprimieren (TRP\_WT). Bei den transgenen Mutanten mit TRPL (Abb. 6.29 F-I) ist zu beobachten, dass es, im Gegensatz zu den anderen Kontrollen *white* (A), *yw* (B),  $trp^{P343}$  (D) und  $trpl^{302}$  (E), nur noch zu einem sehr geringem Ausschlag nach der zweiten Blaulichtapplikation kommt, da die Mutanten mit mutiertem TRP ihr TRP unter der Kontrolle des Rhodopsin1-Promotors exprimieren, der wiederum nur in den Rezeptorzellen R1-R6 aktiv ist und die nach der ersten Blaubelichtung ins PDA übergegangen sind. Da die Photorezeptorzellen R7 bis R8 aber noch TRPL haben, zeigen sie noch einen sehr kleinen Ausschlag, der bei den Mutanten, die kein TRPL mehr exprimieren, dann auch fehlt (Abb. 6.29 J und M). In den Kontrollen in A, B, D und E gibt es noch den nativen TRP-Kanal in den Rezeptorzellen R7 und R8 und so zeigten sie auch noch einen wenn auch kleinen Ausschlag nach der zweiten Blaubelichtung.

## Ergebnisse

Daraus lässt sich schließen, dass die mutierten TRP-Kanäle in den Rezeptorzellen R1 bis R6 auf den ersten Blick einwandfrei zu funktionieren scheinen.

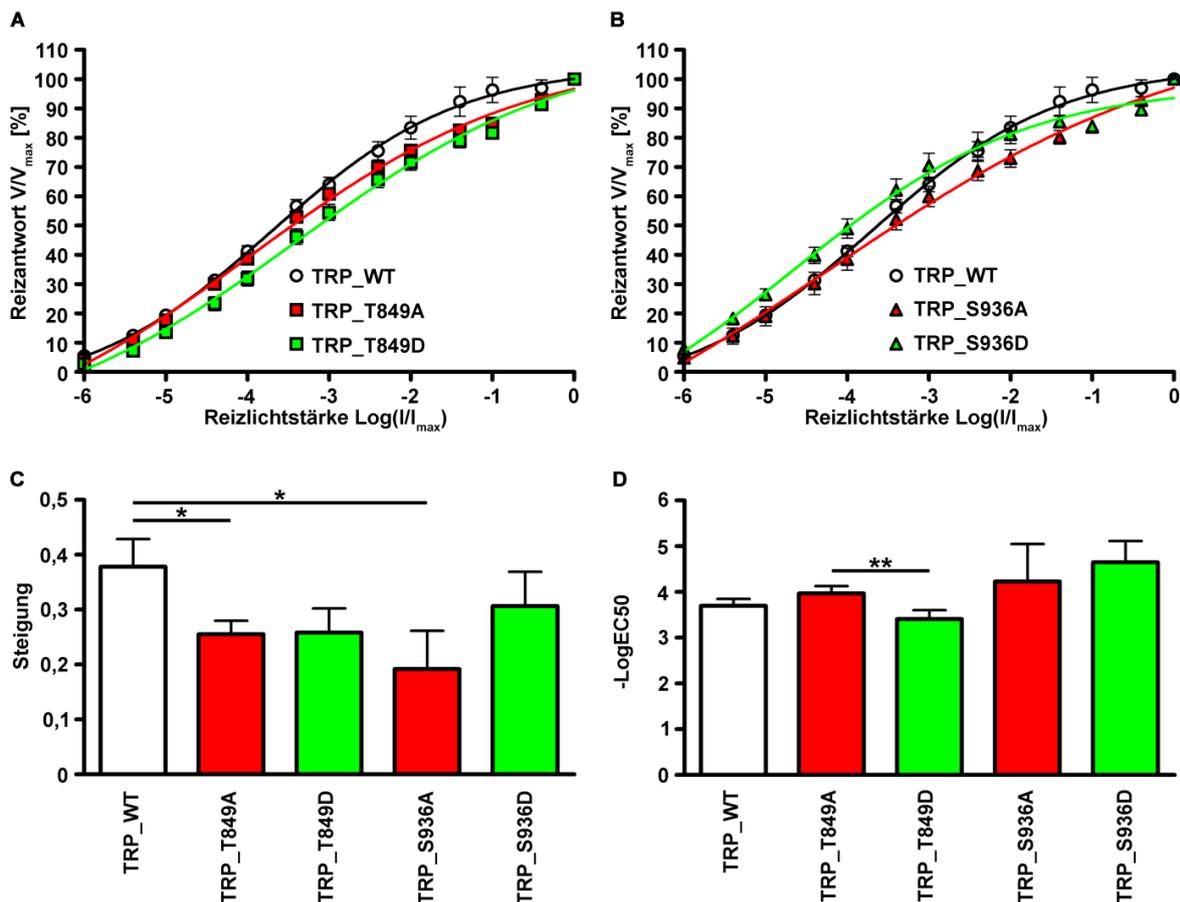


**Abbildung 6.29 OBBOO-Messungen der transgenen *Drosophila melanogaster*-Stämme:** Abgebildet sind OBBOO-Messungen der transgenen TRP *Drosophila melanogaster*-Mutanten mit der Mutation am TRP an der Position T849 nach Alanin (F und J) und nach Asparaginsäure (G und K) und die Mutationen an der Position S936 nach Alanin (H und L) und nach Asparaginsäure (I und M). Zusätzlich sind die dazugehörigen Kontrollen der *white*-Mutante (A), einer *yw*-Mutante (B), des TRP-Rescue-Konstrukts (C), der *trp*<sup>P343</sup>-Mutante (D) und der *trp*<sup>P302</sup>-Mutanten (E) abgebildet. Die farbigen Striche unter den ERGs stehen für einen fünf Sekunden andauernden Lichtpuls der jeweiligen Farbe (O = Orange; B = Blau). Alle OBBOO-Messungen wurden identisch durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten werden die Mutanten mit einer Alanin-Mutation, sowohl an der Phosphorylierungsstelle T849 als auch an S936 des TRP-Kanals, immer in rot und die Mutanten mit der Asparaginsäure-Mutation, immer in grün angegeben. Die verwendeten Kontrollen (TRP\_WT oder TRP\_WT DN) werden immer in weiß angegeben sein. Sie exprimiert den TRP-Kanal, genau wie die zu untersuchenden Mutanten auch, unter Kontrolle der Rhodopsin Promotors.

### 6.6.1 Bestimmung der Reiz-Antwort-Kurve aller transgenen *trp*-Mutanten

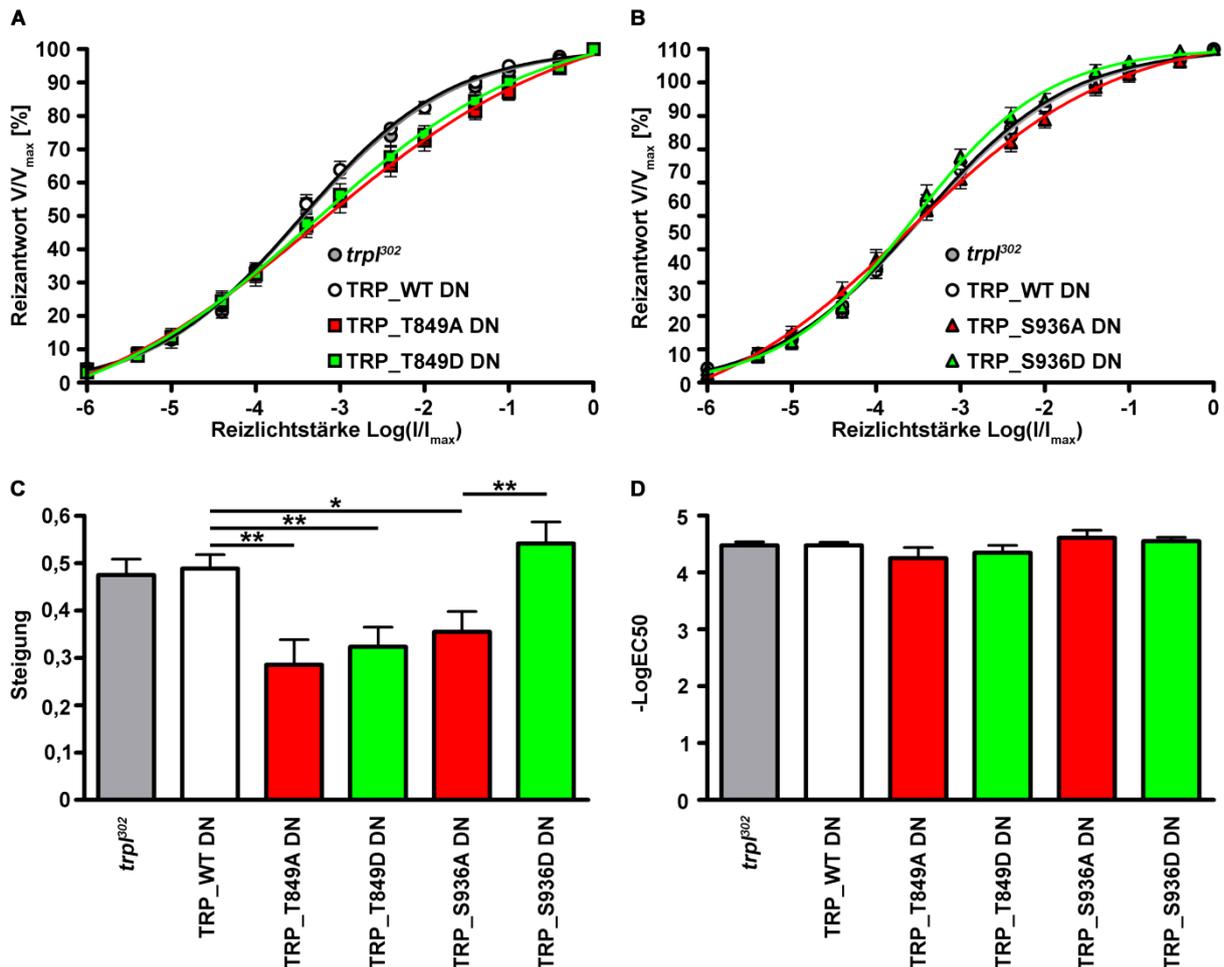
Als Erstes wurde eine Reiz-Antwort-Kurve der transgenen TRP-Kanäle ermittelt (siehe 5.6.2.3), um festzustellen, ob die eingefügten Mutationen des TRP-Kanals einen Einfluss auf das Antwortverhalten bei unterschiedlichen Reizlichtstärken haben. Dafür wurden die zu messenden Fliegen vor jeder Messung für drei Minuten dunkeladaptiert und anschließend mit ansteigender Reizlichtstärke gereizt, beginnend mit  $10^6$ -fach abgeschwächtem Orangelicht ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -6$ ) im Vergleich zur unabgeschwächten Lichtstärke bis zur maximalen Reizlichtstärke von 1 ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = 0$ ), die auch für alle anderen Messungen benutzt wurde. In Abb. 6.30 und 6.31 wurden die resultierenden Antworten gegen die Reizlichtstärke aufgetragen und daraus eine sigmoidale Ausgleichskurve berechnet (Reiz-Antwort-Kurve).



**Abbildung 6.30 Reiz-Antwort-Kurve der transgenen *trp*-Mutanten mit TRPL:** Gezeigt sind die Reiz-Antwort-Kurven der transgenen TRP-Mutanten für TRP\_T849A (rote Quadrate) und TRP\_T849D (grüne Quadrate) in **A** und für TRP\_S936A (rote Dreiecke) und TRP\_S936D (grüne Dreiecke) in **B** mit jeweils der Kontrolle TRP\_WT (weiße Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen für drei Minuten dunkel adaptiert und anschließend bei 13 verschiedenen Lichtintensitäten ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -6; -5,6; -5; 4,6; \dots; -0,6; 0$ ), die jeweils 500 ms lang andauerten, angeregt und gegen die gemessene Reizantwort ( $V/V_{\text{max}}$ ) aufgetragen. Die Werte wurden normiert auf den maximal möglichen Ausschlag ( $V_{\text{max}}$ ) dieser jeweiligen TRP-Mutante bei maximaler Beleuchtung (Reizlichtstärke von  $\text{Log}0$ ) ( $n = 9$ ; TRP\_S936A  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler). **C:** Variable Steigung der Reiz-Antwort-Sigmoidfunktion der transgenen TRP-Mutanten und des Wildtyps ( $n = 9$ ; TRP\_S936A  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler; \*:  $p < 0,05$ ). **D:**  $-\text{LogEC}_{50}$  der transgenen TRP-Mutanten und des Wildtyps ( $n = 9$ ; TRP\_S936A  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler; \*\*:  $p < 0,01$ ).

## Ergebnisse

Wie die Kurven aller transgenen Fliegen in Abb. 6.30 und 6.31 zeigen, reagierten alle transgenen Fliegen auf eine ansteigende Lichtintensität mit einer ansteigenden Amplitude der Reizantwort. Es zeigten sich aber Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.



**Abbildung 6.31 Reiz-Antwort-Kurve der transgenen *trp*-Mutanten ohne TRPL:** Gezeigt sind die Reiz-Antwort-Kurven der transgenen TRP-Mutanten für TRP\_T849A DN (rote Quadrate) und TRP\_T849D DN (grüne Quadrate) in **A** und für TRP\_S936A DN (rote Dreiecke) und TRP\_S936D DN (grüne Dreiecke) in **B** mit jeweils der Kontrolle TRP\_WT DN (weiße Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen für drei Minuten dunkel adaptiert und anschließend bei 13 verschiedenen Lichtintensitäten ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -6; -5,6; -5; 5,6; \dots; -0,6; 0$ ), die jeweils 500ms lang andauern, angeregt und gegen die gemessene Reizantwort ( $V/V_{\text{max}}$ ) aufgetragen. Die Werte wurden normiert auf den maximal möglichen Ausschlag ( $V_{\text{max}}$ ) dieser jeweiligen TRP-Mutante bei maximaler Beleuchtung (Reizlichtstärke von  $\text{Log}0$ ) ( $n = 9; \pm$  Standardfehler). **C:** Variable Steigung der Reiz-Antwort-Sigmoidfunktion der transgenen TRP-Mutanten und der Kontrollen ( $n = 9; \pm$  Standardfehler; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). **D:** -LogEC50 der transgenen TRP-Mutanten und der Kontrollen ( $n = 9; \pm$  Standardfehler;).

Es kam bei den beiden transgenen Fliegen TRP\_T849A und TRP\_S936A zu einer signifikant flacheren Steigung der Reiz-Antwort-Kurve im Vergleich zum Wildtyp (TRP\_WT), wobei sich die Alanin- und Asparaginsäure-Mutationen untereinander nicht voneinander unterschieden (Abb. 6.30C). Wenn man sich die Wendepunkte der Sigmoidfunktionen der Reiz-Antwort-Kurve, den sogenannten -LogEC50 anschaut, zeigten sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp, egal welche der Phosphorylierungsstellen mutiert wurde, zu was sie mutiert wurde oder ob TRPL exprimiert wurde oder nicht (Abb. 6.30D und

Abb. 6.31D). Es zeigte sich aber ein Unterschied zwischen den Wendepunkten der Reiz-Antwort-Kurve der transgenen Fliegen TRP\_T849A und TRP\_T849D (Abb. 6.30D), der sich aber wie schon gesagt nur mit TRPL zeigt, sobald das TRPL entfernt wird, verschwindet dieser Unterschied wieder (Abb. 6.31D).

Bei der Reiz-Antwort-Kurve der transgenen *trp*-Mutanten ohne TRPL zeigten die beiden Mutanten der Phosphorylierungsstelle T849, TRP\_T849A DN und TRP\_T849D DN ein verändertes Reiz-Antwort-Verhalten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.37A). Das manifestierte sich in einer deutlich flacheren Steigung der Kurven für die Mutanten TRP\_T849A DN und TRP\_T849D DN, wobei sie untereinander keinen Unterschied aufwiesen (Abb. 6.31C). Auch die Mutation an der Stelle S936 nach Alanin zeigte diesen Phänotyp, wobei hier noch dazu kommt, dass sich auch die Mutation zu Alanin zusätzlich noch signifikant von der Asparaginsäure Mutation unterschied (Abb. 6.31C).

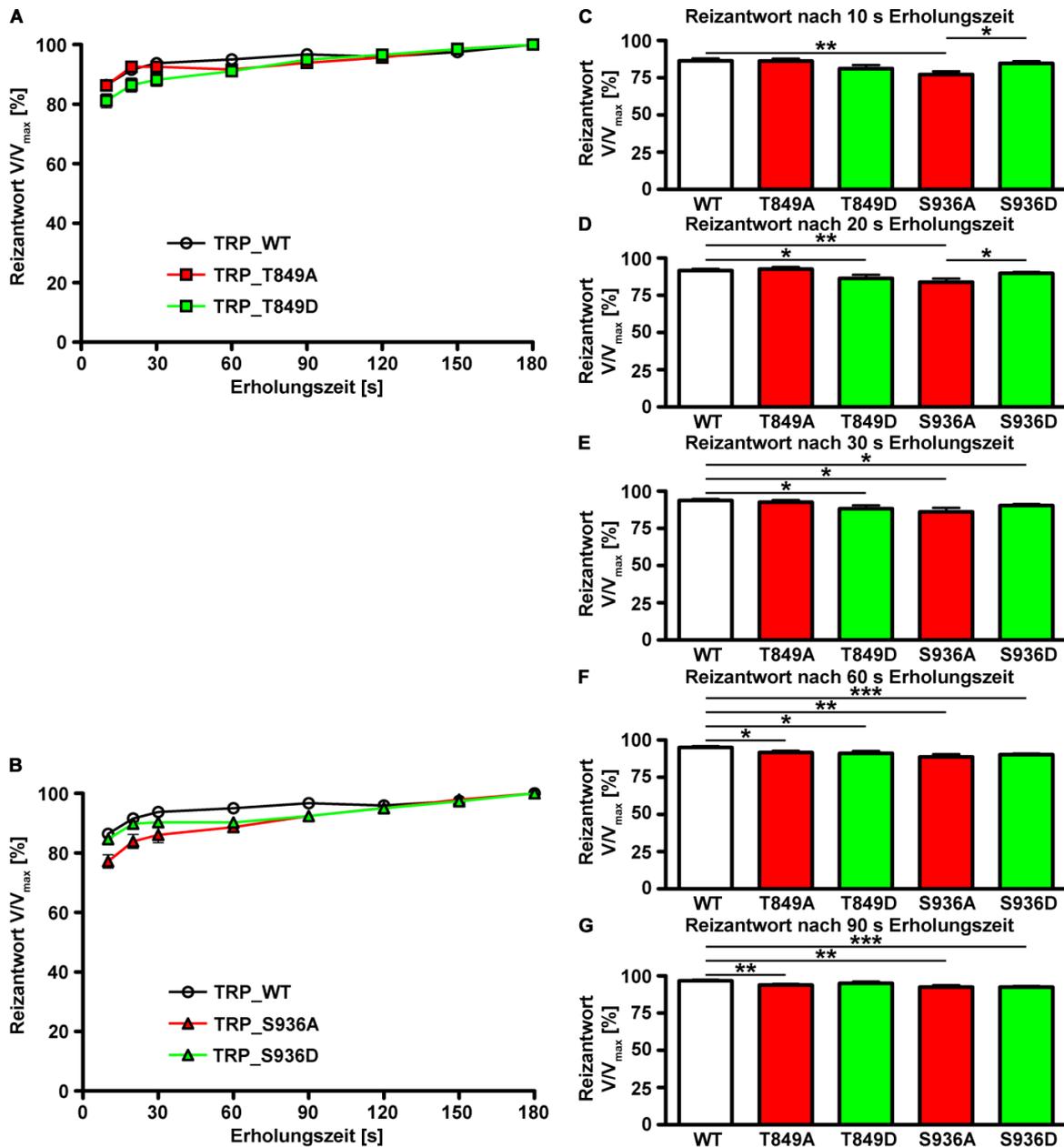
### 6.6.2 Bestimmung der Refraktärzeit aller transgenen *trp*-Mutanten

Als nächstes wurden die transgenen Fliegen dahingehend untersucht, ob sich die Refraktärzeit, also die Erholungszeit, die eine *Drosophila melanogaster*-Fliege benötigt, um nach einem Lichtreiz wieder die maximale Reizantwort zu geben, verändert hat (siehe 5.6.2.4). Hierfür wurden die Fliegen vor der Durchführung des Messprotokolls drei Minuten dunkeladaptiert und anschließend mit einem fünfsekündigen Orangelichtpuls gereizt. Anschließend wurden acht Messungen durchgeführt, bei denen die Erholungszeiten, nach den fünf Sekunden andauernden Messreizen, immer länger wurden. Die kürzeste Erholungszeit nach dem ersten Messreiz betrug 10 s, die nächste 20 s, dann 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s und schließlich drei Minuten. Die Reizantworten dieser einzelnen Messungen wurden auf die Reizantwort nach drei Minuten normiert und in Prozent der maximalen Amplitude angegeben (Abb. 6.32A und B bzw. Abb. 6.33A und B).

Die Reizantwort aller gemessenen Mutanten mit dem TRPL-Kanal waren nach zwei Minuten wieder auf einem ähnlichen Niveau, bei etwa 95 % der maximalen Amplitude. Wenn die Mutanten aber weniger als zwei Minuten Erholungszeit bekommen hatten, zeigten sich bei 90 Sekunden Erholungszeit bei den Mutanten TRP\_T849A, TRP\_S936A und TRP\_S936D eine reduzierte Reizantwort im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.32G) und nach einer Minute Erholungszeit zeigten alle transgenen Mutanten eine verringerte Amplitude im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.32F). Wenn man die Erholungszeit weiter auf eine halbe Minute verkürzt, kommt es bei den transgenen Mutanten TRP\_T849D, TRP\_S936A und TRP\_S936D weiterhin zur Abschwächung der Reizantwort (Abb. 6.32E). Bei einer weiteren Verkürzung der Erholungszeit auf 20 Sekunden zeigten dann allerdings nur noch die Mutante TRP\_T849D und TRP\_S936A eine verringerte Amplitude der Reizantwort (Abb. 6.32D) und bei der maximalen Verkürzung der Erholungszeit auf 10 Sekunden zeigte nur noch die

## Ergebnisse

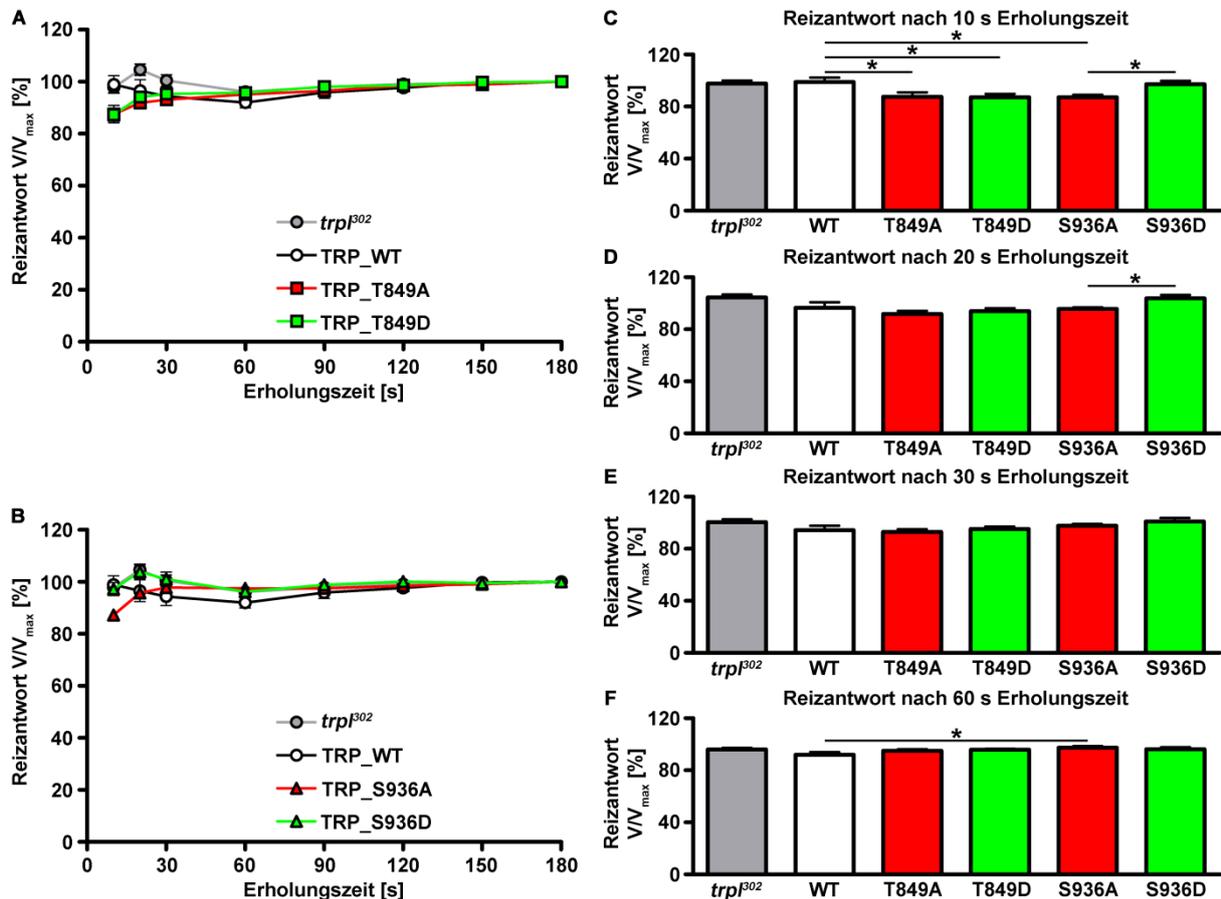
Mutante TRP\_S936A eine deutliche Abschwächung der Amplitude im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.32C).



**Abbildung 6.32 Refraktärzeit der transgenen *trp*-Mutanten mit TRPL:** Gezeigt sind die Ergebnisse der Messung zur Bestimmung der Refraktärzeit der transgenen TRP-Fliegen in **A** für TRP\_T849A (rote Quadrate) und TRP\_T849D (grüne Quadrate) und in **B** für TRP\_S936A (rote Dreiecke) und TRP\_S936D (grüne Dreiecke) mit jeweils der Kontrolle TRP\_WT (weiße Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen drei Minuten dunkeladaptiert und anschließend mit einem fünf sekundigem Orangelicht Reiz behandelt. Direkt darauf folgend wurden die Fliegen in den Abständen 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s und 180 s fünf Sekunden andauernden Orangelichtreize ausgesetzt und die jeweilige Reizantwort ( $V/V_{max}$ ), normiert auf das maximale Signal ( $V_{max}$ ), das nach 180 s Erholungszeit auftritt, aufgezeichnet und gegen die Erholungszeit in Sekunden aufgetragen ( $n = 9$ ; TRP\_S936A:  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler). **C-G:** Reizantworten aller transgenen Mutanten und der Wildtyp-Kontrolle nach 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, oder 90 s Erholungszeit, normiert auf die maximal mögliche Reizantwort nach drei Minuten ( $n = 9$ ; TRP\_S936A:  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse

Bei diesen beiden kurzen Erholungszeiten von 10 und 20 Sekunden gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den transgenen Mutanten TRP\_S936A und TRP\_S936D. Ansonsten zeigte sich kein Unterschied zwischen den Mutationen nach Alanin oder Asparaginsäure der Phosphorylierungsstellen T849 (Abb. 6.32A) bzw. S936 (Abb. 6.32B) untereinander.



**Abbildung 6.33 Refraktärzeit der transgenen *trp*-Mutanten ohne TRPL:** Gezeigt sind die Ergebnisse der Messung zur Bestimmung der Refraktärzeit der transgenen TRP-Mutanten in **A** für TRP\_T849A DN (rote Quadrate) und TRP\_T849D DN (grüne Quadrate) und in **B** für TRP\_S936A DN (rote Dreiecke) und TRP\_S936D DN (grüne Dreiecke) mit jeweils den Kontrollen TRP\_WT DN (weiße Kreise) und der TRPLnull-Mutante (graue Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen drei Minuten dunkeladaptiert und anschließend mit einem fünf sekundigem Orangelicht gereizt. Direkt darauf Folgend wurden die Fliegen in den Abständen 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s und 180 s fünf Sekunden andauernden Orangelichtreizen ausgesetzt und die jeweilige Reizantwort ( $V/V_{max}$ ), normiert auf das maximale Signal ( $V_{max}$ ) das nach 180 s Erholungszeit auftritt, aufgezeichnet und gegen die Erholungszeit in Sekunden aufgetragen ( $n = 9$ ;  $\pm$  Standardfehler). **C-F:** Reizantworten aller transgenen Mutanten und der Wildtyp-Kontrolle nach 10 s, 20 s, 30 s, 60 s oder 90 s Erholungszeit, normiert auf die maximal mögliche Reizantwort nach drei Minuten ( $n = 9$ ;  $\pm$  Standardfehler; \*:  $p < 0,05$ )

Bei der Bestimmung der Refraktärzeit der transgenen Fliegen ohne den TRPL-Kanal zeigte sich, dass die Mutanten TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN und TRP\_S936A DN eine deutlich schwächere Reizantwort generieren als der Wildtyp, wenn sie nur zehn Sekunden Erholungszeit nach einer fünf Sekunden andauernden Orangebelichtung bekommen. Es zeigte sich auch, dass es bei den Mutanten der Stellen T849 untereinander zu keinem

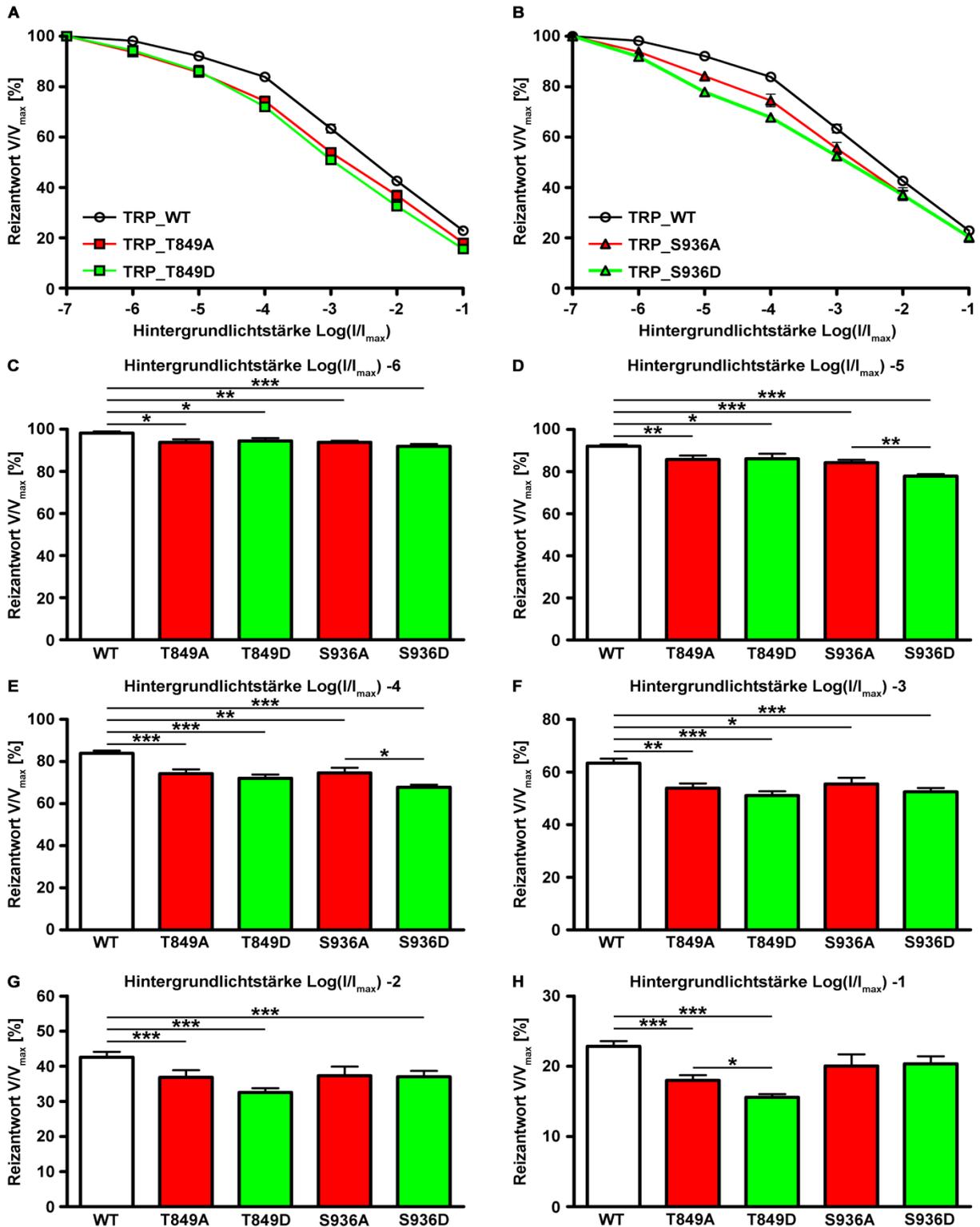
Unterschied kam, im Gegensatz zu den Mutanten der S936er Stelle, bei denen die Alanin-Mutation zu einer deutlich schwächeren Reizantwort führte als die Mutation zu Asparaginsäure (Abb. 6.33C). Bereits nach 20 Sekunden Erholungszeit kam es bei keiner der Mutationen mehr zu einem Unterschied in der Reizantwort im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigte sich aber immer noch ein Unterschied zwischen den Mutationen der Stelle S936, wobei auch hier die Alanin-Mutation zu einer deutlich schwächeren Reizantwort führte als die Asparagin-Mutation (Abb. 6.33D). Mit steigender Erholungszeit kam es zu keiner weiteren schwächeren Reizantwort der Mutanten zum Wildtyp oder untereinander. Es kam aber noch zu einer Auffälligkeit: die Mutation der Phosphorylierungsstelle S936 in die Aminosäure Alanin führte zu einer erhöhten Reizantwort im Vergleich zum Wildtyp, wenn man dieser Mutante 60 Sekunden Erholungszeit lies (Abb. 6.33F).

### **6.6.3 Untersuchung der Adaptationsfähigkeit aller transgenen *trp*-Mutanten**

Ein weiterer Parameter, den es zu untersuchen galt, war die Adaptationsfähigkeit der transgenen Fliegen (siehe 5.6.2.5). Die Adaptation beschreibt die Fähigkeit, sich an veränderte Umstände anzupassen. In diesem Fall waren das unterschiedlich starke Hintergrundbeleuchtungen. Zur Bestimmung dieses Parameters wurden auch hier die Fliegen vor jeder Messung drei Minuten dunkel adaptiert und wie im Abschnitt 6.3.1.3 beschrieben gemessen. Die Reizantworten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf den maximalen Wert bei minimaler Hintergrundbeleuchtung normiert (sprich 100%).

Es zeigte sich, dass es bei allen transgenen Fliegen mit TRPL zu einer verschlechterten Adaptation bei schwächeren Hintergrundbeleuchtungen von der 0,000001 fachen bis zu 0,001 fachen Stärke des Reizlichtes (Abb. 6.34 C-F) kam, d.h. die Mutanten sehen den Messreiz bei einer leichten Hintergrundbeleuchtung schlechter als der Wildtyp. Zusätzlich dazu zeigten die Asparaginsäure-Mutante TRP\_S936D eine verschlechterte Adaptation im Vergleich zur Alanin-Mutation an der Stelle S936 (TRP\_S936A) bei Hintergrundbelichtungen von  $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -5$  (Abb. 6.34D) und  $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -4$  (Abb. 6.31E). Bei stärker werdender Hintergrundbeleuchtung von  $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -2$  zeigen die Mutanten TRP\_T849A, TRP\_T849D und TRP\_S936D noch eine Verschlechterung ihrer Adaptationsfähigkeit (Abb. 6.34G). Und bei maximaler Hintergrundbeleuchtung, die ein Zehntel der Reizlichtstärke entspricht, zeigen nur noch die beiden Mutanten der Phosphorylierungsstelle T849 eine verschlechterte Adaptation, wobei die Mutante TRP\_T849D ein schlechtere Adaptationsfähigkeit zeigt als die Alanin-Mutante TRP\_T849A (Abb. 6.34H).

## Ergebnisse



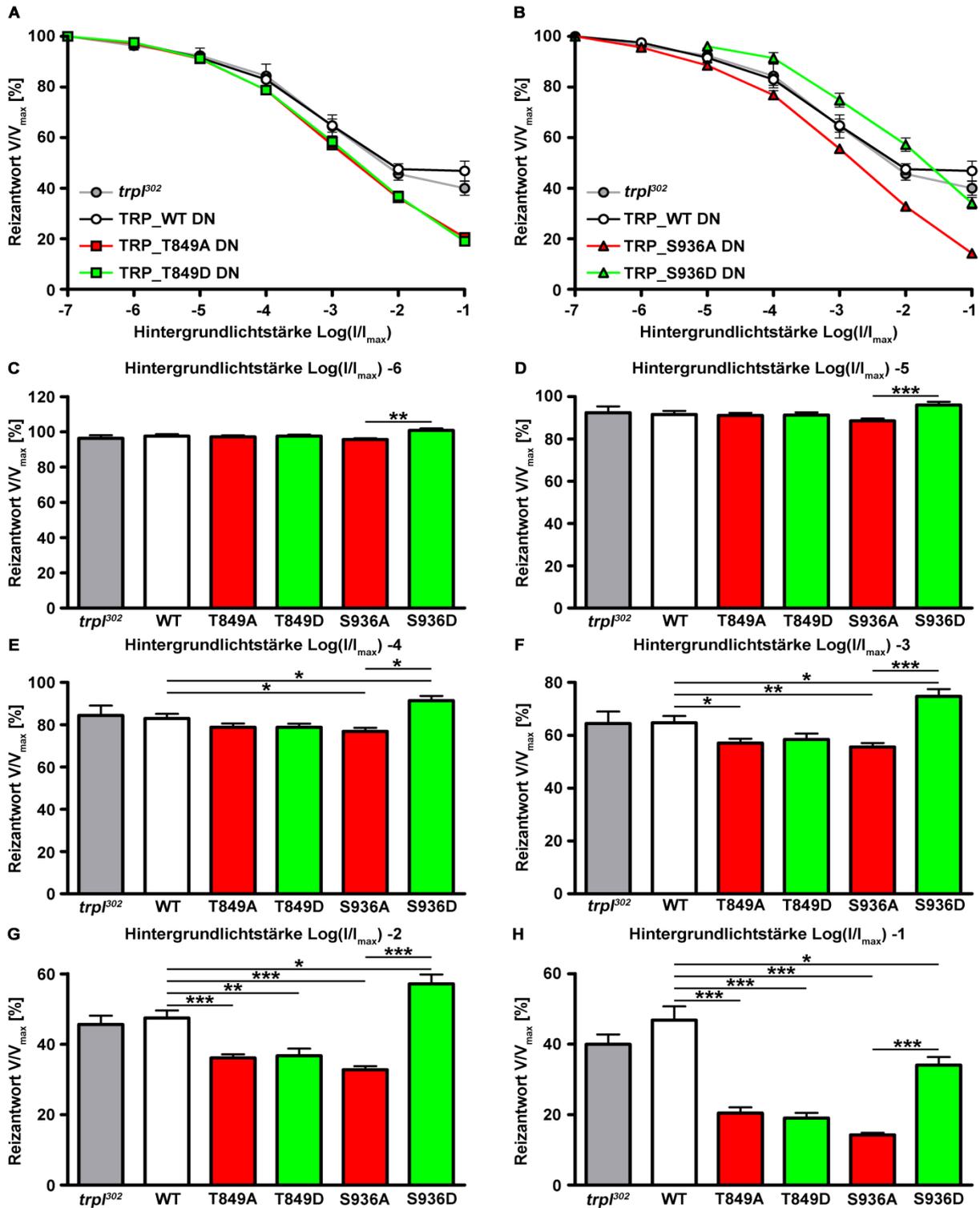
**Abbildung 6.34** Adaptation der transgenen *trp*-Mutanten mit TRPL: Gezeigt sind die Messungen zur Adaptationsfähigkeit der transgenen TRP-Mutanten in **A** für TRP\_T849A (rote Quadrate) und TRP\_T849D (grüne Quadrate) und in **B** für TRP\_S936A (rote Dreiecke) und TRP\_S936D (grüne Dreiecke) mit jeweils der Kontrolle TRP\_WT (weiße Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen drei Minuten dunkeladaptiert und nach 30-sekündiger Hintergrundbelichtung ( $\text{Log}(I/I_{max})$ ) einem fünf Sekunden andauernden Orangelicht-Stimulus ausgesetzt. Die daraus resultierende Reizantwort ( $V/V_{max}$ ), die auf die maximale Reizantwort bei minimalem Hintergrundlicht ( $V_{max}$ ) normiert wurde (in Prozent), wurde dann gegen die Hintergrundlichtstärke ( $\text{Log}(I/I_{max}) = -7; -6; \dots; -1$ ) aufgetragen ( $n = 9$ ; TRP\_S936A:  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardfehler). **C-H**: Reizantworten, normiert auf die maximale Reizantwort bei minimalem Hintergrundlicht, aller transgenen Mutanten und der Wildtypkontrolle bei unterschiedlicher Hintergrundbeleuchtung ( $\text{Log}(I/I_{max}) = -6; \dots; -1$ ) auf einen fünf Sekunden andauernden maximalen Lichtreiz ( $n = 9$ ; TRP\_S936A:  $n = 6$ ;  $\pm$  Standardabweichung; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse

Für die transgenen Mutanten ohne TRP stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied in der Adaptationsfähigkeit der beiden Mutanten TRP\_T849A DN und TRP\_T849D DN untereinander gab, egal wie stark die Hintergrundbeleuchtung bei den Messungen eingestellt war (Abb. 6.35A). Die Mutante TRP\_T849A DN zeigte aber bereits bei einer Hintergrundbelichtung von der 0,001 fachen Stärke des Reizlichtes eine verschlechterte Adaptation, also eine geringere Reizantwort auf das Reizlicht im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.35F), die bei stärker werdendem Hintergrundlicht immer schlechter wurde (Abb. 6.35F-H). Dagegen kam es bei der Mutante TRP\_T849D DN erst ab einer Hintergrundbeleuchtung von der 0,01 fachen Stärke des Reizlichtes zu einer Verschlechterung der Adaptation (Abb. 6.35G), die dann aber auch, genau wie bei der Mutation nach Alanin, mit stärker werdendem Hintergrundlicht schlimmer wurde (Abb. 6.35I).

Die Veränderungen der Adaptationsfähigkeit bei der Mutanten der Phosphorylierungsstelle S936 zeigten sich als deutlich drastischer als die Mutationen der Phosphorylierungsstelle T849. Bereits bei der sehr geringen 0,000001 fachen Hintergrundlichtstärke (im Vergleich zur Reizlichtstärke) zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Mutanten TRP\_S936A DN und TRP\_S936D DN, wobei die Mutante TRP\_S936A DN eine schlechtere und die Mutante TRP\_S936D DN eine bessere Adaptation als der Wildtyp aufwies (Abb. 6.35C). Dieser Unterschied setzte sich anschließend bei allen Hintergrundbeleuchtungsstärken fort. Dieser Phänotyp verstärkte sich sogar dahingehend, dass ab einer Hintergrundbeleuchtung von der 0,0001 fachen Stärke des Reizlichtes sich die Mutanten nicht nur untereinander unterschieden, sondern auch vom Wildtyp. Die Mutante TRP\_S936A DN zeigte jetzt eine schlechtere Adaptation gegenüber dem Wildtyp und die Mutante TRP\_S936D DN wiederum eine deutlich bessere Adaptation als der Wildtyp (Abb. 6.35E). Diese Bild setzte sich auch bei stärker werdendem Hintergrundlicht (bis  $\text{Log}[I/I_{\text{max}}]-2$ ) fort. Erst bei maximaler Hintergrundbeleuchtung stellte sich eine weitere Änderung ein. Jetzt zeigte auch die Mutante TRP\_S936D DN, die bis dahin immer eine bessere Adaptation gezeigt hatte, ebenfalls eine schlechtere Adaptation im Vergleich zum Wildtyp, wobei sie aber immer noch besser adaptiert als die Mutante TRP\_S936A (Abb. 6.35H).

## Ergebnisse

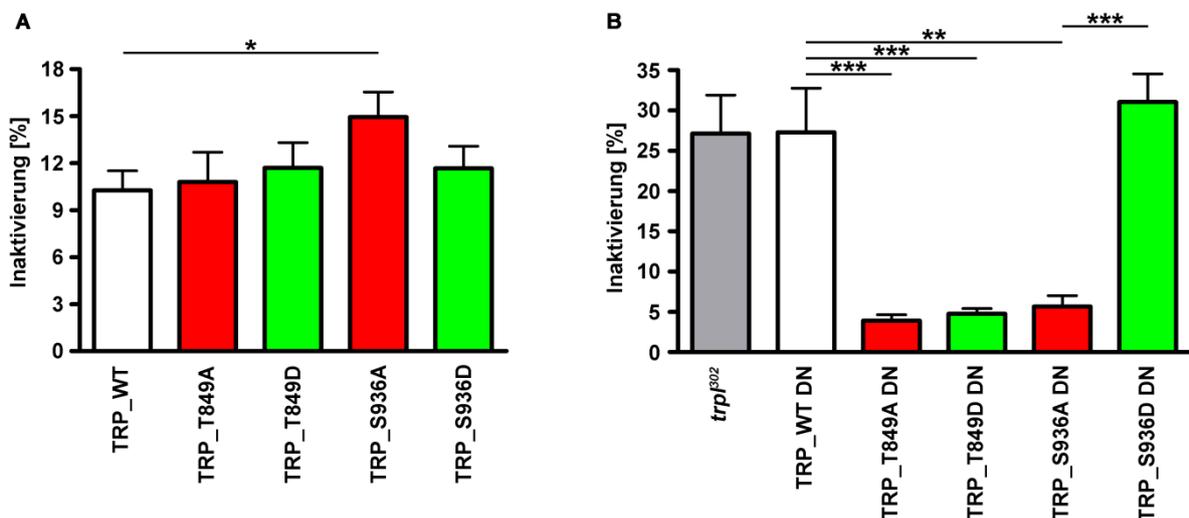


**Abbildung 6.35** Adaptation der transgenen *trp*-Mutanten ohne TRPL: Gezeigt sind die Messungen zur Bestimmung der Adaptation der transgenen TRP-Mutanten in **A** für TRP\_T849A DN (rote Quadrate) und TRP\_T849D DN (grüne Quadrate) und in **B** für TRP\_S936A DN (rote Dreiecke) und TRP\_S936D DN (grüne Dreiecke) mit jeweils den Kontrollen TRP\_WT DN (weiße Kreise) und der TRPLnull-Mutante (graue Kreise). Hierfür wurden die angegebenen Fliegen drei Minuten dunkeladaptiert und nach 30-sekündiger Hintergrundbelichtung ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}})$ ) einem fünf Sekunden andauernden Orangelicht Stimulus ausgesetzt. Die daraus resultierende Reizantwort ( $VV_{\text{max}}$ ), die auf die maximale Reizantwort bei minimalem Hintergrundlicht ( $V_{\text{max}}$ ) normiert wurde (in Prozent), wurde dann gegen die Hintergrundlichtstärke ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -7; -6; \dots; -1$ ) aufgetragen ( $n = 9; \pm$  Standardfehler). **C-H**: Reizantworten, normiert auf die maximale Reizantwort bei minimalem Hintergrundlicht, aller transgenen Mutanten und der Wildtypkontrolle bei unterschiedlicher Hintergrundbeleuchtung ( $\text{Log}(I/I_{\text{max}}) = -6; \dots; -1$ ) auf einen fünf Sekunden andauernden maximalen Lichtreiz ( $n = 9; \pm$  Standardfehler; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 6.6.4 Ermittlung der Inaktivierung während eines Lichtreizes aller transgenen *trp*-Mutanten

Als Nächstes wurde die Inaktivierung, die Prozentrate, um die die Amplitude der Reizantwort noch während des fünfsekündigen Orangelichtreizes zurückgeht, der transgenen TRP-Kanäle im Vergleich zur Wildtypkontrolle bestimmt. Dafür wurden die zu messenden Fliegen vor jeder Messung drei Minuten dunkel adaptiert und anschließend für fünf Sekunden einem Orangelichtreiz ausgesetzt.

Die TRP-Mutanten mit TRPL für die Stelle T849 zeigten dabei keine Änderung im Inaktivierungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp, während die TRP-Mutation der Stelle S936 zu Alanin eine signifikant stärkere Inaktivierung zur Folge hatte (Abb. 6.36A).

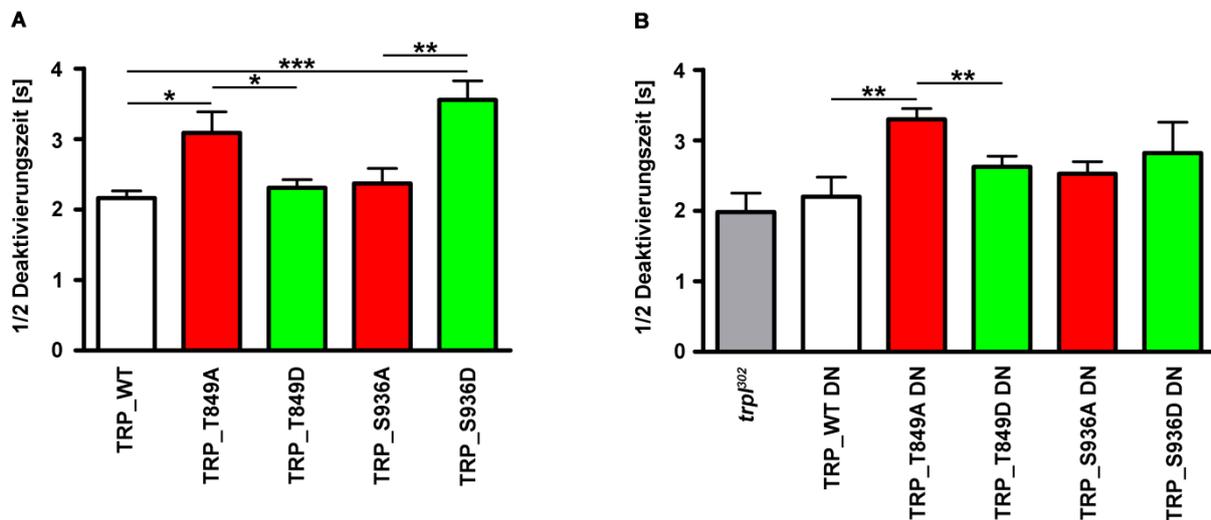


**Abbildung 6.36 Inaktivierung aller mutierten *trp*-Mutanten:** Gezeigt ist der Rückgang der ERG-Amplitude während eines fünf Sekunden andauernden Orangelichtreizes in Relation zur maximalen Amplitude aller hergestellten TRP-Mutanten. In roten Balken markieren die Mutationen nach Alanin, während die grünen Balken die Mutationen nach Asparaginsäure markieren. **A:** Inaktivierung der TRP-Mutanten mit TRPL. **B:** Inaktivierung der TRP-Mutanten ohne TRPL (n = 9; ± Standardfehler; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

Bei den TRP-Mutanten ohne den TRPL-Kanal zeigte sich, dass die Mutanten TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN und TRP\_S936A DN fast keine Inaktivierung mehr aufweisen, die dann auch signifikant unterschiedlich zur Wildtyp-Kontrolle war. Die Signalabnahme in diesen Mutanten betrug nur noch etwa 5 % während des fünf Sekunden andauernden Orangelichtreizes, während die normale wildtypische Abnahme bei ca. 27 % lag. Interessanterweise zeigte die Mutante TRP\_S936D DN diesen Phänotyp nicht, sie zeigte eine wildtypische Inaktivierung, die sich daher deutlich von der Inaktivierung der anderen S936er Mutation nach Alanin unterschied (Abb. 6.36B).

### 6.6.5 Bestimmung der halben Deaktivierungszeit aller transgenen *trp*-Mutanten

Zuletzt wurde noch die Deaktivierung in den transgenen Fliegen ermittelt. Hierzu wurde die halbe Deaktivierungszeit des ERGs nach einer Orangebelichtung von 500 Millisekunden bestimmt (siehe 5.6.2.1).



**Abbildung 6.37** Halbe **Deaktivierungszeit** aller transgenen *trp*-Mutanten: Gezeigt ist die halbe Deaktivierungszeit der transgenen TRP-Kanäle nach einer 500 Millisekunden andauernden Orangeleuchtung. ½ Deaktivierungszeit des transgenen TRP-Kanals mit den Mutationen an der Stelle T849 oder S936 nach Alanin (in Rot) oder nach Asparaginsäure (in Grün). (n = 9; ± Standardfehler; \*: p < 0,05).

Hierbei führte die Alanin-Mutation an der Stelle T849 zu einer verlängerten halben Deaktivierungszeit, egal ob der TRPL-anal exprimiert wurde oder nicht (Abb. 6.37A und B), genauso, wenn auch nicht so stark, wie bei der *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante, die keine Proteinkinase C mehr besitzt (Abb. 6.11). Diese verlängerte Deaktivierung zeigte sich nicht nur im Vergleich zur Wildtypkontrolle, sondern auch im Vergleich zur Asparaginsäure-Mutation, die ihrerseits wiederum keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte und auch hier wieder egal ob TRPL in den Fliegen exprimiert wurde oder nicht (Abb. 6.37A und B). Bei der Mutation der Phosphorylierungsstelle S936 nach Asparaginsäure kam es, genau wie bei der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante, der die Phosphatase RDGC fehlt, zu einer verlängerten Deaktivierung nach dem Lichtreiz im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier zeigte sich, wie an der Stelle T849, ein Unterschied zwischen den beiden Mutationen nach Alanin und Asparaginsäure. Dieser Unterschied war aber nur in den Mutanten mit TRPL-Kanal zu beobachten (Abb. 6.37A). Entfernte man den TRPL-Kanal aus den Mutanten, verschwand dieser Phänotyp wieder (Abb. 6.37B).

### 6.6.6 Zusammenfassung der ERG-Ergebnisse aller transgenen *trp*-Mutanten

Zum Abschluss werden hier nochmal tabellarisch die ERG-Ergebnisse zusammengefasst. In Tabelle 6.6 sind die Fliegen zusammengefasst, bei denen der TRP-Kanal an der Stellen T849 oder S936 nach Alanin (TRP\_T849A oder TRP\_S936A) oder nach Asparaginsäure (TRP\_T849D oder TRP\_S936A) mutiert wurde und die neben diesem mutierten Kanal auch noch den nativen TRPL-Kanal exprimierten. Angegeben ist, ob sich ein Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle (TRP\_WT) gezeigt hatte (\*, \*\* oder \*\*\* rot unterlegt) oder eben nicht (n. s.).

	TRP_T849A	TRP_T849D	TRP_S936A	TRP_S936D
Reiz-Antwort-Kurve (Steigung)	*	n. s.	*	n. s.
Reiz-Antwort-Kurve (-LogEC50)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Refraktärzeit	* (60 s) ** (90 s)	* (20 s, 30 s, 60 s)	* (30 s) ** (10 s, 20 s, 60 s, 90 s)	* (30 s,) *** (60 s, 90 s)
Adaptation Log(I/I <sub>max</sub> )	* (-6) ** (-5, -3) *** (-4, -2, -1)	* (-6, -5) *** (-4, -3, -2, -1)	* (-3) ** (-6, -4) *** (-5)	*** (-6, -5, -4, -3, -2)
Inaktivierung	n. s.	n. s.	*	n. s.
Deaktivierung	*	n. s.	n. s.	*

**Tabelle 6.6:** Zusammenfassung der ERG-Ergebnisse der transgenen *trp*-Mutanten TRP\_T849A, TRP\_T849D, TRP\_S936A und TRP\_S936D im TRPnull-Hintergrund im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle TRP\_WT (n. s.: nicht signifikant  $p > 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Tabelle 6.7 zeigt zusammengefasst die transgenen *trp*-Mutanten, mit einer Mutation nach Alanin oder Asparaginsäure an den Stelle T849 oder S936 des TRP-Kanals und denen zusätzlich noch der TRPL-Kanal entfernt wurde (TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN, TRP\_S936A DN oder TRP\_S936D DN). In rot markiert sind alle signifikanten Unterschiede (\*, \*\* oder \*\*\*) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle, der hier ebenfalls der TRPL-Kanal entfernt wurde (TRP\_WT DN). Nicht signifikante Unterschiede (n.s.) wurden weiß belassen.

## Ergebnisse

	TRP_T849A DN	TRP_T849D DN	TRP_S936A DN	TRP_S936D DN
Reiz-Antwort-Kurve (Steigung)	**	**	*	n. s.
Reiz-Antwort-Kurve (-LogEC50)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Refraktärzeit	* (10 s)	* (10 s)	* (10 s, 60 s)	n.s.
Adaptation Log(I/I <sub>max</sub> )	* (-3) *** (-2, -1)	** (-2) *** (-1)	* (-4) ** (-3) *** (-2, -1)	* (-3, -2, -1)
Inaktivierung	***	***	**	n. s.
Deaktivierung	**	n. s.	n. s.	n. s.

**Tabelle 6.7:** Zusammenfassung der ERG-Ergebnisse der transgenen *trp*-Mutanten TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN, TRP\_S936A DN und TRP\_S936D DN ohne den TRPL-Kanal im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle ebenfalls ohne TRPL-Kanal TRP\_WT DN (n. s.: nicht signifikant  $p > 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

## 7 Diskussion

### 7.1 Screen zur Identifizierung von Kinasen und Phosphatasen des TRP-Kanals in *Drosophila melanogaster*

Die Phosphorylierung eines Proteins ist einer der wichtigsten Regulationsmechanismen, den eukaryotische Zellen entwickelt haben. Auch die visuelle Signaltransduktionskaskade unterliegt diesem Regulationsmechanismus, da sich zum Beispiel Rhodopsin ohne die Dephosphorylierung nicht wieder in seinen inaktiven und aktivierbaren Zustand zurückführen lässt, der verhindert, dass der Photorezeptor degeneriert (Alloway et al., 2000; Steele and O'Tousa, 1990; Vinos, 1997). Es ist bereits bekannt, dass auch der TRP-Kanal einer massiven posttranslationalen Phosphorylierung unterliegt, was sowohl *in vitro* (Huber et al., 1996b; Liu et al., 2000) als auch *in vivo* (Popescu et al., 2006; Voolstra et al., 2010a; Voolstra et al., 2013) gezeigt werden konnte. Wie wichtig die Regulation des TRP-Kanals durch Phosphorylierung ist, darüber ist noch nicht viel bekannt. Es wird aber spekuliert, dass die ePKC den TRP-Kanal durch Phosphorylierung deaktiviert (Popescu et al., 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Teil dieser Wissenslücke zu schließen. Dafür wurde ein Screen nach Kinasen und Phosphatasen durchgeführt, der die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 849, die in einer ePKC Konsensus-Sequenz liegt und in der Massenspektrometrie eine signifikante lichtabhängige Phosphorylierung gezeigt hat, der Aminosäure Threonin 864, die ebenfalls eine sehr starke lichtabhängige Phosphorylierung im Hellen zeigt, aber nicht in eine PKC Konsensus-Sequenz eingebettet ist und die einzige lichtabhängige aber vornehmlich im Dunkeln phosphorylierte Aminosäure Serin 936 als Substrat haben, aufklärt. Für die Durchführung des Screen wurden drei phosphospezifische Antikörper verwendet, die gegen die phosphorylierten Aminosäuren Threonin 849, Threonin 864 oder Serin 936 gerichtet sind (Voolstra et al., 2010a; Voolstra et al., 2013). Diese phosphospezifischen TRP-Antikörper und der panspezifische TRP-Antikörper, der zur Bestimmung des TRP-Gehaltes benutzt wurde, wurden einer Validierung unterzogen, die ihre Linearität bei einer Westernblotanalyse nachwies (Abb. 6.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten für 53 Kinasen, 25 Phosphatasen und sechs mutmaßliche Regulatoren von Phosphorylierungen untersucht, die eine deutliche Expression im Auge von *Drosophila melanogaster* zeigen ([www.flyatlas.org](http://www.flyatlas.org)). Es wurden insgesamt sieben Kinasen und zwei Phosphatasen gefunden, die die Phosphorylierung des TRP-Kanals beeinflussen. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Änderungen der Phosphorylierungsniveaus der untersuchten Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936, die die neun identifizierten Mutanten zeigten, auf eine eventuelle Mislokalisierung des TRP-Kanals zurückzuführen ist, da in allen Mutanten, in denen das Phosphorylierungsniveau an

einer der untersuchten Stellen im Vergleich zum Wildtyp verändert war, das TRP korrekt im Rhabdomer lokalisiert war (Abb. 6.3). Dieser Test ist von großer Bedeutung, da bereits für andere TRP-Kanäle gezeigt werden konnte, dass zum Beispiel der Wachstumsfaktor Rac1 die Lokalisation der TRPM6-Kanals beeinflusst (Thebault et al., 2009). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen einer Kinase oder Phosphatase nicht auch einen Einfluss auf zum Beispiel Wachstumsfaktoren des *Drosophila melanogaster* TRP-Kanals oder der Transportproteine hat, die den TRP-Kanal zum Rhabdomer transportieren, was dann wiederum dessen Lokalisation beeinflusst.

### 7.1.1 Die Kinasen der Phosphorylierungsstelle T849

Die Mutanten der vier Kinasen ePKC, PKC53E(br), Rolled (MAPK) und die AMPK $\alpha$  zeigen eine veränderte Phosphorylierung an der überwiegend im Hellen phosphorylierten Stelle T849 (Abb. 6.2A), wobei das Fehlen der Kinasen ePKC und PKC53E(br) zu einer verringerten Phosphorylierung der vorwiegend im Hellen phosphorylierten Stelle T849 des TRP-Kanals führte und das Fehlen der Kinasen Rolled und AMPK $\alpha$  zu einer Erhöhung des selbigen.

Bei der Augen-Proteinkinase C (ePKC) kann davon ausgegangen werden, dass sie direkt die Phosphorylierung der Stelle T849 beeinflusst, da bereits *in vitro* Experimente gezeigt haben, dass die ePKC den TRP-Kanal phosphoryliert (Huber et al., 1996b; Liu et al., 2000), wobei aber zu beachten ist, dass eine lichtabhängige Restphosphorylierung noch zu beobachten war, die von mindestens einer weiteren Kinase generiert werden muss.

Da die PKC53E(br) eine sehr ähnliche Konsensus-Sequenz wie die ePKC aufweist (Schaeffer et al., 1989b), kann davon ausgegangen werden, dass auch die PKC53E(br) den TRP-Kanal direkt phosphoryliert, was nahe legt, dass diese Kinase die lichtabhängige Restphosphorylierung in der *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante generiert. Da die PKC53E(br) genau wie die ePKC auch calciumabhängig arbeitet (Rosenthal et al., 1987), würde das auch die Lichtabhängigkeit der Restphosphorylierung erklären, die die *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante noch zeigte, da nur durch die Aktivierung der Phototransduktionskaskade Calcium in den Photorezeptor einströmt und die PKCs aktivieren kann (Huber et al., 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante mit PKC53E(br)-RNAi „Knock down“ (auch PKC-Doppelnullmutante genannt) zeigte keine lichtabhängige Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T849 mehr, was die aufgestellte Hypothese bestätigt und daraufhin deutet, dass nur die beiden PKCs, die ePKC und die PKC53E(br), den TRP-Kanal an der Stelle T849 lichtabhängig phosphorylieren. Elektrophysiologisch zeigten sich keine Unterschiede zwischen der *inaC<sup>P209</sup>*- und der PKC-Doppelnullmutante, wenn man die rotäugige PKC-Doppelmutante mit einer rotäugigen *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante verglich, wobei die roten Augen durch den im transgenen *gmr>gal4*-Treiberstamm enthaltenen *vermillion*-Marker entstanden, dessen Defekt im *vermillion*-Gen dazu führt, dass rubinrote Augen ausgebildet

werden (Abb. 6.10 rote Balken). Es ist notwendig bei diesen Untersuchungen, Fliegen mit derselben Augenfarbe zu verwenden. Vergleicht man nämlich rotäugige *Drosophila melanogaster* Wildtypen (Oregon R; Abb. 6.10H) mit weißäugigen *white*- (Oregon R (*w*); Abb. 6.10D) oder *yellow, white* (*yw*)-Mutanten (Abb.6.10C), so zeigt sich, dass das rote Schirmpigment in den Fliegenaugen einen erheblichen Einfluss auf das elektrophysiologische Verhalten der Fliege hat. Rotäugige Fliegen bildeten nach einer Belichtung mit blauem Licht kein PDA aus (Minke et al., 1975b) und zeigten eine deutlich kürzere Deaktivierungszeit, was sich auch im Vergleich zwischen einer rotäugigen und einer weißäugigen *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante zeigte (Abb. 6.11). Die rotäugige *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante und die ebenfalls rotäugige PKC-Doppelnulmutante zeigten den üblichen „*ina*“-Phänotyp (Pak et al., 1969), nämlich eine drastisch verlängerte Deaktivierungszeit mit ausbleibenden „*off*“-Transienten, während die *pkc53E(br)*-Mutante alleine keine Auffälligkeiten im ERG zeigte (Abb. 6.10).

Die Mutante für *rolled* zeigte, wie auch die Mutante für die AMPK $\alpha$ , ein deutlich erhöhtes Phosphorylierungsniveau an der Stelle T849, was bei beiden Kinasen dafür spricht, dass es sich hier um eine indirekte Einflussnahme handelt, da das Fehlen einer Kinase, die den TRP-Kanal direkt phosphoryliert, zu einer verringerten Phosphorylierung führen würde. Für die Mutante der MAP-Kinase Rolled, kodiert durch das Gen *rolled*, konnte unter anderem gezeigt werden, dass sie RNA-Bindeproteine phosphorylieren kann (Nir et al., 2012) und somit eine posttranskriptionale Regulation bewirken könnte, die eine negative Auswirkung auf die Expressionsstärke von der für die Phosphorylierungsstelle T849 zuständigen Phosphatase haben könnte, wodurch das Phosphorylierungsgleichgewicht sehr stark zur phosphorylierten Form hin verschoben werden würde, was dann wiederum zu der beobachteten verstärkten Phosphorylierung führen würde.

Der untersuchten *ampk $\alpha$* -Mutante fehlt die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), eine heterotrimer aufgebaute Kinase aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit (Riek et al., 2008), die sehr wichtig für den Energiehaushalt der Zellen in *Drosophila melanogaster* ist. Die AMPK reguliert den Energiehaushalt der Zelle durch Detektion eines steigenden AMP-Gehaltes, hervorgerufen durch vermehrte ATP-Hydrolyse der Zelle, also einen verstärkten Energieverbrauch, wodurch die AMPK aktiviert wird und verschiedene Proteine durch Phosphorylierung reguliert werden, die den Energiehaushalt der Zelle direkt beeinflussen, wie zum Beispiel die Acetyl-CoA-Carboxylase (Pan and Hardie, 2002). Es könnte also gut sein, dass im Auge von *Drosophila melanogaster* eine nicht mehr korrekt funktionierende AMPK dazu führt, dass bei erhöhtem Energiebedarf der Zelle, was in Photorezeptorzellen bei einer angeschalteten Phototransduktionskaskade durch andauernde Beleuchtung durchaus der Fall ist, keine Prozesse mit erhöhtem Energiebedarf mehr zurückgefahren werden können, wie zum Beispiel die andauernde, durch die

Dauerbelichtung hochgefahren und sie energieraubende visuelle Signaltransduktion, was eine andauernde bzw. erhöhte PKC-Aktivität zur Folge haben könnte, die sich wiederum im gezeigten erhöhten Phosphorylierungsniveau an der PKC-Phosphorylierungsstelle T849 widerspiegeln würde.

Dass keine Phosphatase gefunden wurde, die diese Stelle dephosphoryliert, könnte daran liegen, dass mehrere Phosphatasen diese Stelle dephosphorylieren. Wenn eine davon ausfällt, springt eine andere ein und übernimmt die Funktion der ausgefallenen Phosphatase. Dies würde bedeuten, dass die Phosphorylierung der Stelle T849 vorwiegend über die Aktivität der beiden PKCs (ePKC und PKC53E(br)) reguliert wird, da es ineffizient wäre, eine Regulierung zu etablieren, die zusätzlich noch über mehrere Phosphatasen funktioniert, wenn es schon einen so einfachen Mechanismus über den lichtabhängigen Calciumeinstrom gibt, der wiederum die ePKCs reguliert. Hierbei ist es vorstellbar, dass die Regulierung über calciumabhängige Phosphatasen geregelt werden könnte. Sie würden aber ohne Belichtung und den damit zusammenhängenden Calciumeinstrom nicht funktionieren, was die Dephosphorylierung im Dunkeln nicht erklären würde. Trotzdem zeigte eine Überexpression der Phosphatase RDGC keine lichtabhängige Phosphorylierung mehr an der Stelle T849. Mehr noch sie zeigte fast gar keine Phosphorylierung mehr, was aber natürlich auch an der unspezifischen Dephosphorylierung von Phosphatasen liegen kann oder aber auch daran, dass das Phosphorylierungs-Gleichgewicht durch die übermäßige Expression von RDGC zur Dephosphorylierung hin verschoben worden ist (Abb. 6.13A). Ein trivialer Grund, warum die Phosphatase für die Stelle T849 nicht identifiziert werden konnte, könnte der sein, dass sie nicht getestet wurde, da ihre Existenz noch nicht bekannt war, keine Nullmutante dieser Phosphatase verfügbar war oder die Phosphatase-Mutante homozygot Letal war und daher nur heterozygot untersucht wurde, wobei dann aber ein Allel ausreicht, um die Phosphataseaktivität voll oder zu mindestens ausreichend zu gewährleisten, so dass die getesteten Phosphatasen die Auswahlkriterien für eine weitere Untersuchung nicht mehr erfüllten. Es könnte auch sein, dass die gesuchte Phosphatase mittels „Knock down“ durch zum Beispiel RNAi herunterreguliert werden sollte und dieser Vorgang nicht korrekt funktioniert hat, wie man auch an dem in dieser Arbeit durchgeführten Treiberstammtest mit den zwei unterschiedlichen *pkc53e*RNAi-Konstrukten sehen konnte (Abb. 6.7). Bei dem führte nur einer der Gal4 getriebenen RNAi „Knock downs“ zu einer reduzierten Phosphorylierung an der Stelle T849, der dem Phosphorylierungsrückgang der PKC53E-Nullmutante entsprach. Das war auch nur unter dem extrem starken und sehr früh in der Augenentwicklung eingeschalteten *gmr*-Promoter möglich. Ein weiterer Grund könnte aber auch die Schwankungen in der Westernblotanalyse nach der ersten Screen-Runde sein, wodurch die Phosphatase die Kriterien für eine weitere Untersuchung nicht erfüllt hatte, also

kein 50 % schwächeres oder um 200 % erhöhtes Phosphorylierungsniveau im Vergleich zum Wildtyp aufwies, obwohl sie es normalerweise erfüllen würde.

### 7.1.2 Die Kinasen und Phosphatasen der Phosphorylierungsstelle T864

Die Mutanten für die Caseinkinase  $1\alpha$  (Ckl $\alpha$ ), die Kinasen Licorne und Tao-1 sowie die Diesterase Metallophosphoesterase (MPPE) zeigten alle an der größtenteils im Hellen phosphorylierten Stelle T864 alle ein deutlich verringertes Phosphorylierungsniveau im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6.2B).

Die Caseinkinase  $1\alpha$  wird schon während der frühen Embryogenese durch Phosphorylierung reguliert und wird durch  $\gamma$ -Strahlung bzw. durch die daraus resultierenden DNA-Schäden aktiviert (Santos et al., 1996). In adulten Fliegen konnte gezeigt werden, dass die CKI $\alpha$  das Protein Armadillo phosphoryliert, was anschließend zu dessen Degradation führt und somit den Wnt-Signalweg beeinflusst, der wiederum für die Aktivierung vieler Gene verantwortlich ist (Yanagawa et al., 2002). Das könnte dazu führen, dass es bei einer Mutante ohne CKI $\alpha$  nicht zu einem Abbau von Armadillo kommt, was wiederum dazu führt, dass der  $\beta$ -Catenin-Komplex des Wnt-Signalwegs intakt bleibt und es somit nicht zur Expression der Kinase für die Stelle T864 des TRP-Kanals kommt, was dort zu einer verringerten Phosphorylierung führen würde, wie es die *ckl $\alpha$ <sup>EP1555</sup>*-Mutante auch zeigte (Abb. 6.2B).

Von der Kinase Licorne, einer *Drosophila* MAP-Kinase Kinase (MAPKK), ist bekannt, dass sie schon bei der Entwicklung im Ei von *Drosophila melanogaster* aktiv ist, sie die MAP-Kinase p38 phosphoryliert und dadurch aktiviert und ein Fehlen von Licorne zu Zellpolaritätsdefekten führt (Nebreda and Porras, 2000). Die Beeinflussung von MAP-Kinase-Signalwegen kann, wie schon für *rolled*<sup>1</sup> beschrieben, zu Veränderungen in der Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren führen, was bewirken kann, dass die Kinase, die für die Stelle T864 des TRP-Kanals zuständig ist, nicht oder weniger stark exprimiert wird und es somit in der *licorne*<sup>G0252</sup>-Mutante zu dem beobachteten verringerten Phosphorylierungsniveau an der Stelle T864 im Vergleich zum Wildtyp kam (Abb. 6.2B).

Man weiß von der Kinase Tao, deren Mangel ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung an der Stelle T864 nach sich zieht, dass sie die MAP-Kinase Par-1 durch Phosphorylierung aktiviert und diese wiederum das mikrotubulistabilisierende Protein Tau phosphoryliert. Es ist also nicht weiter verwunderlich, dass es in der für diesen Screen untersuchten *tao*<sup>EP1455</sup>-Mutante zu morphologischen Defekten im Gehirn kommt, da der stabilisierende Effekt von Tau reduziert ist (King et al., 2011; Timm et al., 2006). Dieser Defekt an sich könnte schon einen Effekt auf einige Prozesse im Auge haben, da das Auge entwicklungsbiologisch dem Gehirn zugehörig ist, was dann auch zu einer gestörten und in diesem Falle verringerten Phosphorylierung an der Stelle T864 führen könnte. Dafür spricht auch, dass die *tao*<sup>EP1455</sup>-

Mutante keine „on“- und „off“-Transienten zeigte (Abb. 6.4H), die im ersten optischen Ganglion, der Lamina, generiert werden, einem Teil des Gehirns von *Drosophila melanogaster* (Alawi and Pak, 1971; Eichenbaum and Goldsmith, 1968). Interessanterweise zeigte die Mutante für die MAP-Kinase Par-1 diesen Effekt nicht, was daran liegen könnte, dass in dieser Mutante auch noch das Gen *mei-W68*, welches in der für *par-1* kodierenden Gensequenz liegt, in der auch die Mutation für *par-1* lokalisiert ist, mutiert war. *Mei-W86* ist notwendig für die meiotische Rekombination in *Drosophila melanogaster* (Abou Tayoun, Ahmad N et al., 2011) und das Fehlen dieses Topoisomerase-II-Enzyms könnte einen Effekt auf das gesamte Genom der Fliege haben könnte, was wieder die Expression einzelner Gene beeinflussen könnte, die wieder einen Effekt auf Kinasen oder Phosphatasen haben könnten, die das Fehlen von Par-1 maskieren. Eine einfachere Erklärung aber ist, dass die P-Elementinsertion dieser Mutante keinen vollständigen Funktionsverlust von Par-1 hervorruft und somit das Phosphorylierungsniveau nicht bzw. nicht genug beeinträchtigt wurde, um die 50 % Phosphorylierungsniveauschwelle zu unterschreiten, die notwendig war, um eine genauere Untersuchung zu rechtfertigen.

Die Metallophosphoesterase (MPPE), deren Fehlen ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung an der Stelle T864 zur Folge hatte (Abb. 6.2B), ist notwendig, um Rhodopsin während des Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Rhabdomer zu deglykosylieren und um den reibungslosen Transport des Rhodopsins zu gewährleisten, da es ohne die Deglykosylierung zu Verzögerungen im Transport kommt (Cao et al., 2011; Satoh et al., 1997). Interessanterweise ist die MPPE gar keine Esterase sondern eine Phosphatase, die die Deglykosylierung von Rhodopsin durch die Dephosphorylierung der Esterase  $\alpha$ -Mannosidase-II initiiert. Daher kann man davon ausgehen, dass MPPE den TRP-Kanal nicht direkt dephosphoryliert, da das Fehlen einer Phosphatase, die den TRP-Kanal direkt dephosphoryliert, zu einem erhöhten Phosphorylierungsniveau im Licht und/oder im Dunklen führen würde. Die Glykosylierung vom unreifen Rhodopsin im ER scheint notwendig zu sein, da Fliegen, in denen die Glykosylierungsstelle mutiert wurde, einen deutlich niedrigeren Rhodopsingehalt aufweisen (Webel et al., 2000). Die Deglykosylierung hingegen ist für die normale Reizantwort des Rhodopsins nicht notwendig, sobald das Rhodopsin korrekt im Rhabdomer angekommen ist, da das reife und voll funktionsfähige Rhodopsin entweder eine stark verkürzte oder gar keine Oligosaccharid-Kette mehr aufweist (Huber et al., 1990; Katanosaka et al., 1998) und trotzdem korrekt funktioniert. Außerdem zeigten *mpe*-mutante Fliegen eine reduzierte Sensitivität auf Licht und bei älteren Fliegen führte der Mangel an MPPE zu morphologischen und funktionalen Störungen der Photorezeptorzellen (Cao et al., 2011). Die morphologischen Störungen der *mpe*-Mutanten waren aber nicht der Grund für die veränderte Phosphorylierung, da die verwendeten Mutanten nur ein bis fünf Tage alt waren und alle

verwendeten Mutanten noch eine Pseudopupille zeigten, was auf morphologisch intakte Photorezeptoren hindeutet. Der auffällige ERG-Phänotyp der *mpe*-Mutante, das ausbleibende PDA (Abb. 6.4I) und die schnellere halbe Deaktivierungszeit des ERGs (Abb. 6.6B) ist auf die roten Augen zurückzuführen, da alle rotäugigen Fliegen kein PDA ausbilden und sie auch immer eine schnellere Deaktivierungszeit im ERGs zeigen, wie man am Vergleich des rotäugigen Wildtyps (OrigenR) mit dem weißäugigen „Wildtypen“ mit *white*-Mutation (Origen R (w) oder *yellow, white*-Mutation (*yw*) sehen kann (Abb. 6.11). Es wurden zwar recht junge Fliegen für die Westernblotanalyse verwendet, es könnte aber sein, dass der geringere Rhodopsingehalt, verursacht durch die *mpe*-Mutation, eventuell eine gestörte Phosphorylierung des TRP-Kanals nach sich gezogen haben könnte.

Auch für diese Stelle konnte keine Phosphatase identifiziert werden, die diese Stelle direkt Dephosphoryliert, was auf die gleichen Gründe, wie sie bereits für die Phosphorylierungsstelle T849 diskutiert wurden, zurückzuführen sein wird.

### **7.1.3 Die potenzielle Phosphatase der Phosphorylierungsstelle S936**

Als möglicher Regulator für die einzige vorwiegend im Dunkeln phosphorylierte Stelle S936 wurde die Phosphatase RDGC identifiziert, deren Mutation eine Änderung im Phosphorylierungsniveau hervorgerufen hat. Die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante zeigte eine stärkere Phosphorylierung nach Belichtung als im Dunkeln, obwohl diese Phosphorylierungsstelle normalerweise gar keine Phosphorylierung nach Belichtung zeigt, sondern eigentlich nur im Dunkeln, wie an den Wildtypkopfextrakten auch gut zu erkennen ist (Abb. 6.2C).

In der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante kommt es nach Belichtung der Fliegen zum namensgebenden Phänotyp der „retinal degeneration“, der lichtabhängigen und zeitlichen Degeneration der Photorezeptorzellen. Ausgelöst wird dieser Defekt dadurch, dass das fehlende RDGC das phosphorylierte Rhodopsin nicht mehr dephosphoryliert (Steele et al., 1992; Steele and O'Tousa, 1990). Diese multiple Phosphorylierung des Rhodopsins führt zu einer erhöhten Affinität von Arrestin, das daraufhin irreversible Komplexe zusammen mit Rhodopsin ausbildet, die für die Degeneration verantwortlich sind (Alloway et al., 2000) .

RDGC gehört zu den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin Phosphatasen, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert werden (Lee and Montell, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jetzt gezeigt werden, dass RDGC nicht nur Rhodopsin dephosphoryliert, sondern möglicherweise auch den TRP-Kanal. Es hat sich gezeigt, dass es in der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante, die kein RDGC mehr exprimiert, nach Belichtung nicht mehr zu einer Dephosphorylierung des TRP-Kanals an der Stelle S936 kommt (Abb. 6.2C). Normalerweise führt eine Belichtung in *Drosophila melanogaster* zur Aktivierung der Phototransduktionskaskade, die final zu einem Einstrom von Calcium Ionen führt. Diese Calcium Ionen aktivieren daraufhin die

Phosphatase RDGC (Lee and Montell, 2001), die somit die Phosphorylierung an der Stelle S936 des TRP-Kanals entfernt. Die calciumabhängige Dephosphorylierung der Stelle S936 konnte auch *in vitro* an isolierten Augen von *Drosophila melanogaster*-Wildtypen gezeigt werden, die in calciumreichen und in calciumfreien Medium inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass es ohne Calcium zu keiner lichtabhängigen Dephosphorylierung an der Stelle S936 kommt, während es TRP-Kanälen an der Stelle S936 in isolierten Augen aber durchaus möglich ist, in einer Lösung mit Calcium bei Belichtung zu dephosphorylieren (Abb. 6.18). Diese beiden Ergebnisse zusammengenommen zeigen zum einen, dass es in der Mutante, der die calciumabhängige Phosphatase RDCG fehlt, nach Belichtung, also mit Calcium im Photorezeptor, zu keiner Dephosphorylierung mehr kommt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass es in isolierten Wildtypaugen *in vitro*, denen kein Calcium zur Verfügung gestellt wurde, durch eine Belichtung zu keiner Dephosphorylierung mehr kam. Dies lässt den Schluss zu, dass RDGC den TRP-Kanal direkt dephosphoryliert. Es gibt auch Hinweise darauf, dass RDGC an der Dephosphorylierung der anderen beiden Phosphorylierungsstellen zumindest beteiligt ist, da die Überexpression von RDGC zu keiner lichtabhängigen Phosphorylierung mehr an den vorwiegend im Hellen phosphorylierten Stellen T849 und T864 führte (Abb. 6.13A und B). Diese übermäßige Dephosphorylierung im Hellen kann aber auch darauf zurückgeführt werden, dass Phosphatasen bei weitem nicht so sequenzspezifisch arbeiten wie Kinasen und somit eine übermäßige Anwesenheit einer aktiven Phosphatase, wie der calciumabhängigen Phosphatase RDGC im Hellen der Fall, immer eine Dephosphorylierung von Proteinen nach sich ziehen kann (Mocciaro and Schiebel, 2010). Eine Überexpression der Phosphatase RDGC führte zu keinem Unterschied im Phosphorylierungsniveau der TRP-Phosphorylierungsstelle S936, da die Phosphatase RDGC ja bekanntlich im Dunkeln nicht aktiv ist, da kein oder nur sehr wenig Calcium im Photorezeptor vorhanden ist (Abb. 6.13C). Ein weiteres Indiz dafür das RDGC an der Dephosphorylierung der Stelle T864 beteiligt ist, dass die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante an der Stelle T864 ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau im Hellen bei einem Tag alten Fliegen und bei ein bis fünf Tage alten Fliegen ein tendenziell erhöhtes Phosphorylierungsniveau im Hellen und ein signifikant erhöhtes Phosphorylierungsniveau im Dunkeln aufwies. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Gleichgewicht, das zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung am TRP-Kanal herrscht und das im Hellen sowieso schon sehr in Richtung einer Phosphorylierung hin verschoben ist, noch mehr zur Phosphorylierung hin verschoben wird, wenn die Phosphatase, in diesem Fall RDGC, die im Hellen ebenfalls aktiv ist, nicht mehr vorhanden ist.

Die fehlende Dephosphorylierung der Phosphorylierungsstelle S936 in der *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante hat auch einen unmittelbaren Effekt auf das physiologische Verhalten des TRP-Kanals. Die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante zeigte im ERG, ebenso wie in der *inaC<sup>P209</sup>*-Mutante (Abb. 6.11A und B), der

ePKC-Nullmutante, die für die Phosphorylierung an der vorwiegend im Hellen phosphorylierten Stelle T849 hauptverantwortlich ist, eine deutlich verlängerte Deaktivierungszeit (siehe auch Vinós et al., 1997) und eine stärkere Inaktivierung des ERG-Signals während der fünfsekündigen Belichtungsphase (Abb. 6.15A und B), was darauf schließen lässt, dass die korrekte Phosphorylierung des TRP-Kanals wichtig für das Offenhalten bzw. für die Schließung des Kanals ist. Diese Effekte könnten aber auch auf die Hyperphosphorylierung von Rhodopsin zurückzuführen sein, obwohl bei den Experimenten darauf geachtet wurde, dass sehr junge Fliegen benutzt wurden, bei denen die Hyperphosphorylierung noch keine Degeneration des Photorezeptors nach sich gezogen hatte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Kinase identifiziert werden, die die Phosphorylierung der vorwiegend im Dunklen phosphorylierten Stelle S936 beeinflusst. Die Gründe dafür sind die gleichen wie für die nicht gefundenen Phosphatasen an den Stellen T849 und T864. Auch das Herunterregulieren oder Überexpressieren der naheliegenden G-Proteingekoppelten Rezeptorkinase 1 (GRPK1), die Kinase für Rhodopsin1, dessen Phosphorylierung durch die Phosphatase RDGC wieder entfernt wird, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Phosphorylierungsniveau an der Stelle S936 im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 6.3).

### **7.2 Einfluss der Phosphorylierung des TRP-Kanals an den Stellen T849 und S936 auf dessen physiologische Funktion**

Um zu prüfen, ob die beobachteten ERG-Defekte der *rdgC*<sup>306</sup>- und der *inaC*<sup>P209</sup>-Mutanten auf Defekte bei der Phosphorylierung des TRP-Kanals zurückzuführen sind, wurden Mutanten hergestellt, bei denen das Threonin an der Position 849, das durch ePKC bzw. PKC53E(br) phosphoryliert wird, gegen Alanin (TRP\_T849A) ausgetauscht wurde, um eine Phosphorylierung zu verhindern. Als Kontrolle dazu wurde außerdem eine transgene Fliege mit mutiertem TRP-Kanal hergestellt, der an dieser Stelle die Aminosäure Asparaginsäure trägt, die eine Phosphorylierung imitieren soll (TRP\_T849D), in der Annahme, dass eine Phosphomimese keinen Einfluss auf das elektrophysiologische Verhalten hat. Zur Abklärung des *rdgC*<sup>306</sup> ERG-Phänotyps wurde eine transgene Fliege hergestellt, bei der das Serin an der Position 936 gegen Asparaginsäure getauscht wurde, um für diese Stelle den Phosphorylierungsphänotyp der *rdgC*<sup>306</sup>-Mutante zu simulieren (TRP\_S936D). Als Kontrolle für diese Fliege wurde die bereits im Labor vorhandene transgene Fliege verwendet, bei der die Stelle S936 nach Alanin mutiert wurde, um eine Phosphorylierung an dieser Position zu verhindern (TRP\_S936A).

Um die Funktion des transgenen TRP-Kanals der mutierten Fliegen (TRP\_T849A, TRP\_T849D, TRP\_S936A oder TRP\_S936D) zu untersuchen, wurden Elektroretinogramme

dieser Fliegen erstellt und mit einer Kontrollfliege verglichen, bei der der TRP-Kanal ebenso wie bei den transgenen Fliegen auch, unter dem Rhodopsin 1 Promotor exprimiert wurde (TRP\_WT). Wenn man einen ersten Blick auf die OBBOO-Messungen (siehe Einleitung) wirft, sieht es so aus, als ob die Mutationen keinen physiologischen Effekt auf den TRP-Kanal haben, da alle transgenen Fliegen ein vergleichbares OBBOO-ERG zeigten. Es gab lediglich bei den Fliegen ohne den TRPL-Kanal Unstimmigkeiten. So zeigten sowohl die *trpl*<sup>302</sup>-Mutante als auch die Wildtyp-Kontrolle ohne TRPL (TRP\_WT DN) bei jedem neunten Lichtpuls eine sehr kurze aber dafür starke zusätzliche Depolarisation (Abbildung 6.29E und N). Diesen für Mutanten ohne den TRPL-Kanal scheinbar normalen Phänotyp zeigte von den transgenen Fliegen ohne TRPL-Kanal nur die Fliege mit dem mutierten TRP-Kanal von der Aminosäure 936 mit dem Austausch von Serin nach Asparaginsäure (Abbildung 6.29M). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass dieser Phänotyp nicht auf das Fehlen des TRPL-Kanals zurückzuführen ist, sondern auf den Defekt eines anderen Gens, das zufälligerweise bei der Herstellung der *trpl*<sup>302</sup>-Mutanten mit mutiert wurde (Cerny, unveröffentlicht). Dass die anderen transgenen *trp*-Mutanten mit *trpl*<sup>302</sup>-Mutation (TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN und TRP\_S936A DN) diesen Defekt nicht zeigten, ist mit der Herstellung dieser Fliegen zu erklären (MM), da bei diesen rekombiniert werden musste und so bei den Mutanten TRP\_T849A DN, TRP\_T849D DN und TRP\_S936A DN das defekte Gen, im Gegensatz zur TRP-Mutante TRP\_S936D, nicht mit rekombiniert wurde.

Bei genauerer Betrachtung der transgenen Fliegen mittels anderer ERG-Messprotokolle zeigten sich durchaus Auffälligkeiten, hervorgerufen durch die Mutation des TRP-Kanals. Die ermittelte Reiz-Antwort-Kurve der transgenen Fliegen zeigte zum Beispiel, dass alle transgenen Fliegen zunächst einmal auf eine ansteigende Signalintensität mit einer ansteigenden Reiz-Antwort in Form einer größer werdenden Amplitude im ERG reagierten (Abbildung 6.30 und 6.31). Es zeigten sich hier aber schon Unterschiede im sigmoidalen Verlauf der ermittelten Reiz-Antwort-Kurve im Vergleich zum Wildtyp (TRP\_WT). So ist die Steigung bei den Alanin-Mutanten deutlich niedriger als die Steigung beim Wildtyp und bei den Asparaginsäure-Mutanten. Das bedeutet, dass der dynamische Arbeitsbereich (Belusic, 2011) der Photorezeptoren bei den Alanin-Mutanten größer ist als bei den anderen Fliegen. Dieser Effekt bestätigt sich auch bei den Fliegen, denen zusätzlich noch das TRPL entfernt wurde. Nur zeigte sich hier, dass es auch bei der Asparaginsäure-Mutante der PKC-Phosphorylierungsstelle zu einer verringerten Steigung kommt, was daher rühren kann, dass der TRPL-Kanal eventuell diesen Phänotyp maskiert, wofür auch die stärkeren Unterschiede der anderen Mutanten sprechen würden. Der Wert des  $-\log(\text{EC}_{50})$ , auch  $\text{pEC}_{50}$  genannt, gibt bei Dosis-Antwortkurven das Maß für die Stärke des Agonisten an, d.h. mit was für einer Amplitude der TRP-Kanal auf den Lichtreiz reagiert. Hierbei zeigte sich, dass es zu keinen Unterschieden zwischen den transgenen *trp*-Mutanten und der Wildtyp-Kontrolle (TRP-WT)

kommt, egal ob mit TRPL oder ohne. Die einzige Auffälligkeit zeigte die Mutante TRP\_T849A, die etwas höhere Amplituden auf die Lichtreize aufwies als ihr Pendant TRP\_T849D, was auf eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit bzw. Erregbarkeit dieses TRP-Kanals hindeuten könnte.

Einen weiteren Hinweis auf diese erhöhte Erregbarkeit lieferten die Daten zur Erholungszeit der mutierten TRP-Kanäle. Hier zeigte sich, dass der vermeintlich erregbarere Kanal der TRP\_T849A Mutante bei kurzen Erholungszeiten keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte (Abb. 6.32A rote Kurve), während der mutierte TRP-Kanal TRP\_T849D nach 20 und 30 Sekunden eine deutlich schwächere Antwort zeigte (Abb. 6.32A grüne Kurve), also in seiner Erregbarkeit beeinträchtigt war. Einen vergleichbaren Effekt zeigten auch die Mutationen TRP\_S936A und TRP\_S936D untereinander mit dem entscheidenden Unterschied, dass es hier bei der Alanin-Mutation zu niedrigeren Ausschlägen bei allen Erholungszeiten unter 90 Sekunden kam (Abb. 6.32B rote Kurve) und die Asparaginsäure-Mutante bei kurzen Erholungszeiten (10 und 20 Sekunden) keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte (Abb. 6.32B grüne Kurve). Zusätzlich dazu zeigte die Alanin-Mutante TRP\_S936A eine niedrigere Amplitude nach 10 und 20 Sekunden Erholungszeit im Vergleich zur Asparaginsäure-Mutante TRP\_S936D (Abb. 6.32C und D). Dieser Befund deutet also auf eine erhöhte Erregbarkeit des TRP-Kanals mit einer Asparaginsäure-Mutation gegenüber der Alanin-Mutation an der Phosphorylierungsstelle S936 hin. Dieser Befund bestätigt sich noch zusätzlich, wenn man in diesen beiden Mutationen (TRP\_S936A und TRP\_S936D) den TRPL-Kanal entfernt. Diese beiden Mutanten (TRP\_S936A DN und TRP\_S936D DN) zeigten ebenfalls bei kurzen Erholungszeiten von 10 und 20 Sekunden deutliche Unterschiede untereinander, dass auch hier, wie schon mit dem TRPL-Kanal, die Mutante mit der Asparaginsäure-Mutation eine höhere Amplitude generiert als die Alanin-Mutation (Abb. 6.33 C und D).

Ein weiteres Indiz, dass durch Phosphorylierung des TRP-Kanals dessen Erregbarkeit beeinflusst wird, bot die Messung der Adaptationsfähigkeit der mutierten TRP-Kanäle. Die Mutanten mit einem TRPL-Kanal zeigten alle eine schlechtere Adaptation als die Wildtyp-Kontrolle (Abb. 6.34), d.h. sie bildeten bei Hintergrundlicht eine kleinere Amplitude auf einen neuen zusätzlichen Lichtreiz aus. Da die Adaptation in den Photorezeptoren aber mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in der Zelle zusammenhängt (Gu et al., 2005) und der TRPL-Kanal ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässig ist, kann nicht abschließend angenommen werden, dass die beobachteten Effekte auf die Mutation im TRP-Kanal zurückzuführen sind oder auf eine fehlerhafte Interaktion mit dem TRPL-Kanal bzw. einem Defekt im TRPL-Kanal selber. Um die Adaptationsfähigkeit der mutierten TRP-Kanäle zweifelsfrei zu ermitteln, mussten daher Fliegen betrachtet werden, die keinen TRPL-Kanal mehr exprimierten, womit sichergestellt war, dass der mutierte TRP-Kanal der einzige Kanal in den Photorezeptorzellen ist, der

einen lichtabhängigen Ionen bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom generierte. Bei der Betrachtung solcher Fliegen stellte sich heraus, dass die Mutation des TRP-Kanals der Stelle T849 zu Alanin oder zu Asparaginsäure die Adaptationseigenschaften des TRP-Kanals bei geringer Hintergrundbeleuchtung nicht beeinträchtigte, während bei stärker werdender Hintergrundbeleuchtung die Adaptation schlechter wurde, was sich in einer kleineren Amplitude auf den zweiten Lichtreiz zeigte (Abb. 6.35A rote und grüne Kurve). Dies deutet auf einen leichten Defekt der Ionen-Leitfähigkeit dieser mutierten Kanäle hin, da sie auf einen zusätzlichen Lichtreiz nicht mehr ausreichend Ionen in den Photorezeptor strömen lassen, im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle (Abb. 6.35A schwarze Kurve). Dieser Effekt kann dadurch hervorgerufen werden, dass die fehlerhafte Phosphorylierung der TRP-Kanäle zu einem schlechteren bzw. langsameren schließen führt, worauf hin während eines starken Lichtreizes mehr TRP-Kanäle offen sind. Dies führt dazu, dass für einem zusätzlichen Lichtreiz weniger noch geschlossenen Kanäle im Photorezeptor zur Verfügung stehen, die auf den neuen Lichtreiz hin geöffnet werden können, worauf hin dann der neue Lichtreiz eine kleiner Amplitude ausbildet. Genau denselben Effekt zeigte auch die Mutante mit der Alanin-Mutation des TRP-Kanals an der Phosphorylierungsstelle S936 (Abb. 6.35B rote Kurve), auch hier zeigte sich eine schlechtere Adaptation bei stärkeren Hintergrund Beleuchtungen. Ganz im Gegensatz zu der Asparagin-Mutante TRP\_S936D DN (Abb. 6.35B grüne Kurve), die unabhängig von der Intensität des Hintergrundlichts immer eine besser Adaptation als die Alanin-Mutante zeigte und bei stärker werdendem Hintergrundlicht auch eine bessere Adaptation als die Wildtyp-Kontrolle (TRP\_WT DN, Abb. 6.35A und B jeweils die schwarze Kurve). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung an der Stelle S936 zu einem schnelleren schließen des TRP-Kanals führt, da eine andauernde Belichtung den Photorezeptor dieser Mutante weniger zu beeinträchtigen scheint als die Wildtyp-Kontrolle oder die Alanin-Mutation an der Phosphorylierungsstelle S936, da hier durch das schneller schließen der TRP-Kanäle mehr geschlossene TRP-Kanäle für einen zusätzlichen Lichtreiz zu Verfügung stehen und somit eine größere Amplitude generiert werden kann.

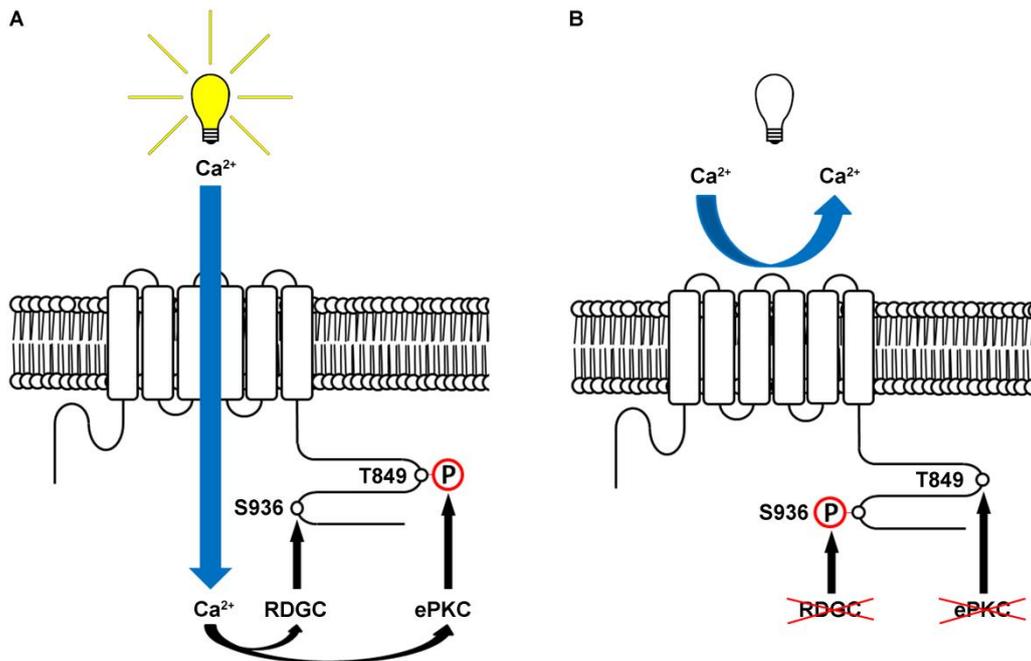
Das letzte Puzzlestück dieser Arbeit zur Klärung, ob eine Phosphorylierung am TRP-Kanal dessen Erregbarkeit beeinflusst, ist die Betrachtung der halben Deaktivierungszeiten. Hier zeigte sich, dass der Phosphorylierungszustand tatsächlich einen Einfluss auf die Abschaltung des TRP-Kanals hat. So zeigten die Mutanten TRP\_T849A und TRP\_S936D wie die Nullmutanten, die sie imitieren (*inaC<sup>P209</sup>* bzw. *rdgC<sup>306</sup>*), eine verlängerte halbe Deaktivierungszeit im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abb. 6.37A), wobei aber zu beachten ist, dass der Effekt bei den Mutante nicht so stark ausgeprägt war, wie bei den beiden Nullmutanten *inaC<sup>P209</sup>* und *rdgC<sup>306</sup>*, was darauf zurückzuführen ist, dass bei den transgenen Fliegen nur jeweils eine Phosphorylierungsstelle betroffen ist und bei einer Nullmutante mehrere Phosphorylierungsstellen bzw. mehrere Proteine beeinflusst werden können, was

diesen Effekt natürlich verstärkt. Das bedeutet, dass eine Phosphorylierung an der Stelle T849 bzw. die Dephosphorylierung an der Stelle S936 notwendig zu sein scheint, um die Erregbarkeit des TRP-Kanals zu reduzieren, damit er mit höherer Wahrscheinlichkeit geschlossen wird. Einen ganz ähnlichen Befund lieferte auch die Mutation der hauptsächlich im Dunklen phosphorylierten Stelle 982 nach Alanin, die auch eine verlängerte Deaktivierungszeit zeigte (Popescu et al., 2006). Es ist außerdem nicht außergewöhnlich, dass die Sensitivität eines TRP-Kanals durch eine Phosphorylierung verändert wird. So zeigt auch der TRPV1-Kanal nach Phosphorylierung eine erhöhte Sensitivität auf seinen Hauptreiz Hitze (Rathee et al., 2002). Außerdem ist bereits vom TRPM8-Kanal bekannt, dass er, wenn er dephosphoryliert wird, sich anschließend inaktiviert (Premkumar et al., 2005).

### 7.3 Regulierungsmodell des TRP-Kanals

Die durch die Phototransduktionskaskade vermittelte Öffnung des TRP-Kanals (Peretz et al., 1994) führt zu einem massivem Einstrom von Kationen in den Photorezeptor und generiert so die Depolarisation, die daraufhin in die verarbeitenden Zentren im Gehirn weitergeleitet wird. Zu diesen Kationen zählt auch Calcium, welches in der Sehsinneszelle die Augen-Proteinkinase C (ePKC) aktiviert, die ihrerseits den TRP-Kanal phosphoryliert (Abb. 6.9, Popescu et al., 2006). Diese Phosphorylierung der im Hellen phosphorylierten Stellen (wie der Stelle T849 durch die ePKC) führt daraufhin zur Reduzierung der Offenwahrscheinlichkeit bzw. zur Reduzierung der Sensitivität des Kanals, unterstützt durch die nicht phosphorylierte Stelle S936, die durch die calciumabhängige Phosphatase RDGC dephosphoryliert wird und bleibt (Abb. 7.1A).

Dass der Kanal durch diese Phosphorylierungsmuster nicht sofort geschlossen wird, liegt daran, dass das Signal zum Offenhalten des Kanals diesen Effekt noch überlagert. Bei Beendigung des Lichtreizes wird das Signal zum Offenhalten des TRP-Kanals ausgesetzt, wodurch nur noch das durch die Phosphorylierung bedingte Signal zum Schließen des Kanals übrig bleibt, wodurch der Kanal dann auch schnell geschlossen wird. Ist dieses Phosphorylierungsmuster durch eine Mutation oder durch das Fehlen der entsprechenden Kinasen oder Phosphatasen gestört, wird der Kanal deutlich langsamer geschlossen (Abb. 6.11A, 6.15A, 6.37). Ist der Kanal abgeschaltet und kein Calcium mehr in der Photorezeptorzelle, werden die ePKC und die Phosphatase RDGC deaktiviert und die Stelle T849 durch bisher noch unbekannte Phosphatasen wieder dephosphoryliert, während die Stelle S936 durch bislang unbekannte Kinasen wieder phosphoryliert wird (Abb. 7.1B), wodurch der Kanal seine ursprüngliche Erregbarkeit zurückbekommt.



**Abbildung 7.1 Regulierungsmodell des TRP-Kanals:** Diese Cartoons zeigen die Phosphorylierungszustände des TRP-Kanals: bei Belichtung in **A** und in Dunkelheit in **B**. Eine Phosphorylierung wird durch den roten Kreis mit einem P markiert. **A:** Bei Belichtung strömt Calcium in die Photorezeptorzelle und generiert so eine Depolarisierung des Photorezeptors. Außerdem aktiviert das Calcium die Augen Proteinkinase C (ePKC) zur Phosphorylierung des TRP-Kanals an der Stelle T849 und die Phosphatase RDGC, die die Stelle S936 dephosphoryliert, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des TRP-Kanals reduziert wird. **B:** Bei Dunkelheit ist kein Calcium im Photorezeptor und somit sind die ePKC und die Phosphatase RDGC nicht aktiv, was zu einer Phosphorylierung der Stelle S936 und einer Dephosphorylierung der Stelle T849 führt, die zusammen die Offenwahrscheinlichkeit des TRP-Kanals wieder erhöhen.

Dass die Deaktivierung des TRP-Kanals phosphorylierungsabhängig ist, zeigten die Mutanten wie *inaC<sup>P209</sup>* (Abb. 6.11A) und *rdgC<sup>306</sup>* (Abb. 6.15B), in denen es zu massiven Phosphorylierungsabweichungen an den getesteten Phosphorylierungsstellen T849, T864 und S936 kommt, die zu einer deutlich verlängerten Deaktivierungszeit des ERGs führten. Gestützt wird diese Aussage zusätzlich noch dadurch, dass die Mutation der Phosphorylierungsstelle T849 nach Alanin (TRP\_T849A), die normalerweise von der Augen Proteinkinase C (ePKC) phosphoryliert wird, genau wie bei der ePKC-Nullmutante auch, ebenfalls zu einer verlängerten Deaktivierungszeit führte (Abb. 6.37A), während die Kontroll-Mutation an der Stelle T849 nach Asparaginsäure (TRP\_T849D), die einer Phosphomimese, also eine Dauerphosphorylierung vortäuscht, eine Deaktivierungszeit wie die transgene Wildtypkontrolle (TRP\_WT) zeigte (Abb. 6.33A grüner Balken). Das gleiche Phänomen zeigte sich auch für die Mutationen der vorwiegend im Dunkeln phosphorylierte Stelle S936 des TRP-Kanals, der durch RDGC dephosphoryliert werden kann. Eine Mutation dieser Stelle zu Asparaginsäure (TRP\_S936D), die eine Dauerphosphorylierung simuliert, wie sie die *rdgC<sup>306</sup>*-Mutante aufweist, zeigte ebenfalls einen Deaktivierungsdefekt (Abb. 6.33B grüner Balken), während sich auch hier die Kontroll-Mutation nach Alanin, in diesem Fall um eine Phosphorylierung an dieser Stelle zu verhindern (TPR\_S936A), wildtypisch verhielt (Abb. 6.33B). Auch Popescu und Kollegen konnten bereits 2006 zeigen, dass eine Mutation

## Diskussion

des TRP-Kanal an einer der vorwiegend im Hellen phosphorylierten Aminosäure nach Alanin, in ihrem Fall die Aminosäure Serin an der Position 982, zu einer verlangsamten Deaktivierung des TRP-Kanals führte. Dies alles stützt die Hypothese, dass das Phosphorylierungsmuster des TRP-Kanals einen Einfluss auf dessen Offenwahrscheinlichkeit hat.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abou Tayoun, Ahmad N, Li, X., Chu, B., Hardie, R.C., Juusola, M., Dolph, P.J., 2011. The *Drosophila* SK channel (dSK) contributes to photoreceptor performance by mediating sensitivity control at the first visual network. *J. Neurosci.* 31 (39), 13897–13910.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., Pablos, B. de, Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nuskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461), 2185–2195.
- Adamski, F.M., Zhu, M.Y., Bahiraei, F., Shieh, B.H., 1998. Interaction of eye protein kinase C and INAD in *Drosophila*. Localization of binding domains and electrophysiological characterization of a loss of association in transgenic flies. *J. Biol. Chem.* 273 (28), 17713–17719.
- Agam, K., Frechter, S., Minke, B., 2004. Activation of the *Drosophila* TRP and TRPL channels requires both Ca<sup>2+</sup> and protein dephosphorylation. *Cell Calcium* 35 (2), 87–105.
- Ahmed, G.U., Mehta, D., Vogel, S., Holinstat, M., Paria, B.C., Tiruppathi, C., Malik, A.B., 2004. Protein kinase Calpha phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279 (20), 20941–20949.
- Alawi, A.A., Pak, W.L., 1971. On-transient of insect electroretinogram: its cellular origin. *Science* 172 (3987), 1055–1057.

- Alloway, P.G., Dolph, P.J., 1999. A role for the light-dependent phosphorylation of visual arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (11), 6072–6077.
- Alloway, P.G., Howard, L., Dolph, P.J., 2000. The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. *Neuron* 28 (1), 129–138.
- ASHER PERETZ, 1994. Genetic Dissection of Light-induced Ca<sup>2+</sup> Influx into *Drosophila* Photoreceptors.
- Barford, D., Das, A.K., Egloff, M.P., 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 133–164.
- Barker, W.C., Dayhoff, M.O., 1982. Viral src gene products are related to the catalytic chain of mammalian cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (9), 2836–2839.
- Belusic, G., 2011. ERG in *Drosophila*, In *Electroretinograms* (ed G. Belusic). pp. 221-238. InTech. (available at <http://www.intechopen.com/books/electroretinograms/erg-in-drosophila>)
- Bentrop, J., Schwab, K., Pak, W.L., Paulsen, R., 1997. Site-directed mutagenesis of highly conserved amino acids in the first cytoplasmic loop of *Drosophila* Rh1 opsin blocks rhodopsin synthesis in the nascent state. *EMBO J.* 16 (7), 1600–1609.
- Biggs, W.H., Zavitz, K.H., Dickson, B., van der Straten, A, Brunner, D., Hafen, E., Zipursky, S.L., 1994. The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J.* 13 (7), 1628–1635.
- Bloomquist, B.T., Shortridge, R.D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., Pak, W.L., 1988. Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction. *Cell* 54 (5), 723–733.
- Boggiano, J.C., Vanderzalm, P.J., Fehon, R.G., 2011. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev. Cell* 21 (5), 888–895.
- BOWNDS, D., WALD, G., 1965. REACTION OF THE RHODOPSIN CHROMOPHORE WITH SODIUM BOROHYDRIDE. *Nature* 205, 254–257.
- Byk, T., Bar-Yaacov, M., Doza, Y.N., Minke, B., Selinger, Z., 1993. Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the fly photoreceptor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (5), 1907–1911.
- Cao, J., Li, Y., Xia, W., Reddig, K., Hu, W., Xie, W., Li, H.-S., Han, J., 2011. A *Drosophila* metallophosphoesterase mediates deglycosylation of rhodopsin. *EMBO J.* 30 (18), 3701–3713.
- Ceulemans, H., Bollen, M., 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* 84 (1), 1–39.
- Chen, C., Tao, T., Wen, C., He, W.-Q., Qiao, Y.-N., Gao, Y.-Q., Chen, X., Wang, P., Chen, C.-P., Zhao, W., Chen, H.-Q., Ye, A.-P., Peng, Y.-J., Zhu, M.-S., 2014. Myosin Light Chain Kinase (MLCK) Regulates Cell Migration in a Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation-Independent Mechanism. *J. Biol. Chem.*
- Chevesich, J., Kreuz, A.J., Montell, C., 1997. Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron* 18 (1), 95–105.
- Choi, K.W., Smith, R.F., Buratowski, R.M., Quinn, W.G., 1991. Deficient protein kinase C activity in turnip, a *Drosophila* learning mutant. *J. Biol. Chem.* 266 (24), 15999-606.
- Chyb, S., Raghu, P., Hardie, R.C., 1999. Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397 (6716), 255–259.

- Coombe, P.E., 1986. The large monopolar cells L1 and L2 are responsible for ERG transients in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol.* 159 (5), 655–665.
- Cosens, D.J., Manning, A., 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224 (5216), 285–287.
- Delgado, R., Muñoz, Y., Peña-Cortés, H., Giavalisco, P., Bacigalupo, J., 2014. Diacylglycerol activates the light-dependent channel TRP in the photosensitive microvilli of *Drosophila melanogaster* photoreceptors. *J. Neurosci.* 34 (19), 6679–6686.
- Dolph, P., Nair, A., Raghu, P., 2011. Electroretinogram recordings of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc* 2011 (1), pdb.prot5549.
- 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. *Science* 260 (5116), 1910–1916.
- Drier, E.A., Tello, M.K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T.C., Yin, Jerry C P, 2002. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.* 5 (4), 316–324.
- Eichenbaum, D.M., Goldsmith, T.H., 1968. Properties of intact photoreceptor cells lacking synapses. *J. Exp. Zool.* 169 (1), 15–32.
- Emeis, D., Kühn, H., Reichert, J., Hofmann, K.P., 1982. Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium. *FEBS Lett.* 143 (1), 29–34.
- Estacion, M., Sinkins, W.G., Schilling, W.P., 2001. Regulation of *Drosophila* transient receptor potential-like (TrpL) channels by phospholipase C-dependent mechanisms. *J. Physiol. (Lond.)* 530 (Pt 1), 1–19.
- Feiler, R., Bjornson, R., Kirschfeld, K., Mismar, D., Rubin, G.M., Smith, D.P., Socolich, M., Zuker, C.S., 1992. Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J. Neurosci.* 12 (10), 3862–3868.
- Felberg, J., Johnson, P., 1998. Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* 273 (28), 17839–17845.
- Fernandez, R., Takahashi, F., Liu, Z., Steward, R., Stein, D., Stanley, E.R., 2000. The *Drosophila* shark tyrosine kinase is required for embryonic dorsal closure. *Genes Dev.* 14 (5), 604–614.
- FISCHER, E.H., KREBS, E.G., 1955. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216 (1), 121–132.
- Fryxell, K.J., Meyerowitz, E.M., 1987. An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila*. *EMBO J.* 6 (2), 443–451.
- Gilman, A.G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.
- Gross, S.D., Hoffman, D.P., Fiset, P.L., Baas, P., Anderson, R.A., 1995. A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J. Cell Biol.* 130 (3), 711–724.
- Gross, S.D., Simerly, C., Schatten, G., Anderson, R.A., 1997. A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 24), 3083–3090.
- Gu, Y., Oberwinkler, J., Postma, M., Hardie, R.C., 2005. Mechanisms of light adaptation in *Drosophila* photoreceptors. *Curr. Biol.* 15 (13), 1228–1234.

- Gunawardena, J., 2005. Multisite protein phosphorylation makes a good threshold but can be a poor switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (41), 14617–14622.
- Hanks, S.K., 1987. Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (2), 388–392.
- Hanks, S.K., Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9 (8), 576–596.
- Hardie, R., Postma, M. (Eds.), 2008. *The Senses: A Comprehensive Reference*. Elsevier.
- Hardie, R.C., Franze, K., 2012. Photomechanical responses in *Drosophila* photoreceptors. *Science* 338 (6104), 260–263.
- Hardie, R.C., Minke, B., 1992. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8 (4), 643–651.
- Harris, W.A., 1977. Hereditary retinal degeneration in *Drosophila melanogaster*. A mutant defect associated with the phototransduction process. *The Journal of General Physiology* 69 (3), 261–291.
- Harris, W.A., Stark, W.S., Walker, J.A., 1976. Genetic dissection of the photoreceptor system in the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *J. Physiol. (Lond.)* 256 (2), 415–439.
- Hotta, Y., Benzer, S., 1970. Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67 (3), 1156–1163.
- Huang, J., Liu, C.-H., Hughes, S.A., Postma, M., Schwiening, C.J., Hardie, R.C., 2010. Activation of TRP channels by protons and phosphoinositide depletion in *Drosophila* photoreceptors. *Curr. Biol.* 20 (3), 189–197.
- Huber, A., 2001. Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur. J. Neurosci.* 14 (5), 769–776.
- Huber, A., Sander, P., Böhner, M., Paulsen, R., 1998. The TRP Ca<sup>2+</sup> channel assembled in a signaling complex by the PDZ domain protein INAD is phosphorylated through the interaction with protein kinase C (ePKC). *FEBS Lett.* 425 (2), 317–322.
- Huber, A., Sander, P., Gobert, A., Böhner, M., Hermann, R., Paulsen, R., 1996a. The transient receptor potential protein (Trp), a putative store-operated Ca<sup>2+</sup> channel essential for phosphoinositide-mediated photoreception, forms a signaling complex with NorpA, InaC and InaD. *EMBO J.* 15 (24), 7036–7045.
- Huber, A., Sander, P., Paulsen, R., 1996b. Phosphorylation of the InaD gene product, a photoreceptor membrane protein required for recovery of visual excitation. *J. Biol. Chem.* 271 (20), 11710–11717.
- Huber, A., Smith, D.P., Zuker, C.S., Paulsen, R., 1990. Opsin of Calliphora peripheral photoreceptors R1-6. Homology with *Drosophila* Rh1 and posttranslational processing. *J. Biol. Chem.* 265 (29), 17906–17910.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80 (2), 225–236.
- Hutchison, M., Berman, K.S., Cobb, M.H., 1998. Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273 (44), 28625–28632.
- Kahn, E.S., Matsumoto, H., 1997. Calcium/calmodulin-dependent kinase II phosphorylates *Drosophila* visual arrestin. *J. Neurochem.* 68 (1), 169–175.
- Katanosaka, K., Tokunaga, F., Kawamura, S., Ozaki, K., 1998. N-linked glycosylation of *Drosophila* rhodopsin occurs exclusively in the amino-terminal domain and functions in rhodopsin maturation. *FEBS Lett.* 424 (3), 149–154.
- Katz, B., Minke, B., 2009. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci* 3, 2.

- Katz, B., Oberacker, T., Richter, D., Tzadok, H., Peters, M., Minke, B., Huber, A., 2013. *Drosophila* TRP and TRPL are assembled as homomultimeric channels in vivo. *J. Cell. Sci.* 126 (Pt 14), 3121–3133.
- King, I., Tsai, L.T.-Y., Pflanz, R., Voigt, A., Lee, S., Jäckle, H., Lu, B., Heberlein, U., 2011. *Drosophila tao* controls mushroom body development and ethanol-stimulated behavior through par-1. *J. Neurosci.* 31 (3), 1139–1148.
- Kiselev, A., Socolich, M., Vinós, J., Hardy, R.W., Zuker, C.S., Ranganathan, R., 2000. A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* 28 (1), 139–152.
- Krebs E. G., FISCHER, E.H., 1956. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 20 (1), 150–157.
- Krebs E. G., KENT, A.B., FISCHER, E.H., 1958. The muscle phosphorylase b kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 231 (1), 73–83.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T., 2000. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16 (7), 279–283.
- Kumar, J.P., 2012. Building an ommatidium one cell at a time. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 241 (1), 136–149.
- Langer H., 1967. Über die Pigmentgranula im Facettenauge von *Calliphora erythrocephala*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* (55), 354–377.
- Lee, S.J., Montell, C., 2001. Regulation of the rhodopsin protein phosphatase, RDGC, through interaction with calmodulin. *Neuron* 32 (6), 1097–1106.
- Lee, S.-J., Xu, H., Montell, C., 2004. Rhodopsin kinase activity modulates the amplitude of the visual response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (32), 11874–11879.
- Lee, Y.J., Shah, S., Suzuki, E., Zars, T., O'Day, P.M., Hyde, D.R., 1994. The *Drosophila* *dgg* gene encodes a G alpha protein that mediates phototransduction. *Neuron* 13 (5), 1143–1157.
- Legembre, P., Schickel, R., Barnhart, B.C., Peter, M.E., 2004. Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. *J. Biol. Chem.* 279 (45), 46742–46747.
- Lev, S., Katz, B., Tzarfaty, V., Minke, B., 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. *J. Biol. Chem.* 287 (2), 1436–1447.
- LeVine, H., Smith, D.P., Whitney, M., Malicki, D.M., Dolph, P.J., Smith, G.F., Burkhart, W., Zuker, C.S., 1990. Isolation of a novel visual-system-specific arrestin: an in vivo substrate for light-dependent phosphorylation. *Mech. Dev.* 33 (1), 19–25.
- Li, H.-S., Montell, C., 2000. TRP and the PDZ Protein, Inad, Form the Core Complex Required for Retention of the Signalex in *Drosophila* Photoreceptor Cells. *The Journal of Cell Biology* 150 (6), 1411–1422.
- Liu, M., Parker, L.L., Wadzinski, B.E., Shieh, B.H., 2000. Reversible phosphorylation of the signal transduction complex in *Drosophila* photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 275 (16), 12194–12199.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G., Wang, N., 1997. Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *Journal of Cell Science* 110 (Pt 10), 1141–1145.
- Lu, G., Wang, Y., 2008. Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 (2), 107–112.
- Marshall, C., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80 (2), 179–185.

- Masai, I., Okazaki, A., Hosoya, T., Hotta, Y., 1993. *Drosophila* retinal degeneration A gene encodes an eye-specific diacylglycerol kinase with cysteine-rich zinc-finger motifs and ankyrin repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (23), 11157–11161.
- Matsumoto, E., Hirose, K., Takagawa, K., Hotta, Y., 1988. Structure of reticular cells in a *Drosophila melanogaster* visual mutant, *rdgA*, at early stages of degeneration. *Cell Tissue Res.* 252 (2), 293–300.
- McKemy, D.D., 2005. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 1, 16.
- Miller, B.A., Zhang, W., 2011. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 531–544.
- Miller, D.T., Read, R., Rusconi, J., Cagan, R.L., 2000. The *Drosophila* *primo* locus encodes two low-molecular-weight tyrosine phosphatases. *Gene* 243 (1-2), 1–9.
- Minke, B., Wu, C., Pak, W.L., 1975a. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258 (5530), 84–87.
- Minke, B., Wu, C.-F., Pak, W.L., 1975b. Isolation of light-induced response of the central retinula cells from the electroretinogram of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol.* 98 (4), 345–355.
- Mocciaro, A., Schiebel, E., 2010. Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J. Cell. Sci.* 123 (Pt 17), 2867–2876.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N., Zhu, M.X., 2002. A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Molecular Cell* 9 (2), 229–231.
- Montell, C., Jones, K., Zuker, C., Rubin, G., 1987. A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 7 (5), 1558–1566.
- Montell, C., Rubin, G.M., 1988. The *Drosophila* *ninaC* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* 52 (5), 757–772.
- Montell, C., Rubin, G.M., 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2 (4), 1313–1323.
- Montini, E., 1997. A novel human serine-threonine phosphatase related to the *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin. *Human Molecular Genetics* 6 (7), 1137–1145.
- Morrison, D.K., Murakami, M.S., Cleghon, V., 2000. Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J. Cell Biol.* 150 (2), F57-62.
- Nebreda, A.R., Porras, A., 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25 (6), 257–260.
- Niemeyer, B.A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K., Zuker, C.S., 1996. The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85 (5), 651–659.
- Nikolic, K., Loizu, J., Degenaar, P., Toumazou, C., 2010. A stochastic model of the single photon response in *Drosophila* photoreceptors. *Integr Biol (Camb)* 2 (7-8), 354–370.
- Nilius, B., Owsianik, G., 2010. Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch.* 460 (2), 437–450.
- Nilsson, I., Hoffmann, I., 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4, 107–114.

- Nir, R., Grossman, R., Paroush, Z., Volk, T., 2012. Phosphorylation of the *Drosophila melanogaster* RNA-binding protein HOW by MAPK/ERK enhances its dimerization and activity. *PLoS Genet.* 8 (3), e1002632.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9 (7), 484–496.
- Novak, B., Kapuy, O., Domingo-Sananes, M.R., Tyson, J.J., 2010. Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (6), 801–808.
- Novakova-Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., Samad, A., Teisinger, J., Vlachova, V., 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* 149 (1), 144–154.
- Oberegelsbacher, C., Schneidler, C., Voolstra, O., Cerny, A., Huber, A., 2011. The *Drosophila* TRPL ion channel shares a Rab-dependent translocation pathway with rhodopsin. *Eur. J. Cell Biol.* 90 (8), 620–630.
- 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. *Cell* 40 (4), 839–850.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B., 2006. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 685–717.
- Pak, W.L., 1979. *Neurogenetics: Genetic Approaches to the Nervous System*, ed Breakefield X. Elsevier, New York.
- Pak, W.L., Grossfield, J., White, N.V., 1969. Nonphototactic mutants in a study of vision of *Drosophila*. *Nature* 222 (5191), 351–354.
- Pak, W.L., Pinto, L.H., 1976. Genetic approach to the study of the nervous system. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 397–448.
- Pak, W.L., Shino, S., Leung, H.-T., 2012. PDA (prolonged depolarizing afterpotential)-defective mutants: the story of nina's and ina's--pinta and santa maria, too. *J. Neurogenet.* 26 (2), 216–237.
- Palczewski, K., 2012. Chemistry and biology of vision. *J. Biol. Chem.* 287 (3), 1612–1619.
- Pan, D.A., Hardie, D.G., 2002. A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *Biochem. J.* 367 (Pt 1), 179–186.
- Papatsenko, D., Sheng, G., Desplan, C., 1997. A new rhodopsin in R8 photoreceptors of *Drosophila*: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells. *Development* 124 (9), 1665–1673.
- Peretz, A., Suss-Toby, E., Rom-Glas, A., Arnon, A., Payne, R., Minke, B., 1994. The light response of *Drosophila* photoreceptors is accompanied by an increase in cellular calcium: effects of specific mutations. *Neuron* 12 (6), 1257–1267.
- Peters, G.H., Frimurer, T.M., Olsen, O.H., 1998. Electrostatic evaluation of the signature motif (H/V)CX5R(S/T) in protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry* 37 (16), 5383–5393.
- Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E., 1992. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* 8 (4), 631–642.
- Popescu, D.C., Ham, A.-J.L., Shieh, B.-H., 2006. Scaffolding protein INAD regulates deactivation of vision by promoting phosphorylation of transient receptor potential by eye protein kinase C in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 26 (33), 8570–8577.
- Premkumar, L.S., Raisinghani, M., Pingle, S.C., Long, C., Pimentel, F., 2005. Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (49), 11322–11329.

- 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. *Nature* 354 (6350), 230–232.
- Ranganathan, R., Stevens, C.F., 1995. Arrestin binding determines the rate of inactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. *Cell* 81 (6), 841–848.
- Rathee, P.K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G.K., Wang, S.-Y., Nau, C., Kress, M., 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J. Neurosci.* 22 (11), 4740–4745.
- Ready, D.F., Hanson, T.E., Benzer, S., 1976. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Developmental Biology* 53 (2), 217–240.
- Riek, U., Scholz, R., Konarev, P., Rufer, A., Suter, M., Nazabal, A., Ringler, P., Chami, M., Müller, S.A., Neumann, D., Forstner, M., Hennig, M., Zenobi, R., Engel, A., Svergun, D., Schlattner, U., Wallimann, T., 2008. Structural properties of AMP-activated protein kinase: dimerization, molecular shape, and changes upon ligand binding. *J. Biol. Chem.* 283 (26), 18331–18343.
- Rosenthal, A., Rhee, L., Yadegari, R., Paro, R., Ullrich, A., Goeddel, D.V., 1987. Structure and nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* protein kinase C gene. *EMBO J.* 6 (2), 433–441.
- Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L.V., Chou, W.H., Paulsen, R., Britt, S.G., 1999. Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J. Neurosci.* 19 (24), 10716–10726.
- Santos, J.A., Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C.C., Allende, J.E., Sunkel, C.E., 1996. The casein kinase 1 alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt 7), 1847–1856.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A., 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15 (11), 430–434.
- Satoh, A., Tokunaga, F., Kawamura, S., Ozaki, K., 1997. In situ inhibition of vesicle transport and protein processing in the dominant negative Rab1 mutant of *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 23), 2943–2953.
- Schaeffer, E., Smith, D., Mardon, G., Quinn, W., Zuker, C., 1989a. Isolation and characterization of two new *drosophila* protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell* 57 (3), 403–412.
- Scott, K., Sun, Y., Beckingham, K., Zuker, C.S., 1997. Calmodulin regulation of *Drosophila* light-activated channels and receptor function mediates termination of the light response in vivo. *Cell* 91 (3), 375–383.
- Sengupta, S., Barber, T.R., Xia, H., Ready, D.F., Hardie, R.C., 2013. Depletion of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> underlies retinal degeneration in *Drosophila* trp mutants. *J. Cell. Sci.* 126 (Pt 5), 1247–1259.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (21), 11639–11644.
- Shieh, B.H., Zhu, M.Y., 1996. Regulation of the TRP Ca<sup>2+</sup> channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 16 (5), 991–998.
- Shieh, B.H., Zhu, M.Y., Lee, J.K., Kelly, I.M., Bahiraei, F., 1997. Association of INAD with NORPA is essential for controlled activation and deactivation of *Drosophila* phototransduction in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (23), 12682–12687.

- Smith, D.P., Ranganathan, R., Hardy, R.W., Marx, J., Tsuchida, T., Zuker, C.S., 1991a. Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor-specific protein kinase C. *Science* 254 (5037), 1478–1484.
- Souza, A C S, Azoubel, S., Queiroz, K C S, Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., 2009. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (7), 1140–1153.
- Stark, W.S., 1973. The effect of eye colour pigments on the action spectrum of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 19 (5), 999–1006.
- Steele, F., O'Tousa, J.E., 1990. Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila* rdgC mutant. *Neuron* 4 (6), 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. *Cell* 69 (4), 669–676.
- Stephenson, R.S., O'Tousa, J., Scavarda, N.J., Randall, L.L., Pak, W.L., 1983. *Drosophila* mutants with reduced rhodopsin content. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 36, 477–501.
- Strother, G.K., Casella, A.J., 1972. Microspectrophotometry of arthropod visual screening pigments. *J. Gen. Physiol.* 59 (5), 616–636.
- Stryer, L., 1986. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87–119.
- Stucky, C.L., Dubin, A.E., Jeske, N.A., Malin, S.A., McKemy, D.D., Story, G.M., 2009. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev* 60 (1), 2–23.
- Suzanne, M., Irie, K., Glise, B., Agnès, F., Mori, E., Matsumoto, K., Noselli, S., 1999. The *Drosophila* p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development. *Genes Dev.* 13 (11), 1464–1474.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., Nishizuka, Y., 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254 (10), 3692–3695.
- Talluri, S., Bhatt, A., Smith, D.P., 1995. Identification of a *Drosophila* G protein alpha subunit (dGq alpha-3) expressed in chemosensory cells and central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (25), 11475–11479.
- Tanimura, T., Isono, K., Tsukahara, Y., 1986. 3-H-YDROXYRETINAL AS A CHROMOPHORE OF *Drosophila melanogaster* VISUAL PIGMENT ANALYZED BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Photochem Photobiol* 43 (2), 225–228.
- Tchankouo-Nguetcheu, S., Udinotti, M., Durand, M., Meng, T.-C., Taouis, M., Rabinow, L., 2014. Negative regulation of MAP kinase signaling in *Drosophila* by Ptp61F/PTP1B. *Mol. Genet. Genomics*.
- Thebault, S., Alexander, R.T., Tiel Groenestege, Wouter M, Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., 2009. EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (1), 78–85.
- Timm, T., Matenia, D., Li, X.-Y., Griesshaber, B., Mandelkow, E.-M., 2006. Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation. *Neurodegener Dis* 3 (4-5), 207–217.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21 (3), 531–543.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., Zuker, C.S., 1997. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388 (6639), 243–249.

- Ueno, N., Oishi, I., Sugiyama, S., Nishida, Y., Minami, Y., Yamamura, H., 1997. Identification of a novel *Drosophila* protein kinase highly homologous to protein kinase N (PKN). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232 (1), 126–129.
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A., 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol. (Lond.)* 534 (Pt 3), 813–825.
- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.
- Vinos, J., 1997. A G Protein-Coupled Receptor Phosphatase Required for Rhodopsin Function. *Science* 277 (5326), 687–690.
- Vinós, J., Jalink, K., Hardy, R.W., Britt, S.G., Zuker, C.S., 1997. A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* 277 (5326), 687–690.
- Virshup, D.M., Eide, E.J., Forger, D.B., Gallego, M., Harnish, E.V., 2007. Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 413–420.
- Vogt, K., Kirschfeld, K., 1984. Chemical identity of the chromophores of fly visual pigment. *Naturwissenschaften* 71 (4), 211–213.
- Voolstra, O., Bartels, J.-P., Oberegelsbacher, C., Pfannstiel, J., Huber, A., 2013. Phosphorylation of the *Drosophila* transient receptor potential ion channel is regulated by the phototransduction cascade and involves several protein kinases and phosphatases. *PLoS ONE* 8 (9), e73787.
- Voolstra, O., Beck, K., Oberegelsbacher, C., Pfannstiel, J., Huber, A., 2010a. Light-dependent phosphorylation of the *drosophila* transient receptor potential ion channel. *J. Biol. Chem.* 285 (19), 14275–14284.
- Waddington C. H. and Margaret M. Perry, 1960. The Ultra-Structure of the Developing Eye of *Drosophila*. *Biological Sciences* (153), 155–178.
- WALD, G., 1936. PIGMENTS OF THE RETINA: II. SEA ROBIN, SEA BASS, AND SCUP. *J. Gen. Physiol.* 20 (1), 45–56.
- Wang, T., Jiao, Y., Montell, C., 2005. Dissecting independent channel and scaffolding roles of the *Drosophila* transient receptor potential channel. *J. Cell Biol.* 171 (4), 685–694.
- Wang, T., Montell, C., 2007. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch.* 454 (5), 821–847.
- Webel, R., Menon, I., O'Tousa, J.E., Colley, N.J., 2000. Role of asparagine-linked oligosaccharides in rhodopsin maturation and association with its molecular chaperone, NinaA. *J. Biol. Chem.* 275 (32), 24752–24759.
- Wes, P.D., Xu, X.Z., Li, H.S., Chien, F., Doberstein, S.K., Montell, C., 1999. Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nat. Neurosci.* 2 (5), 447–453.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., Knust, E., 2000. *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J. Cell Biol.* 150 (6), 1361–1374.
- Yanagawa, S.-i., Matsuda, Y., Lee, J.-S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T., Ishimoto, A., 2002. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* 21 (7), 1733–1742.
- Zhang, L., Saffen, D., 2001. Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 276 (16), 13331–13339.
- Zhang, Y., Kim, Y., Genoud, N., Gao, J., Kelly, J.W., Pfaff, S.L., Gill, G.N., Dixon, J.E., Noel, J.P., 2006. Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Mol. Cell* 24 (5), 759–770.

## Literaturverzeichnis

- Zheng, X., Sowcik, M., Chen, D., Sehgal, A., 2014. Casein kinase 1 promotes synchrony of the circadian clock network. *Mol. Cell. Biol.*
- Zuker, C.S., Cowman, A.F., Rubin, G.M., 1985. Isolation and structure of a rhodopsin gene from *D. melanogaster*. *Cell* 40 (4), 851–858.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
$\alpha$ -	anti-
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierten Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungswiese
c	centi
ca.	circa
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulinkinase
$\text{CKI}\alpha$	Casein Kinase I $\alpha$
CPTP	klassische PTP
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DN	Doppelnull
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosid-5-Triphosphat
DSP	doppelspezifischen PTP
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EC	effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ePKC	augenspezifische Proteinkinase C

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
ey	<i>eyeless</i>
F1-Generation	Erste Filialgeneration
F-Aktin	filamentöse Aktin
g	Gramm
Gal	Galactosidase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
<i>gmr</i>	<i>glass multimer reporter</i>
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GPRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
Gq	visuelles G-Protein
h	Stunde
hPa	Hektopascal
<i>hsp</i>	<i>heat shock promotor</i>
I	Lichtintensität
IC	Immuncytochemie
IgG	Immunglobulin G
<i>inaC</i>	<i>„inaktivtion no afterpotential“ C</i>
<i>inaD</i>	<i>„inaktivtion no afterpotential“ D</i>
IP	Immunopräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
k	Kilo
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LED	Licht-emittierende Diode
LMW-PTP	nieder molekulargewichtigen Thyrosin-Phosphatasen
Log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
m	milli oder Meter
M	Molar

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPKK	MAP-Kinase Kinase
min	Minute
MLCK	Myosin leichte Ketten Kinase
MPPE	Metallophosphoesterase
mRNA	messenger RNA
<i>mts</i>	<i>„microtubule star“</i>
n	Nano
n (alleinstehend)	Anzahl der Versuche
<i>ninaC</i>	<i>„neither inaktivation nor afterpotential“ C</i>
<i>ninaE</i>	<i>„neither inaktivation nor afterpotential“ E</i>
<i>norpA</i>	<i>„no receptor potential“ A</i>
nPKC	neue PKC
OD	optische Dichte
OPK	other protein Kinases
p	p-value
PAGE	Polyacryl-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PBS-S	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Saponin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDA	<i>„prolonged depolarizing afterpotential“</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKC53E(br)	Proteinkinase C 53E des Gehirns
PKN	Proteinkinase C, die mit der Proteinkinase N verwand ist
PP	Protein-Phosphatase
PPEF	Protein Phosphatase mit EF Calciumbindedomäne
PPP	Phosphoproteinphosphatasen
PPM	Metallabhängigen Proteinphosphatasen
PSP	Serin/Threonin Phosphatasen
PTP	Thyrosin-Phosphatasen
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PVDF	Polyvinylidenfluorid

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
R1-R8	Photorezeptorzelle 1 bis 8
Rh	Rhodopsin
<i>rdgA</i>	„retinal degeneration“ A
<i>rdgB</i>	„retinal degeneration“ B
<i>rdgC</i>	„retinal degeneration“ C
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure interference
RF	Rubidiumfraktion
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S936A	Serin Austausch an der Position 936 nach Alanin
S936D	Serin Austausch an der Position 936 nach Asparaginsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Threonin
T849A	Threonin Austausch an der Position 849 nach Alanin
T849D	Threonin Austausch an der Position 849 nach Asparaginsäure
TEA	Tris-Acetat EDTA Gelelektrophoresepuffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
<i>trp</i>	„transient receptor potential“
TRPC	klassische TRP-Kanäle
<i>trpl</i>	„transient receptor potential like“
TRPM	TRP-ähnliches Protein, der nach Melastatin benannt ist
TRPML	TRP-ähnliches Protein, der nach Mucolipidin benannt ist
TRPN	TRP-ähnliches Protein, der nach NOMPC-Kanälen benannt ist
TRPP	TRP-ähnliches Protein, der nach PKD2 benannt ist
TRPV	TRP-ähnliches Protein, der nach VR1 benannt ist
TRP $\gamma$	transient receptor potential $\gamma$
<i>tub</i>	<i>tubulin</i>
UE	Untereinheit
ü. N.	über Nacht

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VR1	Vanilloid Rezeptor 1
<i>w</i>	<i>white</i>
WT	Wildtyp
<i>y</i>	<i>yellow</i>
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro
λ	Wellenlänge
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent bezogen auf das Volumen

## 10 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit, ich nenne sie gerne „Das Monster“, teilhatten.

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Armin Huber für die Vergabe des tollen Themas, für die Benutzung seines Labors, die hervorragende Betreuung und die sehr nützlichen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Ich möchte mich auch beim Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hanke als Zweitgutachter bedanken.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Fachgebietes der Biosensorik und des Life Science Centers für das tolle Arbeitsklima und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft.

Besondern möchte ich hier meinem Kollegen Dr. Olaf Voolstra hervorheben, der mich bei meinen ersten Schritten in diesem Thema hervorragend begleitet, immer geduldig und konstruktiv unterstützt hat und stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte. Mein Dank geht natürlich auch an Dr. Alexander Cerny, Dr. Tina Oberacker, Dr. Claudia Oberegelsbacher und Dr. Oliver Simon für das tolle Zusammenarbeiten und die schönen FFDs.

Vielen Dank auch an Frank für die super Tipps im Laboralltag und die lustigen und kurzweiligen Gespräche im Fliegenlabor.

Ein großes Dankeschön geht an Berit Würtz. und meinen Vater, die sich die Mühe gemacht haben, meine Arbeit von den Rechtschreibfehlern zu befreien.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mich ermutigt haben, diesen Weg zu gehen, und die immer ein offenes Ohr für mich haben.

Und zu guter Letzt möchte ich Sybille und Paul, meine kleine Familie, die mir einen schönen Feierabend, immer eine sehr schöne Zeit beschern und mich immer großartig unterstützen hat, danken.

Vielen, vielen Dank!!!!!!

## 11 Eidesstattliche Versicherung

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

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema „Untersuchung der lichtabhängigen Phosphorylierung des TRP-Kanals von *Drosophila melanogaster*“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich und 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 eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich:

Ich versichere Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.



Stuttgart-Hohenheim, September 2015