Charakterisierung der lichtinduzierten Internalisierung des Ionenkanals TRPL aus Drosophila melanogaster

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

Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim

Institut für Physiologie Fachgebiet Biosensorik

vorgelegt von: Claudia Oberegelsbacher

aus Stuttgart

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Armin Huber
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Anette Preiss

eingereicht am:	11. Oktober 2012
Tag der Disputation:	13. Dezember 2012

Veröffentlichungen

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

Artikel:

Claudia Oberegelsbacher, Carina Schneidler, Olaf Voolstra, Alexander Cerny, Armin Huber. (2011) The *Drosophila* TRPL ion channel shares a Rab-dependent translocation pathway with rhodopsin, European Journal of Cell Biology, Volume 90, Issue 8.

Kongressbeiträge:

Oberegelsbacher,C, Huber,A (2009). Light dependent Translocation of the *Drosophila* TRPL Ion Channel to an intracellular Storage Compartment is accomplished by vesicular Transport. In: Proceedings of the 8th meeting of the German Neuroscience Society (2009).

Oberegelsbacher, C, Schneidler, C, and Huber, A. (2011). Internalization of the *Drosophila* TRPL ion channel is mediated by Rab5 and RabX4. In: Proceedings 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. T14-1B.

Cerny, A, Meyer, N, Dürr, T, **Oberegelsbacher,C** Huber, A. (2011). Identification of novel genes required for the internalization of *Drosophila* TRPL. In: Proceedings 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society Society. T14-8A.

Oberegelsbacher, C, Schneidler, C, and Huber, A. (2011). Requirement of Rab5 and RabX4 in lightdependent translocation of the *Drosophila* TRPL ion channel In: 22th European *Drosophila* Research Conference (EDRC), Lissabon, Sept. 21-24.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusar	nmenfassung	1
2	Sumn	nary	
3	Einlei	itung	5
	3.1 S	timulus-induzierte Endozytose von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	
	3.1.1	Lichtinduzierte Internalisierung des Rhodopsin1 aus Drosophila melanogaster	9
	3.2 R	egulierte Endozytose von TRP-Kanälen	
	3.2.1	Lichtabhängige Internalisierung des Ionenkanals TRPL aus Drosophila melanogaster	
	3.2.2	Stimulus-induzierte Translokation weiterer Komponenten der Signalkaskade	
1	Frage	setallung	18
4	riage	stenung	
5	Mater	rialien und Methoden	
	5.1 N	laterialien	20
	5.1.1	Chemikalien und sonstige Materialien	20
	5.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	
	5.1.3	Antikörper und Fluoreszenzmarker	22
	5.1.4	Fliegenstämme	
	5.1.5	Soft- und Hardware, spezielle Geräte	
	5.2 N	1ethoden	
	5.2.1	Fliegenzucht und Haltung	
	5.2.2	Belichtung der Fliegen	
	5.2.3	Proteinextraktion aus Fliegenköpfen	
	5.2.4	SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
	5.2.4	4.1 Western Blot Analyse	
	5.2.5	Wasserimmersionsmikroskopie	
	5.2.5	5.1 Quantifizieren von Fluoreszenzsignalen	
	5.2.6	Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	
	5.2.6	5.1 Fliegenpräparation für Immunzytochemie	
	5.2.6	6.2 Herstellung der Präparate	
	5.2.6	5.3 Antikörpermarkierung und Auswertung der Kryoschnitte	
	5.2.7	Quantifizieren von Vesikeln	
	5.2.8	Praparation and Dokumentation isolierter Ommatidien	
	52.8 520	Dokumentation der tiefen Pseudopunille	
	5 2 10	Anfertigung von Semidünnschnitten	30
	5.2.10	Konventionelle Elektronenmikroskopie	
		· · · r	

5.2.12	Immunoelektronenmikroskopie	31
5.2.	12.1 Anfertigung von Ultradünnschnitten	32
5.2.	12.2 Immunogoldmarkierung und Silberverstärkung	32
5.2.	12.3 Schnittkontrastierung und Auswertung	33
5.2.13	Aufzeichnung von Elektroretinogrammen (ERG)	33
5.2.14	Aufnahme von Rhodopsin-Differenzspektren	34
6 Ergel	bnisse3	35
6.1 D	Der Co-Transport von TRPL und Rhodopsin1	35
6.1.1	Die lichtinduzierte Translokation des TRPL-Kanals ist ein vesikulärer Transport	35
6.1.2	TRPL und Rhodopsin1 verwenden einen gemeinsamen Internalisierungsweg	37
6.1.3	Der Zeitverlauf der Internalisierung von TRPL und Rh1	39
6.1.4	Der Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf die gemeinsame Internalisierung von TRPL und	11
615	Alle verwendeten Lichtqualitäten führen zu vergleichberen elektronhysiologischen Antworten	+1 15
616	TPDI wird in Eliogen welche ektonisch Ph3 exprimieren auch hei Plaubelichtung interneliciert	+5 17
617	Die Translokationsgeschwindigkeit des TRPI -Kanals korreliert negativ mit der vorbertschenden	т/
0.1.7	Menge an Metarhodonsin	48
618	Lokalisation von internalisiertem Rhodonsin1 mittels Immunogold-EM	51
6.2 L	De Endozytose von TRPL erfolgt Dynamin-abhangig	55
6.3 De	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich	
6.3 Der gru	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich 1ndsätzlich	50
6.3 Dei gru 6.4 D	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich Indsätzlich	50 57
6.3 Den gru 6.4 D 6.4.1	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich undsätzlich	60 5 7 57
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich Indsätzlich	60 5 7 67 70
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich Indsätzlich	50 57 67 70 72
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 6 7 67 70 72 73
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 B 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 B 6.5.1 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74
 6.3 Der gru 6.4 E 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 E 6.5.1 6.5.2 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74 74
 6.3 Der grugert 6.4 E 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 E 6.5.1 6.5.2 6.5.3 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74 76
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 B 6.5.1 6.5.2 6.5.3 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74 76 81
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 B 6.5.1 6.5.2 6.5.3 6.5.4 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	 60 67 70 72 73 74 74 76 81 83
 6.3 Der grugert 6.4 Der Grugert 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 Ber G.5.1 6.5.2 6.5.3 6.5.4 6.5.5 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74 74 76 81 83 83
 6.3 Der gru 6.4 D 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 B 6.5.1 6.5.2 6.5.3 6.5.4 6.5.5 6.6 D 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	60 67 70 72 73 74 74 76 81 83 83 85 38
 6.3 Der gru gru gru 6.4 E 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 E 6.5.3 6.5.4 6.5.5 6.6 E 6.6.1 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	 60 67 70 72 73 74 74 76 81 83 85 38 39
 6.3 Der grugert 6.4 E 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 E 6.5.3 6.5.4 6.5.5 6.6 E 6.6.1 6.6.1 6.6.2 	r Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich indsätzlich	 60 67 70 72 73 74 74 76 81 85 38 89 91

,	7.1	Der Co-Transport von TRPL und Rhodopsin1	. 97
,	7.2	Der Einfluss von Rab-Proteinen auf die Internalisierung des TRPL-Kanals	100
	7.3	Die Rolle von Arrestin2 für Stabilität und Lokalisation des TRPL-Kanals	103
	7.4	Hypothetischer Transportmechanismus des TRPL-Kanals	107
8	Lite	eraturverzeichnis	112
9	Abl	kürzungsverzeichnis	124
10	D	Danksagungen	127
11	E	Crklärung	128

1 Zusammenfassung

Die lichtinduzierte Isomerisierung von Rhodopsin in den Komplexaugen von *Drosophila* führt zur Aktivierung der visuellen Signalkaskade. Der daraus resultierende Kationen-Einstrom durch die beiden Kanäle TRP und TRPL führt letztlich zur Ausbildung eines depolarisierenden Rezeptorpotentials. Darüber hinaus induziert der lichtabhängige Ca²⁺- Einstrom eine Änderung der subzellulären Lokalisation des TRPL-Kanals. In dunkeladaptierten Fliegen befindet sich der TRPL-Kanal innerhalb der Rhabdomere, während er in helladaptierten Fliegen in einem unbekannten Speicherkompartiment im Zellkörper der Photorezeptorzelle lokalisiert ist. Die lichtabhängige Translokation des TRPL-Kanals ist reversibel. Der Mechanismus dieses lichtinduzierten Transports ist noch weitestgehend ungeklärt, allerdings legen Beobachtungen von vesikulären Strukturen auf immunzytochemischen Schnitten belichteter Fliegen eine Vesikel-vermittelte Endozytose nahe.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der lichtinduzierten Internalisierung des TRPL-Kanals charakterisiert. Anhand immunzytochemischer Studien wurde gezeigt, dass die bei Belichtung gebildeten vesikulären Strukturen nicht nur TRPL sondern darüber hinaus auch Rhodopsin (Rh1) enthalten. Rhodopsin wird wie viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nach Aktivierung internalisiert. Da bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedliche Mengen an aktiviertem Rhodopsin (Metarhodopsin) gebildet werden, hängt die Endozytoserate von Rhodopsin maßgeblich von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab. Um die Endozytoserate von Rh1 aber auch von TRPL quantitativ zu erfassen, wurde die Anzahl der gebildeten Vesikel bei verschiedenen Lichtqualitäten bestimmt. Dabei zeigte sich, dass TRPL bei einer hohen Rh1-Endozytoserate (induziert durch Blaulicht) kaum internalisiert wird, wohingegen Orangebelichtung zu einer starken TRPL-Endozytoserate bei geringer Rh1-Internalisierung führt. Die unterschiedlichen Endozytoseraten von TRPL bei verschiedenen Lichtqualitäten spiegelten sich auch in der Kinetik der TRPL-Translokation wider, was durch die Quantifizierung von Zeitverläufen belegt werden konnte. Diese Ergebnisse legen eine Kompetition zwischen Rh1 und TRPL bezüglich ihrer Internalisierung nahe, deren Ursache in einer Konkurrenz um einen gemeinsamen Internalisierungsfaktor begründet sein könnte.

Durch Analyse der Endozytose in verschiedenen Mutanten konnte überdies gezeigt werden, dass die Endozytose von TRPL zwingend der Aktivierung der Signalkaskade bzw. des damit einhergehenden Ca²⁺-Einstroms bedarf, während die Internalisierung von Rhodopsin auch in Abwesenheit von Ca²⁺ erfolgt. Die Internalisierung von Rh1 und TRPL scheint folglich durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert zu werden.

Allerdings stellte sich heraus, dass die letztendliche Abschnürung von TRPL-enthaltenden endozytotischen Vesikeln, analog zur Internalisierung von Rh1, ein Dynamin-abhängiger Prozess ist. Die Endozytose von Rh1 wird durch das monomere G-Protein Rab5 vermittelt. Durch einen Screen

dominant-negativer Rab-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die lichtinduzierte Endozytose von TRPL durch die beiden Proteine Rab5 und RabX4 vermittelt wird. Somit stellt die Beteiligung von Rab5 an der Internalisierung beider Proteine eine weitere Gemeinsamkeit dar.

Arrestine spielen bei der Endozytose von Rh1 eine wichtige Rolle. Während Arrestin2 die Inaktivierung des Metarhodopsins vermittelt, leitet Arrestin1 anschließend dessen Internalisierung ein. Dies gilt jedoch nicht für die Internalisierung des TRPL-Kanals. Arrestin2 besitzt im Fall von TRPL jedoch eine wichtige Funktion in Bezug auf dessen Stabilität im Rhabdomer. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Analyse verschiedener *arr2*-Allele belegt, dass der TRPL-Kanal im Dunkeln innerhalb von 10 Tagen vollständig abgebaut wird, während er im Licht stabil bleibt. Folglich vermittelt Arr2 möglicherweise die Verankerung von TRPL im Rhabdomer in Dunkelheit, wohingegen es keine Bedeutung für die Stabilität des im Zellkörper lokalisierten TRPLs besitzt.

Die Internalisierung von Rh1 und TRPL unterscheidet sich auch im Schicksal des internalisierten Proteins. Während endozytiertes Rhodopsin letztendlich einem lysosomalen Abbau unterliegt, wird im Fall des TRPL-Kanals von einem Recylingprozess ausgegangen.

In dieser Arbeit gelang es, Kolokalisationen zwischen TRPL und einem Marker für Recyclingendosomen in helladaptierten Fliegen nachzuweisen, was eine Beteiligung dieser Kompartimente am TRPL-Transport nahelegt. Unter Verwendung eines Lysosomenmarkers gelang es überdies zu demonstrieren, dass internalisiertes TRPL, im Gegensatz zu Rhodopsin1, nicht mit Lysosomen kolokalisiert, was die Existenz eines Recylingprozesses unterstreicht.

2 Summary

The light-dependent isomerization of rhodopsin (Rh1), which takes place in the compound eyes of *Drosophila*, leads to the activation of the visual signaling cascade. The result is a depolarizing receptor potential caused by the Ca²⁺-influx through the two cation channels TRP and TRPL. This Ca²⁺ influx subsequently mediates a change in the subcellular localization of the TRPL channel by inducing its translocation. TRPL of dark-adapted flies is located inside the rhabdomeres, whereas upon illumination, TRPL translocates to a yet unidentified storage compartment in the cell body of the photoreceptor cell. The translocation is reversible; however, the underlying mechanism remains largely unclear. Based on the observation of TRPL-containing vesicles on immunocytochemical sections of illuminated flies a vesicular transport mechanism has been proposed for TRPL translocation.

In the present work, the mechanism underlying light-dependent TRPL internalization was studied. Using immunocytochemical techniques, a co-localization of rhodopsin and TRPL was observed in endocytic vesicles. Like many other G-protein coupled receptors, Rhodopsin undergoes endocytosis following activation. The rate of Rh1 internalization depends on the amount of metarhodopsin and, therefore, on the light quality used for illumination. The internalization rate was determined by counting Rh1- and TRPL-positive vesicles observed upon illumination with different light qualities. Surprisingly, the light quality that induced the highest number of Rh1-positive vesicles (i.e. blue light) caused the lowest number of TRPL-positive vesicles, while illumination with orange light induced strong TRPL internalization, but poor Rh1 endocytosis. Likewise, time courses of TRPL internalization were significantly faster in orange light compared to blue light. These findings may indicate a competition between TRPL and Rh1 for a common internalization factor.

Analysis of endocytosis in different mutants showed that the internalization of TRPL required Ca²⁺ influx mediated by the activation of the phototransduction cascade, whereas internalization of Rhodopsin was Ca²⁺-independent. Therefore, the trigger for activating TRPL and Rh1 endocytosis seems to be different, although both types of internalization were mechanistically similar and depended on dynamin function. The internalization of Rhodopsin is mediated by Rab5. A screen of dominant negative Rab mutants revealed that the light-induced internalization of TRPL is mediated by Rab5 and RabX4. Accordingly, the involvement of Rab5 constitutes another common feature in the endocytosis of TRPL and Rh1.

Arrestins play an important role in regulating the endocytosis of rhodopsin. Whereas arrestin2 mediates the inactivation of metarhodopsin, arrestin1 is responsible for subsequent rhodopsin endocytosis. The endocytosis of TRPL is independent of arrestins, but arrestin2 fulfills an important function regarding the stability of the TRPL protein in the rhabdomere. In the present work, the

analysis of different *arr2* alleles revealed a complete degradation of the TRPL protein after ten days in darkness, but not in light. This finding suggests that arrestin2 has a possible function as a scaffolding protein in the rhabdomer of dark-adapted flies, but not of light-adapted flies, when TRPL is located in a storage compartment in the cell body.

There is another fundamental difference between the two transport mechanisms regarding the fate of the protein after it has been internalized. Rhodopsin undergoes rapid lysosomal degradation whereas the trafficking of TRPL is described as a recycling mechanism. In this work, it was possible to show colocalization of TRPL with recycling endosomes indicating an involvement of these compartments in TRPL trafficking. Furthermore, rhodopsin but not TRPL showed colocalization with a lysosomal marker in light-adapted flies, providing additional evidence for the recycling of the TRPL channel.

3 Einleitung

Lebewesen stehen in ständiger Interaktion mit ihrer Umgebung und unterliegen daher vielfältigen Umwelteinflüssen, die durch unterschiedliche sensorische Systeme wahrgenommen werden. Die Perzeption extrazellulärer Reize führt hierbei zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die letztendlich eine Vielzahl zellulärer Prozesse in Gang setzen und beispielsweise zu einer Änderung der Genregulation oder der Ausbildung eines Rezeptorpotentials führen.

Die Transduktion von Lichtreizen im Komplexauge von Drosophila melanogaster stellt ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen dar. Am Beginn dieses Prozesses steht eine lichtinduzierte Konformationsänderung des Rhodopsins, die zur Aktivierung der visuellen Signalkaskade führt, an deren Ende die Öffnung der beiden Kationenkanäle TRP und TRPL steht. Der dadurch entstehende Ca²⁺-Einstrom trägt nicht nur zur Bildung des Rezeptorpotentials bei, sondern induziert außerdem auf unbekannte Art und Weise, die Internalisierung des TRPL-Kanals. Eine derartige stimulus-induzierte Modulation der Membranaustattung stellt einen klassischen Langzeit- Adaptions-Mechanismus dar, der bereits für andere Rezeptortypen, zum Beispiel für G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschrieben wurde.

3.1 Stimulus-induzierte Endozytose von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Regulation der Rezeptoraustattung durch Stimulus-induzierte Endozytose wurde am Beispiel G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR), zu denen auch das *Drosophila* Rhodopsin gehört, intensiv untersucht. G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden durch ihre heptahelikale Struktur charakterisiert (7TM-Rezeptoren) und bilden die größte und zugleich vielseitigste Superfamilie integraler Membranrezeptoren. Ihre Hauptfunktion ist die Übermittlung extrazellulärer Stimuli durch Aktivierung heterotrimerer G-Proteine, was zur Freisetzung von "Second Messenger" führt, und letztendlich unterschiedlichste zelluläre Prozesse in Gang setzt, z.B. die Phosphorylierung eines Zielproteins. Die Bindung eines geeigneten Agonisten führt dabei zur Aktivierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung des gekoppelten G-Proteins, dessen α -Untereinheit schließlich ein Effektorenzym zu aktivieren vermag. Dieses induziert nun die Bildung oder den Abbau von Second Messengern. Gleichzeitig wird durch geeignete Maßnahmen verhindert, dass es zu einer Überstimulation des Rezeptors kommt. Dieser Prozess wird als Desensitivierung bezeichnet (Freedman und Lefkowitz 1996). Ein weit verbreiteter Mechanismus ist hierbei die Aktivierung einer

Kinase, welche durch Phosphorylierung des Rezeptors zur Entkoppelung des G-Proteins, und somit zur Inaktivierung des Rezeptors führt, was einem negativen Feedback-Mechanismus entspricht. Dabei kommen hier hauptsächlich zwei Klassen von Kinasen zum Einsatz, second-messenger-abhängige Kinasen wie beispielsweise PKA (cAMP-dependent protein kinase) und Proteinkinase C (PKC) oder aber G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Bis jetzt gelang es sieben verschiedene GRKs zu identifizieren, die aufgrund ihrer Struktur wiederum in drei Klassen unterteilt werden können (Pitcher, Freedman, und Lefkowitz 1998). Die vollständige Inaktivierung des Rezeptors, an welche sich dessen Internalisierung anschließt, erfolgt in vielen Fällen aber erst nach Bindung von Arrestinen. Dieser Inaktivierungsmechanismus konnte 1985 erstmals am Beispiel von Rhodopsin gezeigt werden, dessen Inaktivierung die Bindung des "S-Antigens" (Arrestin) erfordert (Pfister et al. 1985). Neben dem eben beschriebenen Arrestin wurde bald darauf noch ein weiteres visuelles Arrestin identifiziert, das sogenannte "Cone-Arrestin", welches seinen Namen in Anlehnung an seinen Expressionsort, den Zapfenrezeptoren der Retina, erhielt (Craft, Whitmore, und Wiechmann 1994). Außerdem existieren in Vertebraten noch zwei weitere nicht-visuelle Arrestine: β -Arrestin1 und β -Arrestin2, welche unter anderem die Abschaltung des β_2 -Adrenozeptors vermitteln, was zu ihrer Namensgebung beitrug (Benovic et al. 1987).



Abbildung 1: Aktivierung und Desensitivierung von G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). (1). Die Bindung eines Liganden aktiviert den Rezeptor, was mit der Dissoziation des G-Proteins einhergeht. Die α -Untereinheit aktiviert nun zelluläre Signalwege, anschließend wird der Rezeptor durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert. (2). Anschließend kommt es zur Interaktion mit β -Arrestinen und AP-2 Adaptorproteinen, was die Rekrutierung von Clathrin und letztendlich die Endozytose des Kanals einleitet (3). Im Endosom erfolgt nun eine Sortierung, woran sich entweder ein Recycling des Kanals oder aber der Abbau im Lysosom anschließt (4). Verändert nach Morros, 2004.

Einen weiteren längerfristigen Adaptionsmechanismus stellt die als "Sequestrierung" bezeichnete Internalisierung des Rezeptors nach Aktivierung dar. Im Gegensatz zur Phosphorylierung, welche zu einer raschen Inaktivierung innerhalb von Sekunden oder Minuten führt, dauert diese Art der "Downregulation" Stunden, wenn nicht sogar Tage. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Anzahl der Rezeptoren durch Regulation auf Transkriptionsebene langfristig zu verringern, indem die Menge der mRNA reduziert wird (Ferguson et al. 1998; Ferguson 2001).

Es stellte sich außerdem heraus, dass β -Arrestine in der Lage sind, sowohl Clathrin als die β 2-Adaptin-Untereinheit des AP-2 Adaptor-Komplexes zu binden, und somit eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Endozytose von GPCRs spielen (Goodman et al. 1996; Zhang et al. 1997). Die Internalisierung des β_2 -Adrenozeptors erfolgt innerhalb Clathrinbedeckter Vesikel, wobei die Abschnürung ein Dynamin-vermittelter Prozess ist (Ferguson 2001). Der β_2 -Adrenozeptor war überdies der erste GPCR, anhand dessen die Internalisierung eines Rezeptors nach seiner Aktivierung gezeigt werden konnte (Chuang und Costa 1979).

Auch der Chemokinrezeptor CCR5, der an Entzündungsreaktionen beteiligt ist, aber auch als HIV-Co-Rezeptor das Andocken des HI-Virus an Immunzellen ermöglicht, gehört zur Familie der GPCRs und unterliegt einer dem zuvor beschriebenen Modell entsprechenden Regulation durch intrazelluläre Sequestrierung (Oppermann 2004). Dieser β -Arrestin-vermittelte Endozytose-Mechanismus, welcher die Beteiligung von Clathrin und Dynamin erfordert, wurde bereits für eine Vielzahl von GPCRs nachgewiesen, was auf einen konservierten Mechanismus schließen lässt.

Was die Notwendigkeit einer vorhergehenden Phosphorylierung für die Arrestinbindung und anschließenden Endozytose angeht, existieren allerdings große Unterschiede zwischen den verschiedenen Rezeptortypen. Während die Internalisierung des Muskarinischen Acetylcholinrezeptors M_2 zwingend einer vorausgegangenen Phosphorylierung bedarf, erfolgt die Endozytose des β_2 -Adrenozeptors weitestgehend phosphorylierungsunabhängig (Hausdorff et al. 1989; Tsuga et al. 1994).

Sowohl die Abschnürung der zu internalisierenden GPCRs als auch deren Sortierung wird häufig durch Rab-Proteine ("Ras-related in brain") vermittelt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um monomere G-Proteine, welche zur Ras-Superfamilie gehören und in eine Vielzahl vesikulärer Transportprozesse involviert sind (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000; Zerial and McBride 2001). Für viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass die Bildung von Vesikeln und deren anschließende Fusion mit frühen Endosomen durch Rab5 vermittelt wird (Seachrist und Ferguson 2003). Auch die Regulation des Transferrinrezeptors (TfR), welcher durch Bindung seines Liganden Transferrin die Aufnahme von Eisen in die Zelle vermittelt, wird durch Rab-Proteine reguliert. Die Internalisierung erfolgt auch hier unter Beteiligung von Rab5, während das anschließende Recycling der Mitwirkung von Rab4 bzw. Rab11 bedarf (Trischler, Stoorvogel, and Ullrich 1999). Neuere Untersuchungen belegen, dass auch die Degradierung des TfR ein Rab-

vermittelter Prozess ist, und unter Beteiligung von Rab12 abläuft (Lok and Loh 1998; Matsui und Fukuda 2011). Ein weiteres Beispiel für eine Rab5-vermittelte Endozytose ist die Internalisierung des β_2 -Adrenozeptors, der zugleich als einer der ersten GPCRs gilt, anhand dessen dieser Mechanismus beobachtete wurde (Moore et al. 1995). Das Recycling des β_2 -Adrenozeptors zurück zur Plasmamembran erfolgt klassisch Rab11-vermittelt (Parent et al. 2009).

Sequestrierte GPCRs verbleiben in frühen Endosomen, bis sie durch eine GPCR-spezifische Phosphatase dephosphoryliert werden, was eine Voraussetzung für die Reinsertion in die Membran bzw. das Recycling des Rezeptors ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung nur stattfinden kann, wenn es vorher zu einer Ansäuerung des endosomalen Lumens kommt, und der GPCR/ β -Arrestin Komplex wieder vollständig dissoziiert ist (Krueger et al. 1997).

Des Weiteren wird unterschieden zwischen schnellem Recycling (innerhalb von Minuten), das durch direkte Reinsertion von internalisierten Rezeptoren in die Plasmamembran aus frühen Endosomen gekennzeichnet ist, und langsamem Recycling, bei welchem die endozytierten GPCRs längere Zeit in Recyclingendosomen (ESC: endosomal sorting compartment), oder aber im Trans-Golgi-Netzwerk verbleiben, bevor sie zurück zur Membran gelangen(Zastrow 2003; Johannes und Popoff 2008; Grant and Donaldson 2009). Ein solcher langsamer Recyclingprozess wurde beispielsweise für den Somatostatin Type 2A Rezeptor gezeigt, welcher in Neuronen des Hippocampus exprimiert wird (Lelouvier et al. 2008).

Vom Endosom aus kann der internalisierte Rezeptor allerdings auch in Lysosomen sortiert werden, wo er letztendlich abgebaut wird. Alternativ besteht zusätzlich die Möglichkeit eines kontrollierten Abbaus mit vorausgehender Monoubiquitinierung. Dieser Mechanismus wurde beispielsweise für den β_2 -Adrenozeptor nachgewiesen, bei welchem die Interaktion mit der E3 Ubiquitin-Ligase über β -Arrestin vermittelt wird (Shenoy et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Recycling als auch die Degradation vieler GPCRs durch spezifische Sequenzmotive vermittelt wird, wobei zusätzlich verschiedene Adapterproteine in diese Sortierungsprozesse involviert sind. Ein Protein, welches beispielsweise die Sortierung aktivierter GPCRs in späte Lysosomen vermittelt, ist GASP-1 (G Protein-coupled Receptor-Associated Sorting Protein 1) (Moser et al. 2010). Dieser Mechanismus wurde auch für den Dopaminrezeptor D2 beschrieben, welcher nach Aktivierung durch den Liganden Dopamin GASP-1-vermittelt abgebaut wird, was zu einer Desensitivierung führt (Bartlett et al. 2005). Des Weiteren sind PDZ-Domänen am Recycling mehrerer G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt, wobei die Rezeptoren jeweils PDZ-Liganden-Sequenzen am C-Terminus enthalten. Dieser Mechanismus wurde beispielsweise sowohl für den β_2 -Adrenozeptor als auch für den Endothelinrezeptor beschrieben (Trejo 2005).

Bis dato ist nicht eindeutig geklärt, ob zusätzlich ein Internalisierungsweg existiert, welcher aktivierte Rezeptoren ohne vorherige Sortierung direkt dem lysosomalen Abbau zuführt (Campbell et al. 1991).

8

3.1.1 Lichtinduzierte Internalisierung des Rhodopsin1 aus Drosophila melanogaster

Auch das Hauptrhodopsin Rh1 aus *Drosophila* gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, was sich außerdem im Regulationsmechanismus widerspiegelt. Durch Absorption von Photonen wird die Isomerisierung des Chromophors 11-cis-3-Hydroxyretinal zu all-trans-Hydroxyretinal induziert, was in einer Konformationsänderung des Opsin hin zur aktiven Form, dem Metarhodopsin resultiert. Durch diese Konformationsänderung wird die Aktivierung eines heterotrimeren G_q -Proteins induziert, und somit die Phototransduktionskaskade gestartet (Lee et al. 1994). Anschließend wird das aktive Metarhodopsin durch die G-Proteingekoppelte Rezeptor Kinase1 (GPRK1) phosphoryliert, welche Sequenzhomologien zu anderen nicht-visuellen G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK2 und GRK3) aus Vertebraten aufweist (Zhao et al. 1998; Lee, Xu, und Montell 2004). Der exakte Aktivierungsmechanismus der GPRK1 wurde bisher nicht aufgeklärt, wobei für die β -adrenerge Rezeptorkinase (β ARK) gezeigt wurde, dass sie unter Beteiligung der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins zur Plasmamembran gelangt. Dies führt nicht nur zu ihrer Aktivierung, sondern bringt sie außerdem in die Nähe des zu phosphorylierenden Rezeptors (Pitcher et al. 1992). Auch für *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Beendigung der Photoantwort in Mutanten, denen die β -Untereinheit des G-Proteins fehlt, verzögert ist (Dolph et al. 1994).

Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass die Phosphorylierung des Rh1 einen Einfluss auf die Höhe der Amplitude der Rezeptorantwort im ERG ausübt. *grk1*-mutante Fliegen zeigen eine höhere Amplitude im Vergleich zum Wildtyp, und überdies auch eine wesentlich höher Amplitude als Fliegen, welche GRK1 überexprimieren (Lee und Montell 2004). Daraus wurde geschlossen, dass auch die Phosphorylierung des Rhodopsins einen Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors ausübt, analog zum Adaptionsmechanismus der GPCRs.

Die vollständige Inaktivierung erfordert auch in diesem Fall die Bindung von Arrestin, wobei in *Drosophila* zwei verschiedene Formen existieren, die jeweils unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Arrestin2 trägt zur Beendigung der Signalantwort bei, indem es vermutlich durch sterische Hinderung einer erneuten Rezeptor-G-Protein-Interaktion entgegen wirkt. Dieser Mechanismus wurde anhand des Vertebratenrhodopsins aufgeklärt indem gezeigt werden konnte, dass Arrestin und Transducin (G-Protein) um die Bindung an phosphoryliertes Metarhodopsin konkurrieren (Krupnick, Gurevich, und Benovic 1997).

Im Falle des Metarhodopsins aus *Drosophila* hingegen scheint eine vorausgehende Phosphorylierung nicht essentiell für die Bindung von Arr2 zu sein, da auch Fliegen, welchen die entsprechenden C-terminalen Phosphorylierungsstellen fehlen, normale Deaktivierung zeigen und überdies Arr2 sogar an unphosphoryliertes Rhodopsin bindet (Vinos et al. 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass

die Bindung von Arr2 an hyperphosphoryliertem Metarhodopsin sogar erniedrigt ist (Lee und Montell 2004a). Nach Bindung von Arr2 an Metarhodopsin wird Arr2 anschließend durch eine Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (CamKII) phosphoryliert, was zur Ablösung vom Metarhodopsin führt (Dolph et al. 1993; Matsumoto et al. 1994). Eine massive Rh1-Internalisierung mit anschließender Degeneration der Photorezeptoren tritt beispielsweise in rdgc-Mutanten (retinal degeneration C) auf, welchen eine Ca²⁺-abhängige Serin/Threonin Phosphatase fehlt, die eine essentielle Funktion in der Dephosphorylierung des Rhodopsins besitzt. Die Ursache liegt hier in einer massiven Endozytose von stabilen Arr2/Rh1-Komplexen (Steele und O'Tousa 1990; Alloway, Howard, und Dolph 2000; Kiselev et al. 2000; Kristaponyte et al. 2012). Ein ähnliches Phänomen lässt sich auch in norpA-Mutanten beobachten, in welchen die Aktivierung der Rhodopsin1 Phosphatase (RDGC) aufgrund des fehlenden Ca²⁺-Einstroms ausbleibt (Orem und Dolph 2002). Eine verstärkte Internalisierung von Rh1 tritt auch in tes-Mutanten (termination slow) auf, in welchen der Transkriptionsfaktor dCAMTA (calmodulinbinding transcription activator) nicht exprimiert wird. Als Ursache wird eine verzögerte Inaktivierung des Metarhodopsins angenommen, allerdings ist die Endozytose in diesem Fall nicht Arr2-abhängig (Han, Reddig, und Li 2007). Darüber hinaus besitzt Arr2 noch weitere essentielle Funktionen in der Endozytose des Metarhodopsins. Dazu gehört die Bindung von Untereinheiten des AP-2-Adaptorkomplexes, welcher sowohl an der Erkennung als auch an der Rekrutierung von, zu internalisierenden, Cargo-Proteinen beteiligt ist (Orem, Xia, und Dolph 2006).

Die lichtinduzierte Endozytose von Rh1 im wildtypischen Hintergrund wird durch Bindung von Arrestin1 vermittelt, das lediglich 10% des Gesamt-Arrestins in *Drosophila* ausmacht. Seine Bindung hängt von der Phosphorylierung des aktivierten Rhodopsins ab. Bleibt sie aus, so unterbleibt auch die Endozytose von Rh1 (Satoh und Ready 2005). Auch die lichtinduzierte Endozytose von Rhodopsin1 wird durch Rab5 vermittelt, was zuvor für viele Vertreter dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie gezeigt werden konnte (Han et al. 2007).

Im Gegensatz zu vielen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird internalisiertes Rhodopsin einem lysosomalen Abbau zugeführt und unterliegt folglich keinem Recycling-Prozess. Die Degradation von endozytiertem Rhodopsin wird durch die Funktion eines Tetraspanins namens Sunglasses vermittelt. In *sunglasses* Mutanten tritt eine lichtabhängige Degeneration der Photorezeptoren auf, woraus geschlossen wurde, dass der regulierte Abbau von Rhodopsin eine essentielle Funktion für die Erhaltung der Photorezeptorstruktur erfüllt (Xu et al. 2004). Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des geregelten Abbaus von internalisiertem Rhodopsin1 lieferte die Analyse von Mutanten, bei welchen Rhodopsin in späten Endosomen akkumuliert, da der lysosomale Abbau inhibiert ist. Es zeigte sich, dass auch diese Mutationen letztlich zur Degeneration des Photorezeptors führen (Chinchore, Mitra, und Dolph 2009).

3.2 Regulierte Endozytose von TRP-Kanälen

Weitere Membranproteine, welche einer signal-induzierten Endozytose unterliegen, sind die Vertreter der TRP-Superfamilie, deren Name vom elektrophysiologischen Phänotyp der trp-Nullmutante aus Drosophila melanogaster herrührt (transient receptor potential) (Minke, Wu, und Pak 1975). Auch hier stellt die schnelle Internalisierung von aktivierten Kanälen einen effizienten Mechanismus dar, um die Kanalausstattung der Membran als Reaktion auf unterschiedliche Umwelteinflüsse zu modifizieren. Kanäle der TRP-Familie werden in 7 Unterfamilien unterteilt: TRPC ("canonical"), zu denen die beiden Kanäle TRP und TRPL aus Drosophila gehören, TRPV ("Vanilloid"), TRPM ("Melastatin"), TRPN ("NOMPC"), TRPA ("Ankyrin"), TRPP ("Polycystein") und TRPML ("Mucolipin") (Nilius and Owsianik 2011). Ein signalreguliertes Translokationsverhalten wurde für zahlreiche Vertreter der Unterfamilien beschrieben (Cerny und Huber 2011). Beispielsweise zeigt der TRPV5-Kanal, dem eine Funktion im Ca²⁺-Transport in renalen Epithelzellen zugesprochen wird, eine konstitutive Dynamin-vermittelte Endozytose, die durch Phosphorylierung via PKC inhibiert werden kann (de Groot et al. 2010). Ebenfalls für TRPV5 wurde eine Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben, wie sie auch für viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typisch ist (van de Graaf et al. 2006). Ein reguliertes Wechselspiel zwischen Endozytose und Exozytose wurde für die drei Mitglieder (TRPML1, TRPML2 und TRPML3) der Mucolipinfamilie gezeigt (Flores und Jaime 2011). Der TRPML3-Kanal, welcher durch extrazelluläre Protonen reguliert wird und beim Mensch im Fall von Mutationen Pigmentstörungen und Taubheit hervorrufen kann, zeigt eine wechselnde Lokalisation zwischen Plasmamembran und einem intrazellulären Kompartiment, die durch Dynaminvermittelte Endozytose gesteuert wird (Di Palma et al. 2002; Kim et al. 2009). Eine ähnlich variable Lokalisation innerhalb klassischer intrazellulärer Kompartimente wurde für TRPML1 gezeigt, wobei dieser Kanal überwiegend in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Mutationen dieses Kanaltyps gehen mit Mukolipidose Typ IV einer neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankung einher (Dong et al. 2008). Ein weiterer Vertreter dieser Familie, das TRPML2, lokalisiert hauptsächlich in frühen Endosomen und ist außerdem in die Sortierung GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerter Proteine involviert (Karacsonyi, Miguel, und Puertollano 2007; Bach et al. 2010) Für Vertreter der TRPC4 und TRPV4-Kanäle wurde eine rasche Internalisierung beschrieben, welche durch Ubiquitinierung vermittelt wird, was ebenfalls zu den klassischen Regulationsmechanismen von GPCRs zählt (Wojcikiewicz 2004; Wegierski et al. 2006).

3.2.1 Lichtabhängige Internalisierung des Ionenkanals TRPL aus Drosophila melanogaster

Der Ionenkanal TRPL (TRP like) besitzt klassische Strukturelemente der TRP-Superfamilie, darunter sechs Transmembrandomänen, intrazelluläre N- und C-Termini sowie eine TRP-Domäne, deren Funktion gegenwärtig noch nicht geklärt werden konnte (Abb. 2). Darüber hinaus verfügt der TRPL-Kanal über mehrere Ankyrin-Bindedomänen, welche in der Lage sind, Interaktionen zwischen Proteinen zu vermitteln (Sedgwick und Smerdon 1999). Des Weiteren existieren zwei Calmodulin-Bindestellen, die Interaktionen mit Calmodulin einem hochkonservierten Ca²⁺-bindenden Protein vermitteln und an der Abschaltung des TRPL-Kanals beteiligt sind (Scott und Zuker 1997). Der TRPL-Kanal wird gemeinsam mit dem homologen TRP-Kanal in Drosophila Photorezeptoren exprimiert und bei Belichtung durch die Phototransduktionskaskade aktiviert (Abb. 3). Neben seiner Funktion in der visuellen Signalkaskade im Komplexauge von Drosophila wird der TRPL-Kanal außerdem in Epithelzellen der Malpighischen Gefäße exprimiert, wo er in die Kontrolle des Flüssigkeitstransportes involviert ist (Wang et al. 2004; MacPherson et al. 2005). Der TRPL-Kanal übt darüber hinaus auch eine Funktion bei der Temperaturwahrnehmung im Larvenstadium aus, genauer gesagt in der Vermeidung von Kälte. Die beiden Kanäle TRPL und TRP tragen demnach zur Realisierung der stark ausgeprägten Temperaturpräferenz von Drosophila melanogaster bei. Bemerkenswert ist außerdem, dass dieser Mechanismus vollkommen unabhängig von Schlüsselkomponenten der Photosignalkaskade zu sein scheint, da er weder PLCB noch INAF benötigt (Rosenzweig, Kang, und Garrity 2008).



Abbildung 2: Schematische Darstellung des TRPL-Kanals. Gezeigt sind Ankyrin-Bindedomänen (A), Porenregion (P), TRP-Domäne und Calmodulin-Bindestelle (CaM). Verändert nach Oberacker, 2011.

Vor kurzem wurde noch eine weitere Funktion des TRPL-Kanals aufgedeckt. Demnach sind die beiden Kanäle TRP und TRPL zusammen mit dem spannungsgesteuerten Calcium-Kanal Cacophony auch an der Induktion der Exozytose von synaptischen Vesikeln in der Lamina beteiligt, indem sie dort einen Ca²⁺-Einstrom vermitteln. Es wird darüber hinaus vermutet, dass es sich hierbei um einen speicheraktivierten ("store-operated") Einstrom handelt. Neben TRP und TRPL sind an diesem Prozess auch PLC β und die Proteinkinase C beteiligt, Proteine denen außerdem eine Schlüsselfunktion in der Phototransduktionskaskade in *Drosophila* zukommt (Astorga et al. 2012). Die visuelle Signalkaskade im Komplexauge von *Drosophila* wird durch Absorption von Photonen durch Rhodopsin1 aktiviert (Hardie und Raghu 2001; Wang und Montell 2007; Tian et al. 2012), was zu einer Konformationsänderung von Rhodopsin1 hin zur aktiven Form, dem Metarhodopsin führt. Dadurch wird ein heterotrimeres G_q-Protein aktiviert, was letztlich zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) durch dessen α - Untereinheit führt (Bloomquist et al. 1988; Lee et al. 1994).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade im Mikrovillus einer Photorezeptorzelle. Dargestellt sind Schlüsselkomponenten der Signalkaskade innerhalb der rhabdomerischen Membran. Links oben ist eine Photorezeptorzelle dargestellt, neben der sich ein vergrößerter Ausschnitt des Rhabdomers befindet. Dieser veranschaulicht den Aufbau aus mehreren Mikrovilli. Im unteren Teil befindet sich der vergrößerte Ausschnitt eines Teilbereichs der rhabdomerischen Membran, welcher Schlüsselkomponenten der Signalkaskade beherbergt. Verändert nach Harris und Lim 2001.

Anschließend werden durch PLC_β-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die beiden second messenger Inositol-1, 4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet (Zuker 1996; Hardie and Raghu 2001; Paulsen et al. 2001). Was die darauffolgende Öffnung der beiden Kationenkanäle TRP und TRPL (Phillips, Bull, und Kelly 1992) angeht, werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Mehrere Arbeitsgruppen schreiben freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA: "polyunsaturated fatty acids"), welche durch Hydrolyse von DAG entstehen könnten, eine prominente Rolle im Öffnungsmechanismus zu (Chyb, Raghu, und Hardie 1999; Minke und Parnas 2006; Jörs et al. 2006). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Kanalöffnung durch die Aktivität der Phospholipase Cß vermittelt wird, welche gleichzeitig zu einer Abnahme von PIP₂ sowie zur lokalen Ansäuerung des mikrovillären Lumens führt, was letztlich eine Öffnung der beiden Kanäle TRP und TRPL zur Folge hat (Huang et al. 2010). Der durch die Kanalöffnung vermittelte Kationen-Einstrom trägt nun zur Ausbildung eines depolarisierenden Rezeptorpotentials bei (Minke und Cook 2002). Essentielle Komponenten der Phototransduktionskaskade bilden mit Hilfe des multivalenten PDZ-Domänenproteins InaD (inactivation no afterpotential D) (Shieh und Niemeyer 1995; Harris und Lim 2001) einen supramolekularen Multiprotein-Komplex, der mittels TRP in der Membran verankert wird (Abb.3). Weitere Bestandteile des Komplexes sind die Phospholipase Cß und die augenspezifische Proteinkinase C (ePKC), welche vermutlich die Beendigung der Signalantwort vermitteln (Huber et al. 1998; Popescu, Ham, und Shieh 2006).

Eine Besonderheit des TRPL-Kanals ist sein lichtinduziertes Translokationsverhalten, welches als Langzeitadaptionsmechanismus zur Anpassung an geänderte Lichtverhältnisse beschrieben wurde (Bähner et al. 2002). In dunkeladaptierten Fliegen ist der TRPL-Kanal innerhalb der rhabdomerischen Membran lokalisiert, wohingegen er lichtinduziert in ein unbekanntes Speicherkompartiment im Zellkörper der Photorezeptorzelle gelangt (Meyer et al. 2006). Der zugrundeliegende Transportmechanismus wurde als zweistufiger Prozess beschrieben, wobei der Kanal in der ersten schnellen Transportphase innerhalb weniger Minuten an die Basis der Rhabdomere und in die angrenzende Stalk Membran gelangt (Cronin, Lieu, und Tsunoda 2006) (Abb. 4C). Der Mechanismus dieses ersten Stadiums wurde vor kurzem als ATP-unabhängiger lateraler Diffussionsprozess beschrieben, welcher nicht der Funktion des Aktin-Zytoskeletts bedarf. Die Translokation von TRPL soll dabei passiv durch die lichtinduzierte Freisetzung von einem hypothetischen Ankerprotein im Rhabdomer erfolgen (Lieu et al. 2012). In der Arbeit von Lieu et al. wurde überdies gezeigt, dass das erste Translokationsstadium von TRPL Dynamin-unabhängig ist, allerdings ist weiterhin unklar, ob dies auch für das zweite Stadium gilt. Des Weiteren wurde demonstriert, dass die Translokationsgeschwindigkeit im ersten Stadium bei einer Erhöhung des Sterolgehaltes innerhalb der rhabdomerischen Membran abnimmt (Lieu et al. 2012). Die zweite Phase bedarf mehrstündiger Belichtung und führt letztendlich zu einer Lokalisation in einem Speicherkompartiment innerhalb des Zellkörpers der Photorezeptorzelle (Cronin et al. 2006; Meyer et al. 2008).

Die Komplexaugen von *D. melanogaster*, in welchen sich die Translokation von TRPL abspielt, bestehen jeweils aus ca. 800 Einzelaugen oder Ommatidien (Hardie 1985) (Abb. 4), wobei ein einzelnes Ommatidium wiederum aus mehreren verschiedenen Zelltypen aufgebaut wird, darunter acht Photorezeptorzellen (R1 – R8) sowie verschiedene Pigmentzellen. Im apikalen Bereich schließt es mit dem dioptrischen Apparat ab, der aus Linse und Kristallkegel gebildet wird (Abb. 4A).



Abbildung 4: Aufbau der Ommatidien aus den Komplexaugen von Drosophila melanogaster. A): Übersicht über den Aufbau eines Ommatidiums. B): Schematische Darstellung einer einzelnen Photorezeptorzelle unterteilt in Mikrovillisaum, der das Rhabdomer bildet, sowie dem Zellkörper (Z). C): Anordnung der Photorezeptorzellen eines Ommatidiums mit sechs peripheren Rhabdomeren R1-R6 sowie einem der beiden zentralen (R7) Rhabdomere. Verändert nach Spencer et al. 2001; Montell 2012.

Die Translokation des TRPL-Kanals erfordert zwingend die Aktivierung der Phototransduktionskaskade und ist in Mutanten, welchen Rhodopsin1 oder die Phospholipase C β , fehlt vollständig unterbunden (Meyer et al. 2006), wobei der lichtinduzierte Ca²-Einstrom letztlich hinreichend ist, um die Translokation des TRPL-Kanals zu triggern.

Die Ca²⁺-Abhängigkeit der Wanderung wurde zudem durch *in vivo* Experimente anhand isolierter Retinae belegt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration ausreichend ist, um die Translokation des TRPLs zu induzieren (Meyer et al. 2006).

Mehrere Arbeitsgruppen trugen durch ihre Ergebnisse zu der Erkenntnis bei, dass es sich bei dem beschriebenen lichtabhängigen Translokationsverhalten nicht um eine Kombination von Degradation und *de novo* Synthese sondern um einen Recylingprozess handelt, (Bähner et al. 2002; Lieu et al. 2012). Die Stabilität des TRPL-Kanals scheint durch Arrestin2 beeinflusst zu sein, was zu einem zeitabhängigen Abbau von TRPL in *arr2*-Mutanten führt. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Arrestin2 für den TRPL-Kanal die Funktion eines Ankerproteins ausübt, um dessen Retention innerhalb der Rhabdomere zu gewährleisten, bis schließlich die Interaktion der beiden Partner durch den lichtabhängigen Ca²⁺- Einstrom durch den TRP-Kanal aufgehoben wird und TRPL das Rhabdomer verlassen kann (Cronin et al. 2006).

3.2.2 Stimulus-induzierte Translokation weiterer Komponenten der Signalkaskade

Neben dem TRPL-Kanal zeigen noch weitere Komponenten der visuellen Signalkaskade eine lichtinduzierte Translokation zwischen Rhabdomer und Zellkörper, was insgesamt zur Ausbildung eines fein abstimmbaren Adaptionsmechanismus beiträgt (Frechter und Minke 2006).

Eines dieser Proteine ist die α -Untereinheit des G_q-Proteins, welche lichtabhängig das Rhabdomer verlässt, um in den Zellkörper der Photorezeptorzelle zu gelangen, was mit einer Abnahme der Lichtsensitivität der Photorezeptorzelle einhergeht (Frechter et al. 2007) (Abb. 5). Die Translokation von G_q α ist ein schneller Adaptionsmechanismus, welcher in weniger als fünf Minuten vollzogen ist. Überdies konnte ein Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und der Menge an translozierendem G_q α -Protein nachgewiesen werden; je höher die Lichtintensität ist, desto mehr G_q α -Moleküle verlassen das Rhabdomer. Was den Mechanismus des Transports angeht, wurde eine Abhängigkeit des Transportvorganges von Rhodopsin1 nachgewiesen (Cronin, Diao, und Tsunoda 2004). Bei Dunkelheit gelangt die inaktive G_q α -Untereinheit wieder in die rhabdomerische Membran zurück, und bindet erneut an die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Elektronenmikroskopische Studien ergaben, dass dieser Translokationsvorgang Änderungen in der Struktur der Rhabdomere hervorruft (Kosloff et al. 2003). Ein weiteres Protein, das seine subzelluläre Lokalisation lichtabhängig ändert, ist Arrestin2 (Abb. 5).

Während TRPL und $G_q \alpha$ bei Belichtung das Rhabdomer verlassen, zeigt Arrestin2 ein entgegengerichtetes Wanderungsverhalten. Arrestin2 transloziert bei lichtinduzierter Aktivierung der Signalkaskade vom Zytosol ins Rhabdomer, wo es durch Bindung an Metarhodopsin zu einer Beendigung der Signalweiterleitung führt indem es eine erneute Aktivierung der $G_q \alpha$ -Untereinheit unterbindet (Byk et al. 1993). Es konnte weiterhin durch Analyse von Mutanten mit defektem Phosphoinositol-Stoffwechsel gezeigt werden, dass die Wanderung des Arrestin2 PIP₃-abhängig erfolgt. Überdies bindet Arr2 in vitro an PIP₃, was diese These stützt (Lee et al. 2003). Die Abhängigkeit der Arrestin2-Translokation vom unkonventionellen Myosin NINAC wird seit längerem kontrovers diskutiert, da bezüglich dieser Thematik widersprüchliche Daten vorliegen. Während eine Arbeitsgruppe NINAC eine essentielle Funktion in der Translokation des Arr2 zuschreibt (Lee et al. 2003; Lee und Montell 2004b), beschreiben andere Arbeitsgruppen eine NINAC-unabhängige Translokation von Arrestin2 (Satoh et al. 2005; Liu et al. 2008).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der stimulus-induzierten Translokation weiterer Komponenten der Signalkaskade in den Photorezeptorzellen von Drosophila. In dunkeladaptierten Fliegen lokalisieren sowohl $G_q \alpha$ als auch TRPL innerhalb des Rhabdomers und gelangen bei Belichtung ins Zytosol der Photorezeptorzelle. Im Gegensatz dazu steht die Translokation des Arrestin2, welches bei Belichtung vom Zellkörper ins Rhabdomer gelangt. Verändert nach Wang und Montell 2007.

Kürzlich gelang es allerdings, die Beziehung zwischen Arrestin2 und dem unkonventionellen Myosin NINAC in Bezug auf ihre gemeinsame Funktion in der Inaktivierung von Metarhodopsin aufzuklären. Die zugrunde liegenden Untersuchungen belegen eindeutig, dass die Translokation von Arr2 nicht durch das Motorprotein NINAC vermittelt wird. Der Mechanismus stellt sich vielmehr folgendermaßen dar: In Abwesenheit von Ca^{2+} , wie sie bei Dunkelheit vorkommt, unterliegt Arr2 einer NINAC-vermittelten Sequestrierung im Zytoplasma der Photorezeptorzelle.

Steigt nun bei lichtabhängiger Aktivierung der Signalkaskade der Ca²⁺- Spiegel, so führt dies, vermittelt durch die Bindung von Calmodulin an NINAC, zu einer Freisetzung des Arrestin2 und somit letztendlich zu einer Inaktivierung des Metarhodopsins. Dieser Umstand erklärt auch die bereits zuvor beschriebene starke Verlangsamung der Arr2-Translokation in Mutanten denen Schlüsselkomponenten der Signalkaskade fehlen (z.B. PLC β und TRP), welche den Ca²⁺-Einstrom unterbinden (Hardie, Satoh, und Liu 2012).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Arrestin2-Translokation kein aktiver Prozess sondern vermutlich eine reine Diffusion ist, welche durch die Bindung an aktives Metarhodopsin getriggert wird (Satoh et al. 2010).

4 Fragestellung

Der TRPL-Ionenkanal aus *Drosophila* zeigt ein lichtinduziertes Translokationsverhalten. Während er sich in dunkeladaptierten Fliegen innerhalb der rhabdomerischen Membran befindet, transloziert er bei Belichtung in ein zytosolisches Speicherkompartiment. Die Translokation des TRPL-Kanals wird als Recyclingmechanismus beschrieben und dient vermutlich der langfristigen Adaption an verschiedene Lichtbedingungen (Bähner et al. 2002; Meyer et al. 2006). Der zugrundeliegende Mechanismus dieses Transportes ist bisher größtenteils ungeklärt. Allerdings wird im Fall des TRPL-Kanals ein vesikulärer Transport vermutet, was durch erste immunzytochemische Analysen bestätigt werden konnte. Ferner konnten Kolokalisationen zwischen Rhodopsin1, einem weiteren rhabdomerischen Protein, welches einer lichtabhängigen Endozytose unterliegt, und TRPL innerhalb dieser endozytotischen Vesikel beobachtet werden, was auf einen gemeinsam genutzten Transportweg hindeutet (Oberegelsbacher et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die bei Belichtung auftretenden TRPL-positiven Vesikel näher untersucht und quantifiziert werden. Von Interesse war hierbei zum einen die zeitliche Dynamik der Endozytose, die im Rahmen von Zeitverläufen auch im Hinblick auf Kolokalisationen mit Rhodopsin1 untersucht werden sollte.

Zum anderen sollte geklärt werden, worin die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen den beiden Internalisierungsvorgängen liegen, beispielsweise hinsichtlich der Aktivierung der Translokation. Hierfür sollten verschiedene Mutanten bezüglich ihres Einflusses auf die TRPL- bzw. Rh1-Endozytose untersucht werden.

Die Endozytose von Rhodopsin1 wird durch Dynamin vermittelt, daher sollte der Einfluss dieses Proteins auf die Internalisierung des TRPLs geprüft werden, da eine Beteiligung durch den beobachteten gemeinsamen Internalisierungsweg denkbar war. Die Endozytose von Rhodopsin1 wird durch das monomere G-Protein Rab5 vermittelt, was eine Beteiligung von Rab-Proteinen am Transport des TRPL-Kanals nahe legte. Dieser Frage sollte nun in Form eines umfassenden Screens dominant negativer Rab-Mutanten in *Drosophila* nachgegangen werden.

Die Internalisierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors Rhodopsin1 wird klassisch durch Arrestine vermittelt, während eine Beteiligung dieser Proteinen an der Endozytose des TRPL-Kanals widerlegt werden konnte. Allerdings spielt Arrestin2 eine essentielle Rolle hinsichtlich der Stabilität des TRPL-Proteins, die sich in einem zeitabhängigen Abbau des TRPL-Proteins in *arr2*-Mutanten manifestiert. Dieser zeitabhängige Abbau sollte anhand verschiedener *arr2*-Allele auch im Hinblick auf eine etwaige Lichtabhängigkeit charakterisiert werden.

Bisher gelang es nicht die Lokalisation des TRPL-Kanals in helladaptierten Fliegen zu bestimmen. Daher sollte die subzelluläre Lokalisation des TRPL-Kanals durch Verwendung geeigneter Reporter-Fliegen, welche Fluoreszenzmarker für intrazelluläre Kompartimente exprimieren untersucht werden. Bei erneuter Dunkeladaption gelangt der TRPL-Kanal zurück ins Rhabdomer, wohingegen internalisiertes Rhodopsin1 einem lysosomalen Abbau zugeführt wird. Dieser Unterschied, das Schicksal des internalisierten Proteins betreffend, sollte mit Hilfe eines Lysotrackers analysiert werden. Dadurch sollte abschließend geklärt werden, ob es sich im Fall des TRPLs tatsächlich um einen vollständigen Recyclingmechanismus handelt oder ob Teile des internalisierten TRPLs einer lysosomalen Degradation unterliegen.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit ("pro analysi") und wurden sofern nicht anders vermerkt von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Weitere Chemikalien und sonstige Labormaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Verbrauchsmaterialien:

Blotpapier Whatman 3 MM Schleicher & Schuell (Dassel) **ECL Plus Western Blotting** GE Healthcare (München) **Detection Reagents** Greiner- Kunststoffröhrchen Greiner Bio-One (Frickenhausen) Immersionsöl Zeiss (Jena) "Immersol" 518 F fluoreszenzfrei Kanülen B. Braun (Melsungen) 0,80 x 40 mm 0,45 x 25 mm Molekulargewichtsstandard: BioRad (München) Mowiol 4.88 Polysciences Inc. (Eppelheim) Objektträger und Deckgläschen Carl Roth (Karlsruhe) PapPen[®] Daido Sangyo Co. (Japan) Precision Plus Protein Standards 10- 250 kDa PS-Rundboden Röhrchen Greiner Bio-One (Frickenhausen) **PVDF** - Membran BioRad (München) Tissue Tek[®] Einbettmedium Sakura Finetek LR-White Härtegrad "hard" Fa. Mikrotechnik EM, München

5.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1x SDS-Extraktionspuffer	4% (w/v) SDS
	65 mM Tris/HCl, pH 6, 8
5x SDS-PAGE Ladepuffer	4% (w/v) SDS
	50 mM Tris/HCl, pH 6, 8
	0,17M SDS
	20% (w/v) Glycerin
	0, 01% (w/v) Bromphenolblau
	5% (v/v) β -Mercaptoethanol
4x SDS-PAGE Trenngelpuffer	1, 5 M Tris/HCl, pH 8, 8
	0, 4% (w/v) SDS
4x SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0, 5 M Tris/HCl, pH 6, 8
	0, 4% (w/v) SDS
1x SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0, 1% (w/v) SDS
1 x Blotpuffer	48 mM Tris
	39 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol
1x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlsg.)	17,5 mM NaCl
	8,41 mM Na2HPO4
	1,86 mM NaH2PO4
	pH 7,2
0,1M Phosphatpuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄
	0,1M NaH ₂ PO ₄
	pH 7,2
TBS-T	50mM Tris/HCl, pH 7,3
(Tris-gepufferte Salzlsg. mit Tween)	50mM NaCl
	0, 1% (w/v) Tween 20
Mowiol 4.88	25, 6% Mowiol 4.88
	2, 5% n-Propyl-Gallat
	51% Glycin in 1x PBS
2 x Cacodylatpuffer	0,1M Na-Cacodylat
	8,4M HCL

5.1.3 Antikörper und Fluoreszenzmarker

Die folgende Tabelle beinhaltet alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit für Western-Blots (WB), Immunzytochemie (IC) und Elektronenmikroskopie (EM) eingesetzt wurden.

Primäre	Antikörper
1 minute	Antikorper

Antikörper	erzeugt in:	Verdünnung	Referenz
α-DmTRP MAb83F6-c	Maus	1: 2000 (WB)	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa
α-DmTRPL	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:20 (IC)	Pineda (Berlin)
α-DmRh1 4C5	Maus	1:1000 (WB) 1:50 (IC) 1:100 (EM)	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa
α-GFP	Maus	1:50 (IC)	Roche (Mannheim)

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Sekundäre Antikö	rper für Immunz	ytochemie und Im	nmunelektroner	imikroskopie
------------------	-----------------	------------------	----------------	--------------

Antikörper	gekoppelt mit	gerichtet gegen:	Verdünnung	Referenz	
Goat α-rabbit IgG	ALF680	IgG aus Kaninchen	1:20	Invitrogen	
Goat α-mouse IgG	ALF 488	IgG aus Maus	1:20	mvnuogen	
Goat a-mouse IaG	Nanogold	IgG aus Maus	1:100	Nanoprobes,	
Gout u-mouse igo				Yaphank, USA	

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper für Immunzytochemie und EM

Fluoreszenzmarker für Immunzytochemie

Farbstoff	Gerichtet gegen:	Verdünnung	Referenz
Phalloidin 546	F-Aktin	1:600	Invitrogen
DAPI	DNA	1:1000	Sigma
Lysotracker® Blue DND-22	Lysosomen	800 nM	Invitrogen

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmarker

Antikörper	gerichtet gegen	Verdünnung	Referenz
Peroxidase labeled	IgG aus Kaninchen	1:10 000	Sigma
α-rabbit IgG			
Peroxidase labeled	IgG aus Maus	1:10 000	Sigma
α-mouse IgG			

Sekundäre Antikörper für Western Blots

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper für Western Blot

5.1.4 Fliegenstämme

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Drosophila-Stämme aufgelistet.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz/Quelle
Wildtyp	(w) OregonR	Laboreigen
TRPL-eGFP	yw, trpl-eGFP;;	Meyer <i>et al.</i> , 2006
ninaE ¹⁷	yw;; <i>ninaE</i> ¹⁷	O'Tousa et al., 1985
Gaq ¹	$w;Gaq^{I}$	Schott et al., 1995
Gqα konstitutiv aktiv	<i>yw;P[Rh1>DGqα 203m; w</i> ⁺]	B. Minke
Gqα konstitutiv aktiv; trp^{P343}	<i>yw;P[Rh1>DGqα 203m; w</i> ⁺]	diese Arbeit
trp^{P343}	yw;; <i>trp</i> ^{P343}	Pak et al., 1979
tes ¹	w;cn,tes ¹	Han et al., 2006
$arr2^{3}$	w;; $arr2^3$ st	Dolph et al., 1993
$arr2^5$	$w;;arr2^5$ st	Dolph et al., 1993
$arr2^5$, trp^{P343}	;;arr2 ⁵ ,trp ^{P343}	diese Arbeit
shi ^{ts1}	$w^{[1118]} shi^{[1]}$	Grigliatti et al., 1973
TRPL-eGFP; $arr2^3$	yw,trpl-eGFP; arr2 ³	diese Arbeit
w; Rh3	w;; <i>ninaE¹⁷,pRh1+3</i>	Feiler et al.,1992
$ninaC^5$	w; nina C^5	Pak et al., 1979
inaC ^{P209}	w;inaC ^{P209}	Smith et al., 1991
norpA	w, norpA ^{P24}	Bloomquist et al., 1988

		Ratnakumar und Desplan
Rh1-Gal4	;;P{ry ^[+t7.2] =Rh1-GAL4}3, ry ^[506]	Bloomington Stock
		Center
Treiberstamm mit	yw, 1RPL- eGFP;;P{ $ry^{[+t7.2]}$ =Rh1-GAL4}3,	diese Arbeit
TRPL-eGFP	ry ^[506]	
Treiberstamm mit TRPL-HcRed	yw; P[pRh1>trpl-HcRed, y+];	
	$P{ry^{I+1/2} = Rh1-GAL4}3, ry^{[506]}$	diese Arbeit
TRPL-HcRed	yw; P[pRh1>trpl-HcRed, y+]	Richter 2007
Treiberstamm IC	yw,;; P{ $ry^{[+t7.2]}$ =Rh1-GAL4}3, $ry^{[506]}$	diese Arbeit
Dominant negative Rab- Mutanten 2. Chromosom	$y^{[1]}w^{[*]};P\{w[+mC]=UASp-YFP.Rab\};$	Zhang et al., 2007 Bloomington Stock
Dominant negative Rab- Mutanten 3. Chromosom	y ^[1] w ^[*] ;;P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab}	Center
Rh1-GFP	P[Rh1>Rh1-GFP; TM2/MKRS]	Mecklenburg et al., 2010
Rab11-GFP	w*; P{UAS-Rab11-GFP}2	Chang 2004 Bloomington Stock Center
UAS-GFP.KDEL	w*; P{UAS-GFP.KDEL}15.2/TM6B, Tb1	Irvine 2007
		Bloomington Stock
		Center
UAS-Grasp65-GFP	w*; P{UAS-Grasp65-GFP}2	Chang 2004 Bloomington Stock
0715-0145905-011		Center
UAS-GalT-GFP	w[*]; P{w[+mC]=UASp-GFP.Golgi}1	Rikhy und Lippincott-
		Schwartz 2010
		Bloomington Stock Center
UAS-γCop-eGFP		Grieder 2010
	w[*]; P{w[+mC]=UASp-γCop.EGFP}3	Bloomington Stock
		Center
		Cook 2009
UAS-SKL-GFP	w[*]; P{w[+mC]=UAS-GFP.SKL}3	Bloomington Stock

UAS-KDEL-RFP		Rikhy und Lippincott-
	w[*]; P{w[+mC]=UASp-	Schwartz 2010
	RFP.KDEL}10/TM3, Sb[1]	Bloomington Stock
		Center

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Fliegenstämme

5.1.5 Soft- und Hardware, spezielle Geräte

Gefriermikrotom
Ultramikrotom (Ultracut S)
Diamantmesser
Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop
Transmissionselektronenmikroskop
Elektrophoresekammer
(Mini Protean II Electrophoresis Cell)
Semi-Dry Blotapparatur, Transblot SD
Tischzentrifuge (MiniSpin®)
Bildbearbeitung
Dokumentationssystem Westernblot:
Chemi Doc™ XRS+

CM30505 Leica Microsystems, Bensheim Reichert-Jung, Wien, Österreich Diatom, Biel, Schweiz Axio Imager.Z1m, Zeiss (Jena) Tecnai 12 (Fa. FEI, Eindhoven, NL)Vertikale BioRad (Freiburg)

Eppendorf (Hamburg) Adobe Photoshop CS3 Biorad (Freiburg)

5.2 Methoden

5.2.1 Fliegenzucht und Haltung

Die Aufzucht und Haltung der Fliegen erfolgte auf Standard Maismehl Nährmedium (5% (w/v) Maismehl, 3,2% (w/v) Zucker, 1,2% (w/v) Agar, 2,4% Frischhefe, 0,5% (v/v) Propionsäure, 0,0064% (w/v) 4-Hydroxybenzoemethylester, Ascorbinsäure) in speziellen Kunststoff-Zuchtgefäßen. Die Tiere wurden bei 25°C im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) gehalten.

5.2.2 Belichtung der Fliegen

Für einige, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, Experimente wurden die zu untersuchenden Fliegen in farbigen Plexiglasboxen belichtet. Als Lichtquelle diente hierbei eine handelsübliche neutralweiße Neonröhre (Osram). Die nachfolgende Abbildung stellt die Transmissionsspektren der verwendeten Farbfilter dar.



Abbildung 6: Transmissionsspektren der verwendeten Farbfilter. Die Transmissionen der in dieser Arbeit verwendeten farbigen Plexiglasboxen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Verändert nach O. Voolstra.
5.2.3 Proteinextraktion aus Fliegenköpfen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden (insofern nicht gesondert darauf hingewiesen wurde) ein bis vier Tage alte Fliegen unter einem Binokular (Stemi 2000, Fa. Zeiss) im Weißlicht (lichtadaptierte Fliegen) bzw. im Rotlicht (dunkeladaptierte Fliegen) präpariert. Nach der Betäubung auf Eis wurden die Köpfe mittels Pinzetten vom Körper abgetrennt. Jeweils 15 Köpfe wurden in 30µl 1x SDS-PAGE Extraktionspuffer überführt. Die Köpfe wurden anschließend homogenisiert und danach 30 min bei RT extrahiert. Zur Sedimentierung der Chitinreste wurden die Homogenate zehn min bei 13,000g (RT) zentrifugiert. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C eingefroren. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurde 5 x Ladepuffer hinzugefügt.

5.2.4 SDS-PAGE: Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte in vertikalen Flachgelen mit einer Dicke von 1 mm. Es wurden Trenn- und Sammelgele in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgelpuffer pH 6,8, Trenngelpuffer pH 8,8, Elektrodenpuffer pH 8,4) verwendet. Die Acrylamid- und Bisacrylamid-Konzentrationen wurde durch Mischung einer kommerziell erhältlichen 40%-Lösung hergestellt (Fa. Carl Roth; Mischungsverhältnis 37,5:1). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in Kapitel 5.1.2 aufgeführt.

5.2.4.1 Western-Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotapparatur auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert.

Zur Aktivierung wurde die Membran vorher kurz mit Methanol benetzt. Membran und Gel wurden anschließend drei min in 1x Blotpuffer äquilibriert. Auf die untere Elektrode der Blotapparatur wurden drei Lagen Blotpuffer getränktes Whatman-Filterpapier gelegt. Es folgte die PVDF-Membran und das Gel, auf welches wiederum drei Lagen mit getränktem Whatman-Filterpapier gelegt wurden. Die Blotapparatur wurde anschließend durch Auflegen der zweiten Elektrode geschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1mA/cm² Membranfläche für 1 h. Danach wurde die Membran in Milch (5% Skim Milk bzw. Magermilchpulver in TBS-T) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht. Nach dieser Antikörperinkubation folgten drei Waschschritte mit TBS-T. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 bis 2h. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die Membran wurde nun nochmals mit TBS-T gewaschen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des ECL-Plus-Kits am Dokumentationssystem Chemi DocTM XRS+ (BioRad, Freiburg).

5.2.5 Wasserimmersionsmikroskopie

Für die quantitative Analyse der Translokation des TRPL-eGFP Fusionsproteins *in vivo* wurden Fliegen im Alter von zwei bis vier Tagen verwendet. Die Fliegen wurden auf Eis betäubt und anschließend mit einer Insektennadel und Plastilin auf einem Objektträger fixiert. Die Epifluoreszenz wurde mit einem 20-fachen Wasserimmersionsobjektiv dokumentiert. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberlampe (100W, ebq 100 dc-1; Fa. Jena GmbH). Die Anregung des eGFPs erfolgte unter Verwendung des Filtersatzes 43 HE (Tabelle 6).

5.2.5.1 Quantifizieren von Fluoreszenzsignalen

Zur Berechnung der relativen TRPL-eGFP-Menge innerhalb der Rhabdomere wurden die wasserimmersionsmikroskopischen Bilder mit Hilfe der frei erhältlichen Software ImageJ analysiert. Pro Bild wurde die Fluoreszenzintensität von fünf nebeneinanderliegenden Ommatidien bestimmt. Für jedes Ommatidium wurden 13 Messwerte bestimmt: Sechs Messungen innerhalb der Rhabdomere (Ir, Kreisgröße: 1 x 1), anschließend werden sechs Messpunkte im Zellkörper gewählt, die sich außerhalb der Rhabdomere befinden sollten (Ic, Kreisgröße: 1 x 1). Ein weiterer Messpunkt (Kreisgröße 1 x 1) wird innerhalb des zentralen Rhabdomers (R7/R8) als Hintergrundwert bestimmt. Anschließend werden jeweils die Mittelwerte gebildet. Aus den gesammelten Mittelwerten wird die relative TRPL-eGFP-Menge im Rhabdomer (R) mittels folgender Formel berechnet:

Ir = Intensität Rhabdomere Ic = Intensität Zellkörper $R = \frac{Ir - Ib}{(Ir - Ib) + (Ic - Ib)}$ Ib = Intensität background

Die berechneten Werte wurden auf die Werte für dunkeladaptierte Fliegen normiert.

5.2.6 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersätze.

Fluorochrom	Emission [nm]	Excitation [nm]	Filter set (Zeiss)
Alexa Fluor 546	605	550	43 HE
Alexa Fluor 488	525	470	38 HE
Alexa Fluor 680	725	665	32
DAPI	445	365	49

 Tabelle 6: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Filtersätze

5.2.6.1 Fliegenpräparation für Immunzytochemie

Die Fliegen wurden über Nacht in einer Dunkelbox gehalten und (je nach Experiment) anschließend in einer farbigen Plexiglasbox oder mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden die Fliegen auf Eis betäubt und danach unter einem Binokular (Stemi 2000-C, Zeiss) unter Verwendung einer Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Zeiss) präpariert, wobei dunkeladaptierte Fliegen bei Rotlicht präpariert wurden. Der Kopf wurde entfernt und mittels Skalpell halbiert. Die gewonnenen Kopfhälften wurden 1h bei RT fixiert (2% Paraformaldehyd in PBS pH 7,2) und anschließend mit 0,1M PBS gewaschen. Darauf erfolgte eine Infiltration mit Saccharose (10%-25% Lösung in 0,1M PBS) bei Raumtemperatur. Der letzte Infiltrationsschritt erfolgte in einer 50% Lösung bei 4°C über Nacht.

5.2.6.2 Herstellung der Präparate

Die halbierten Köpfe wurden in gekochte Kalbsleber eingebettet und mit Tissue Tek® (Fa. Sakura Finetek) bedeckt. Für Querschnitte wurden die Augen mit der Cornea noch oben in der Leber platziert. Für Längsschnitte wurden die Ocellen nach oben orientiert. Die Präparate wurden danach in schmelzendem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80 °C eingefroren. Die fertigen Präparate wurden am nächsten Tag am Gefriermikrotom bei einer Objekttemperatur von – 28 °C und einer Boxtemperatur von – 28°C geschnitten. Die Schnitte (10µm) wurden auf Deckgläser, die zuvor mit 0,01% Poly-L-Lysin beschichtet wurden, übertragen. Die Qualität der Schnitte wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Axiovert 40 C, Zeiss) überprüft, wobei geeignete Schnitte mit PapPen® umrandet und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren wurden.

5.2.6.3 Antikörpermarkierung und Auswertung der Kryoschnitte

Die nachfolgende Markierung mittels Antikörpern erforderte eine vorherige Fixierung der Cryoschnitte (2% Paraformaldehyd in 1x PBS). Daran schlossen sich zwei Waschschritte in 1x PBS an. Die zweistündige Blockierung erfolgte in PBS-T (1% (w/v) BSA, 0,3% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS). Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte (in PBS-T) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Schließlich wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit den fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern in Blockierungslösung für vier Stunden im Dunklen bei RT inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Schnitte wurden nach einem letzten Waschschritt in Mowiol (25,6% (w/v) Mowiol 4.88, 2,5% (w/v) n-Propyl-Gallat, 51% (v/v) Glycin in 1x PBS) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines aufrechten Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.Z1m, Zeiss) und dem Programm Axiovision Rel. 4.6.

5.2.7 Quantifizieren von Vesikeln

Um die Anzahl der Vesikel bei verschiedenen Lichtqualitäten oder in verschiedenen Mutanten zu bestimmen, wurde die Zahl der Vesikel in drei bis fünf verschiedenen Fliegen bestimmt, wobei jeweils mindestens acht Ommatidien in die Berechnung einflossen. Als Basis dienten hierbei Querschnitte durch Fliegenaugen, welche zuvor immunzytochemisch markiert wurden.

5.2.8 Präparation und Dokumentation isolierter Ommatidien

Fünf bis sechs Fliegen wurden auf Eis betäubt und mit Hilfe von Binokular und Kaltlichtquelle präpariert. Dabei wurden zuerst die Köpfe mit Hilfe von Pinzetten entfernt und anschließend mit einem Skalpell halbiert. Die erhaltenen Kopfhälften wurden in 20µl ", Grace's insect cell culture medium" (Fa. Gibco) überführt und unter Verwendung zweier Pinzetten zerkleinert. Anschließend wurden die Augenreste mit einem Deckgläschen "gespreitet", wobei überschüssiges Medium mit Hilfe eines Filterpapieres entfernt wurde. Die Dokumentation der Ommatidien erfolgte sofort unter einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung entsprechender Filtersätze.

5.2.8.1 Markierung von Lysosomen

Isolierte Ommatidien wurden wie in Kapitel 5.2.8 beschrieben gewonnen. Anschließend erfolgte eine Markierung mit Lysotracker[®] Blue DND-22 (800 nM in Grace's insect cell culture medium). Nach einem zehnminütigen Inkubationschritt bei RT in einer feuchten Kammer erfolgte die Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Filtersatzes 49 (Zeiss).

5.2.9 Dokumentation der tiefen Pseudopupille

Das optische Phänomen der tiefen Pseudopupille bietet eine nichtinvasive Technik um das Fusionsprotein TRPL-eGFP *in vivo* nachzuweisen. Die Pseudopupille entsteht durch Überlagerung der virtuellen Abbildungen von Rhabdomeren benachbarter Ommatidien als Folge der Superposition. Die tiefe Pseudopupille wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop, Zeiss) beobachtet. Die Fliegen wurden während der Dokumentation mit CO_2 begast. Die Belichtung erfolgte mit dem Filtersatz 32 HE (Zeiss).

5.2.10 Anfertigung von Semidünnschnitten

Die jeweiligen Fliegen wurden auf Eis betäubt. Anschließend wurden die Köpfe mit Hilfe zweier Pinzetten entfernt. Die so gewonnenen Kopfhälften wurden nun 30 min auf Eis fixiert (1% OsO4; 2% Glutaraldehyd; 50 mM Na-Cacodylat pH 7,3). Darauf folgten drei zehnminütige Waschschritte in 1 x Na-Cacodylat Puffer an die sich eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96%, 2 x 100%) zur Entwässerung anschloss. Die Kopfhälften verblieben dabei jeweils für 30 min in den Alkohol-Lösungen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation in Propylenoxid bevor die Köpfe in eine 1:2 Mischung aus Araldit (CY212, Serva) und Propylenoxid überführt wurden. Diese wurde nach 1h durch eine 1:1 Mischung ersetzt.

Nach einer erneuten einstündigen Inkubation wurden die Kopfhälften schließlich in eine 2:1 Mischung Araldit/Propylenoxid überführt, wo sie eine weitere Stunde verblieben. Anschließend wurden die Kopfhälften über Nacht in reinem Araldit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Austausch des Araldits, woran sich eine zweistündige Inkubation anschloss. Danach wurden die Kopfhälften in Förmchen überführt und zwei Tage bis zur vollständigen Polymerisation bei 60°C inkubiert. Die Semidünnschnitte (1 mm) der Fliegenaugen wurden mit einem Mikrotom der Firma Reichert und Jung (Modell 1140/Autocut) hergestellt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und bei 60°C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Kontrastierung der Rhabdomere erfolgte durch kurze Färbung mit 1% Toluidinblau/Borax. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger eingedeckelt und am Mikroskop analysiert.

5.2.11 Konventionelle Elektronenmikroskopie

Die Fliegen wurden wie gewohnt auf Eis präpariert, anschließend erfolgte eine einstündige Fixierung in einem Gemisch aus 2,5% GA und 4% PFA in 0,01M PBS (pH 7,4). Darauf folgten drei zehnminütige Waschschritte in 0,1M Na-Cacodylatpuffer bevor die Kopfhälften schließlich in 2% OsO₄ in 0,1M Na-Cacodylatpuffer für eine Stunde nachfixiert wurden. Anschließend erfolgte eine Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95% und zweimal 100% Ethanol für je zehn Minuten). Daran schloss sich eine kurze Inkubation in Propylenoxid an, bevor die Einbettung in einem 1:1 Gemisch aus Araldit/Propylenoxid über Nacht im Abzug erfolgte. Am nächsten Tag wurden die Kopfhälften in reines Araldit überführt, wo sie erneut über Nacht verblieben. Am Tag darauf erfolgte die Einbettung in kleine Förmchen, die nun für zwei Tage bei 60°C auspolymerisierten. Die Ultradünnschnitte (50-70 nm) für die elektronenmikroskopische Analyse wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert) angefertigt.

5.2.12 Immunoelektronenmikroskopie

Die auf Eis präparierten Kopfhälften wurden in einer Lösung aus 3% PFA und 0,1% Glutaraldehyd in 1x PBS für zwei Stunden bei RT fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit 0,1M Phosphatpuffer wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, zweimal 100% Ethanol) für jeweils zehn min bei Raumtemperatur entwässert. Anschließend wurden die Kopfhälften für jeweils eine Stunde mit einem 30%, 50% und einem 70% (v/v) LR-White/Ethanolgemisch infiltriert. Darauf erfolgte die Überführung der Kopfhälften in Gelatinekapseln (Fa. Plano, Wetzlar), welche mit 100% LR-White des Härtegrades "hard" (Fa. Mikrotechnik EM, München) überschichtet wurden. Die anschließende Polymerisation erfolgte für drei Tage unter UV-Licht bei 4°C.

5.2.12.1 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser (Fa. Diatom, Biel, Schweiz) im Ultramikrotom (Ultracut S,Fa. Reichert-Jung) aus den in LR-White eingebetteten Präparaten hergestellt. Zu einer Vorabkontrolle mittels Lichtmikroskop wurden Semidünnschnitte (750 nm) angefertigt. Anschließend wurden die eigentlichen Ultradünnschnitte (60 nm) für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Die Ultradünnschnitte der LR-White-Präparate wurden auf Formvar (Fa. Serva, Heidelberg) beschichtete Nickel-Netzchen ("Nickel-Grids", 75er mesh; Fa. Plano) transferiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

5.2.12.2 Immunogoldmarkierung und Silberverstärkung

Die Inkubation der Schnitte erfolgte in einer feuchten Kammer. Zu Beginn wurden die beschichteten Nickel-Netzchen für zwei Minuten auf einen Tropfen (20µl) ddH₂O aufgebracht. Darauf folgte ein Inkubationsschritt mit einer gesättigten Natriumperjodat-Lösung (Fa. Fluka, Seelze), um die Oberfläche der Schnitte anzuätzen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit ddH2O gewaschen, bevor sie für 10 min mit 0,1% (w/v) Tween20 in PBS inkubiert wurden. Zur Absättigung freier Aminogruppen erfolgte ein zehnminütiger Inkubationsschritt in 50 mM NH₄Cl in PBS (pH 7,2). Daran schlossen sich mehrere Waschschritte mit PBS an, bevor die Schnitte schließlich für eine

Stunde bei RT blockiert wurden (0,1% (w/v) Ovalbumin, 0,5% (w/v) Fischgelatine in PBS). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C für 72h. Danach wurden die Schnitte einem sogenannten "Jet wash" mittels Spritzflasche (1 x PBS) unterzogen. Anschließend wurden die Schnitte auf 20µl IgG-Goldpuffer (0,1% Ovalbumin, 0,5% Fischgelantine, 0,5% NaCl, 0,01% Tween20 in 10mM Phosphatpuffer, pH 7,2) überführt und bei RT für 15 min vorinkubiert. Daran schloss sich die eigentliche Inkubation mit den jeweiligen sekundären, goldgekoppelten Antikörpern (Fa. Nanoprobes, Yaphank, USA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur an. Die Präparate wurden danach mehrmals mit PBS und zusätzlich mittels " jet wash" gewaschen. Zur Verstärkung der Antikörperbindung wurden die Ultradünnschnitte mit 1% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,2) für 5 min bei RT fixiert. Die Fixierungslösung wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit ddH₂O entfernt. Daran schloss sich ein zweistündiger Trocknungsschritt bei RT an. Anschließend wurde bei Rotlicht eine sogenannte Silberverstärkung nach Danscher durchgeführt (Danscher 1981). Die Präparate wurden auf einem Tropfen der Silberverstärkungslösung (60% Gummi arabicum als Schutzkolloid, 10% Citratpuffer, 15% 75 mM Hydrochinon als Reduktionsmittel, 15% 5,5mM Silberlactat, pH 3,6) für 25 min inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschschritte mit ddH₂O.

5.2.12.3 Schnittkontrastierung und Auswertung

Sofort nach der Silberverstärkung wurden die Schnitte durch kurze Inkubation mit 2% (w/v) Uranylacetat in 50% (v/v) Ethanol und 4,4% (w/v) Bleicitrat nachkontrastiert. Darauf folgte ein Waschschritt mit ddH₂O. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht getrocknet. Die elektronenoptische Betrachtung und Analyse der Schnitte erfolgte am Transmissions-Elektronenmikroskop Tecnai 12 (Fa. FEI, Eindhoven, NL).

5.2.13 Aufzeichnung von Elektroretinogrammen (ERG)

Für die Messung eines ERGs ("Elektroretinogramm") wurden zwei bis vier Tage alte Fliegen verwendet. Vor der Messung wurden die Fliegen auf Eis betäubt, es wurden Beine und Flügel entfernt und der Körper wurde mit einer Bienenwachs-Colophonium-Mischung (2:1) in einer Halterung fixiert. Danach wurde ein chlorinierter Silberdraht als Referenzelektrode in den Thorax eingestochen und die Halterung im ERG-Stand platziert. Als letztes wurde eine mit Davenport-Lösung (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.8 mM NaHCO₃, pH 7.2) gefüllte Glaskapillare ins Auge eingestochen. Die Verstärkung der abgeleiteten Signale erfolgte mittels DPA-2FS Differenzverstärker (NPI electronic, Germany). Die Belichtung der Fliegen erfolgte durch verschiedene LEDs (LED, Roithner, Österreich) mit Hilfe eines PLED-02M Stimulusgenerators. Die Fokussierung des Lichtes auf das Auge erfolgte

durch einen Spiegel und ein Linsensystem (Linos, Germany). Die Steuerung und Aufzeichnung erfolgte nach analog-digital-Wandlung mit einer PCI-6221 Messkarte (National Instruments) durch Verwendung des Programms WinWCP ("Whole Cell Analysis Program software").

Die Untersuchung der dominant negativen Rab-Mutanten erfolgte mit einem fünf sekündigen Orangelicht-Stimulus ("Single Orange") mit Hilfe einer orangen LED. Die Lichtintensität des unabgeschwächten Orangestimulus betrug 2,15 mW/cm². Zur Messung verschiedener Lichtqualitäten wurden verschiedenfarbige Plexiglasfilter (Abb. 6) in den Strahlengang eingebracht, wobei zur Belichtung eine weiße LED verwendet wurde. Die Lichtintensitäten wurden durch Einbringung von Neutraldichtefiltern in den Strahlengang denen der immunzytochemischen Experimente angepasst. Allen ERG-Aufzeichnungen ging jeweils eine dreiminütige Dunkeladaption bei RT voraus.

5.2.14 Aufnahme von Rhodopsin-Differenzspektren

Zur Bestimmung der durch verschiedene Lichtqualitäten induzierten Mengen an Metarhodopsin wurden Differenzspektren von Rhodopsin aufgezeichnet. Dafür wurden ca. 2000 Köpfe mit Hilfe eines Schüttelsiebes und flüssigem Stickstoff bei Rotlicht isoliert. Anschließend erfolgte eine Homogenisation in ddH₂O, das mit verschiedenen Protease-Inhibitoren versetzt wurde (APMSF, Leupeptin und Pepstatin-A). Die Homogenate wurden anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert (4°C, 1000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 20 min in der Ultrazentrifuge (Optima TL 100, Beckmann) zentrifugiert (4°C, 50 000 rpm). Dieser Überstand wurde anschließend verworfen. Das entstandene Pellet wurde in Extraktionspuffer (4% Digitonin, APMSF, Leupeptin, Pepstatin-A in PBS pH 6,8) resuspendiert und für zehn min bei RT inkubiert. Darauf folgte erneut ein Ultrazentrifugationsschritt (4°C, 55 000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde anschließend für die spektrometrischen Messungen verwendet. Eine Digitoninreferenz wurde über alle Zentrifugationsschritte mitgeführt. Die Messung des Überstandes erfolgte in Mikroküvetten. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum von 400 nm-700 nm aufgezeichnet. Hierbei wurden die verschiedenen Farbfilter jeweils in den Strahlengang des Photometers (UV-2401 PC, Shimadzu) eingebracht. Dabei wurden folgende Werte zur Normierung verwendet: Der rot belichtete Ausgangsextrakt entspricht 100% Rhodopsin, nach Belichtung mit blauem Licht wird von einem Rhodopsingehalt von 31% zu 69% Metarhodopsin ausgegangen. Es wurde für jeden der Farbfilter ein Rhodopsin-Differenzspektrum gemessen. Dafür wurde zuerst eine Basislinie durch zweimaliges Messen eines rotbelichteten Extraktes und anschließender Subtraktion aufgezeichnet. Anschließend wurde der Extrakt z.B. zwei Minuten blau belichtet und ein erneutes Spektrum aufgezeichnet. Nun wurde von diesem Spektrum das Spektrum des anfangs rot belichteten Extraktes abgezogen, um das zugehörige Differenzspektrum des Blaufilters zu erhalten. Für diesen Wert wurde 69% Metarhodopsin festgelegt. Die gemessenen Differenzspektren für alle anderen Farbfilter wurden auf dieselbe Weise gemessen und berechnet.

6 Ergebnisse

6.1 Der Co-Transport von TRPL und Rhodopsin1

6.1.1 Die lichtinduzierte Translokation des TRPL-Kanals ist ein vesikulärer Transport

Die lichtabhängige Translokation des TRPL-Kanals erfolgt als zweistufiger Prozess. In der ersten schnellen Transportphase gelangt der Kanal sowohl zur Basis der Rhabdomere, als auch in die daran angrenzende Stalk-Membran (Cronin et al. 2006). Der zweite Teil der Translokation erfordert mehrere Stunden Belichtung und resultiert in einer Lokalisation des TRPL-Kanals im Zellkörper der Photorezeptorzelle (Meyer et al. 2006). Der erste Teil dieses Transportes erfolgt, neueren Untersuchungen zufolge, ATP-unabhängig und ähnelt somit einem lateralen Diffusionsmechanismus innerhalb der rhabdomerischen Membran. Eine Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts wurde ausgeschlossen, jedoch scheint die Membranzusammensetzung einen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit auszuüben (Lieu et al. 2012). Der Mechanismus des zweiten Transportschrittes hingegen konnte bisher nicht abschließend aufgeklärt werden. Da es sich bei dem TRPL-Kanal um ein Membranprotein handelt, wird jedoch ein vesikulärer Mechanismus angenommen. Frühere immunzytochemische Untersuchungen von Querschnitten durch Drosophila-Augen zeigen nach zweistündiger Belichtungszeit vesikuläre Strukturen, die in dieser Arbeit eingehend untersucht wurden (Oberegelsbacher 2008). Falls es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Vesikel handelt, so sollten sich diese auch auf Längsschnitten darstellen lassen, was außerdem eine bessere räumliche Auflösung über das gesamte Rhabdomer ermöglicht.

Abbildung 7 zeigt Ausschnitte aus Längsschnitten wildtypischer Fliegenaugen nach verschiedenen Belichtungszeiten, sowie Schnitte dunkeladaptierter Fliegen zum Vergleich. Das TRPL dunkeladaptierter Fliegen zeigt eine rein rhabdomerische Lokalisation (Abb. 7A), wohingegen sich der Ionenkanal in helladaptierten Fliegen komplett außerhalb der Rhabdomere, im Zellkörper befindet (Abb. 7C). Nach zweistündiger Belichtung hat ein Großteil des TRPLs die Basis der Rhabdomere erreicht, ein Teil befindet sich jedoch bereits außerhalb der Rhabdomere in vesikulären Strukturen (Abb. 7B, Pfeile). Es fällt auf, dass die TRPL-Markierung des zentralen Rhabdomers R7 weder eine Translokation zur Rhabdomerbasis noch Vesikelbildung zeigt (Abb. 7B). Die Erklärung für diese Beobachtung findet sich in den Absorptionseigenschaften der dort exprimierten Rhodopsine. Ihre Absorptionsmaxima befinden sich im UV-Bereich und wurden somit unter diesen Versuchsbedingungen nicht ausreichend aktiviert (Zuker et al. 1987).



Abbildung 7: Der TRPL-Kanal unterliegt einem vesikulären Transportprozess. Die verwendeten wildtypischen Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert bzw. für die angegebene Zeit mit Weißlicht belichtet und anschließend präpariert. Das TRPL-Protein wurde mit einem primären Antikörper markiert, der von einem sekundären ALF 680 gekoppelten Antikörper (grün) detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. In dunkeladaptierten Fliegen ist der TRPL-Kanal innerhalb der Rhabdomere lokalisiert (A, D und G), während er nach zweistündiger Belichtung größtenteils an die Basis der Rhabdomere gelangt ist oder sich bereits innerhalb vesikulärer Strukturen befindet (B, E und H; Pfeile). In helladaptierten Fliegen befindet sich (C, F und I) TRPL außerhalb der Rhabdomere. Der Maßstab sowie die Schnittdicke entsprechen 10 µm.

6.1.2 TRPL und Rhodopsin1 verwenden einen gemeinsamen Internalisierungsweg

Ein weiterer Bestandteil der Signalkaskade, der ebenfalls lichtinduziert aus der Membran entfernt wird ist das Hauptrhodopsin Rh1. Nachdem es durch die Absorption von Photonen in seine aktive Form Metarhodopsin überführt wurde, und somit die Phototransduktionskaskade in Gang gesetzt hat, endet der Prozess schließlich mit seiner Inaktivierung und Arrestin-vermittelten Endozytose (Schwemer 1984; Alloway et al. 2000; Kiselev et al. 2000; Satoh et al. 2005). Um nun herauszufinden, ob diese beiden Proteine demselben Internalisierungsweg unterliegen oder ob es sich um zwei völlig unabhängige Prozesse handelt, wurden Rhodopsin und TRPL auf Längsschnitten belichteter Fliegen durch Doppelmarkierung nachgewiesen.

Abbildung 8 zeigt einen Längsschnitt durch das Auge einer wildtypischen Fliege nach zweistündiger Belichtung. Auch anhand dieses Schnittes ist deutlich zu erkennen, dass ein Teil des TRPLs aus belichteten Fliegen tatsächlich in Vesikel gelangt, während ein Großteil des TRPLs sich noch an der Basis der Rhabdomere befindet (Abb. 8A). Die rote Markierung zeigt die lichtinduzierte Lokalisation von Rh1 innerhalb vesikulärer Strukturen (Abb. 8B). Die TRPL- bzw. Rh1-positiven Vesikel ähneln sich in Größe und Verteilung, jedoch scheint die Zahl der Rh1-positiven vesikulären Strukturen die der TRPL-positiven zu übersteigen. Erstaunlicherweise existieren Vesikel, die sowohl TRPL als auch Rh1-Markierung zeigen, was für eine Kolokalisation dieser beiden Proteine spricht (Abb. 8C). In Abbildung 8F ist eine Detailvergrößerung des in Abb. 2C markierten Bereichs zu sehen. Anhand dieses Ausschnittes lässt sich die Kolokalisation der beiden Proteine näher analysieren. Die Vergrößerung zeigt, dass neben Vesikeln, welche eine Kolokalisation zwischen TRPL und Rh1 zeigen (Pfeile) auch solche existieren, die lediglich eine Rh1-Markierung zeigen (Pfeilspitzen).



Abbildung 8: Es existiert ein gemeinsamer Internalisierungsweg für TRPL und Rhodopsin1. Die verwendeten wildtypischen Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 wurde durch einen primären Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Die dargestellten Schnitte zeigen sowohl vesikuläre Strukturen, die eine TRPL-Markierung aufweisen (A), als auch Vesikel, die Rh1-positiv sind (B). Außerdem treten Vesikel auf, die eine Kolokalisation beider Proteine zeigen (Pfeile). Einige der vesikulären Strukturen zeigen nur ein Rh1-, jedoch keine TRPL- Markierung (Pfeilspitzen). Die Maßstäbe entsprechen 10 µm.

6.1.3 Der Zeitverlauf der Internalisierung von TRPL und Rh1

Die beiden Internalisierungsprozesse unterscheiden sich dadurch, dass es sich im Falle des TRPL um eine Translokation handelt, nach deren Abschluss der Ionenkanal die Rhabdomere vollständig verlassen hat (Bähner et al. 2002). Im Gegensatz dazu steht die kontinuierliche Internalisierung des Rh1, die weder zu einer Anreicherung des Proteins im Zellkörper, noch zu einem Verlust des rhabdomerischen Rh1 führt (Xu et al. 2004). Dadurch ergeben sich Fragen, die durch eine genauere Analyse dieses Co-Transports geklärt werden sollten. Um die Kolokalisation dieser beiden Proteine näher zu charakterisieren und außerdem zu quantifizieren, wurde ein immunzytochemischer Zeitverlauf angefertigt. Hierfür wurden wildtypische Fliegen verwendet, welche über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für den entsprechenden Zeitraum mit Weißlicht belichtet wurden. In dunkeladaptierten Fliegen sind sowohl TRPL als auch Rh1 innerhalb der Rhabdomere lokalisiert. Es sind weder TRPL- noch Rh1-positive vesikuläre Strukturen zu erkennen (Abb. 9A-A'''< 0,5 Vesikel/Ommatidium). Bereits nach 5 Minuten Belichtung treten die ersten Rh1-positiven Vesikel auf (Abb. 9B-B⁽¹⁾; 3,3 ± 1,8 Vesikel/Ommatidium). Nach 30 Minuten Belichtung treten nun auch vermehrt TRPL-positive Vesikel auf (2,3 ± 1/Ommatidium), von denen einige (1,4 ± 1,0/Ommatidium) Kolokalisation mit Rh1 zeigen (Abb. 9C-C'''; Pfeile). Auch nach zwei, vier und sechs Stunden Belichtung sind sowohl TRPL als auch Rh1-positive Vesikel zu beobachten, die wiederum teilweise Kolokalisation zeigen (Abb. 9D-F; Pfeile). Allerdings treten auch zu allen Zeitpunkten Vesikel auf, die lediglich Rh1-Markierung zeigen (Pfeilspitzen). Nach 10 Stunden ist der Translokationsvorgang des TRPL-Kanals abgeschlossen, der Kanal ist nun vollständig im Zellkörper der Photorezeptorzelle lokalisiert, wohingegen weiterhin Rh1-positive Vesikel gebildet werden. Die Quantifizierung der gebildeten TRPL- und Rh1-Vesikel, sowie der Vesikel, welche Kolokalisation der beiden Proteine zeigen ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Der Verlauf der drei Kurven veranschaulicht nochmals die, fast vollständige, Abwesenheit von Vesikeln in Dunkelheit. Anhand des Kurvenverlaufs des Rh1 (rot) lässt sich erkennen, dass die Endozytoserate dieses Proteins nach einer kurzen Anstiegsphase von ca. 30 Minuten bereits ihr Maximum erreicht hat und diese relativ konstant hält solange die Belichtung andauert (Abb. 9; 4,6 ± 1,8/Ommatidium). Die kontinuierliche Internalisierung von ca. vier -fünf Vesikeln pro Ommatidium führt nicht zu einer Anreicherung des Proteins im Zellkörper wie im Falle von TRPL, da Rh1 rasch einem lysosomalen Abbau zugeführt wird (Xu et al. 2004). Anders verhält sich der Kurvenverlauf des TRPLs (grün).

Der Anstieg ist im Vergleich zum Rh1 wesentlich flacher, und auch das Maximum wird erst nach ca. zwei Stunden Belichtung erreicht (Abb. 9; 3.5 ± 0.9 /Ommatidium), und fällt dann aber relativ rasch wieder ab.



Abbildung 9: Die Kolokalisation zwischen TRPL und Rh1 tritt während des gesamten Zeilverlaufs der TRPL-Translokation auf. Die Abbildung zeigt Querschnitte wildtypischer Fliegen, die über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für die entsprechende Zeitdauer belichtet wurden. Der TRPL-Kanal wurde durch einen Antikörper markiert, der von einem Alexa Fluor 680 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rh1 wurde durch einen Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (weiß). Pfeile deuten auf Vesikel, welche Kolokalisation zeigen, Pfeilspitzen deuten auf Vesikel, die lediglich Rh1- Markierung zeigen. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Aus dem Schaubild lässt sich ebenfalls ablesen, dass die Anzahl der vesikulären Strukturen, in welchen Kolokalisation auftritt (gelb) relativ gut mit der Anzahl der TRPL Vesikel korreliert. Nach zehn Stunden ist der Transportvorgang schließlich abgeschlossen, es sind keine TRPL-positiven Vesikel mehr zu verzeichnen. TRPL befindet sich nun in seinem Speicherkompartiment im Zellkörper. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Kolokalisation zwischen TRPL und Rhodopsin1 während des gesamten Internalisierungsprozesses des TRPL-Kanals auftritt.



Abbildung 10: Quantitative Analyse der gebildeten Vesikel während des Zeitverlaufs. Für die Quantifizierung wurden zu jedem erfassten Zeitpunkt die Mittelwerte der gezählten Vesikel aus 30-40 Ommatidien, die wiederum aus mindestens vier verschiedenen Fliegen stammten, verwendet. Die rote Kurve veranschaulicht die Anzahl der Rh1 Vesikel, die grüne die der gebildeten TRPL-Vesikel und die gelbe Kurve zeigt die Anzahl der Vesikel in denen Kolokalisation beobachtet wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

6.1.4 Der Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf die gemeinsame Internalisierung von TRPL und Rhodopsin1.

Das Verhältnis von Rhodopsin1 zu Metarhodopsin hängt von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab, was im Absorptionsverhalten der jeweiligen Zustandsform begründet ist. Die inaktive Form des Rh1 besitzt ihr Absorptionsmaximum bei 480 nm im Blaubereich, während die aktive Form, genannt Metarhodopsin, im Orangebereich bei 580 nm maximal absorbiert (Minke 1986). Somit lässt sich die Menge an internalisiertem Rh1 durch die Verwendung verschiedener Lichtqualitäten indirekt steuern, da diese ihrerseits zur Bildung von unterschiedlichen Mengen an Metarhodopsin führen (Schwemer 1984). Während Blaubelichtung zur Bildung von ca. 69% Metarhodopsin führt, wird bei Belichtung mit orangem Licht nur ca. 2% Metarhodopsin gebildet, das Gleichgewicht wird hier nahezu vollständig zugunsten des Rhodopsins verschoben (Meyer et al. 2006) Wie aber wirken sich nun verschiedene Mengen an Metarhodopsin und somit verschiedene Rh1-Endozytoseraten auf die Internalisierung des TRPLs, bzw. auf den Co-Transport der beiden Proteine aus?

Bevor die Fliegen den verschiedenen Lichtqualitäten ausgesetzt wurden, um anschließend die Anzahl der gebildeten Rh1- bzw. TRPL-Vesikel zu quantifizieren, wurden die zu verwendenden Farbfilter spektralphotometrisch untersucht. Die so gewonnenen Differenzspektren ermöglichen eine Zuordnung der jeweiligen Lichtqualität zur gebildeten Menge an Metarhodopsin. Nur so ist es anschließend möglich, die Internalisierungsrate des TRPLs mit dem entsprechenden Verhältnis von Metarhodopsin zu Rhodopsin zu vergleichen.



Abbildung 11: Differenzspektren von Rhodopsin1 nach Belichtung mit verschiedenen Lichtqualitäten. Die Menge des gebildeten Metarhodopsins wurde mittels Differenzspektren bestimmt. Dazu wurde ein rot-adaptierter Rh1-Extrakt spektrophotometrisch gemessen und anschließend blau, grün, weiß oder orange belichtet und nochmals gemessen. Die Kurven zeigen jeweils die Differenz zwischen der entsprechenden Lichtqualität und dem rot-belichteten Extrakt. Es wurden jeweils Digitoninextrakte aus wildtypischen Fliegenaugen verwendet. Die verschiedenfarbigen Kurven entsprechen den zur Belichtung verwendeten Lichtqualitäten. Den höchsten Metarhodopsinanteil bewirkte Belichtung mit blauem Licht. Grünes und weißes Licht führten beide zu einer geringeren Menge Metarhodopsin. Die mittels orangem Licht gebildete Menge an Metarhodopsin war nicht bestimmbar.

Lichtqualität	Blau	Grün	Weiß	Orange
% Metarhodopsin	69,0	37,0	26,8	n.b

Tabelle 7: Verschiedene Lichtqualitäten induzieren unterschiedliche Mengen an Metarhodopsin. Die gebildeten Metarhodopsinmengen wurden auf den Wert von 69% bei Blaubelichtung normiert (Meyer et al. 2006). Sowohl grünes, als auch weißes Licht führte erwartungsgemäß zu geringeren Metarhodopsinmengen als Belichtung mit blauem Licht. Die durch Belichtung mit orangem Licht gebildete Menge an Metarhodopsin konnte nicht bestimmt werden, da sie, verglichen mit dem Hintergrund, zu gering war.

Die in Abbildung 11 dargestellten Differenzspektren zeigen, dass die gemessenen Werte für Metarhodopsin tendenziell den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen entsprechen, und die getesteten Filter somit für die Durchführung des geplanten Experiments geeignet sind. Der Wert für oranges Licht konnte nicht bestimmt werden, da der entsprechende Peak sich nicht vom Hintergrundrauschen abhob. Da sich aus dem vorangegangenen Zeitverlauf und der zugehörigen Quantifizierung ergeben hat, dass die Anzahl der TRPL-Vesikel ihren höchsten Wert nach zwei Stunden erreicht, wurde diese Belichtungsdauer für das folgende Experiment verwendet. Dafür wurden wildtypische Fliegen jeweils über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden den entsprechenden Lichtqualitäten ausgesetzt. Anschließend wurden die gebildeten Vesikel quantifiziert. Abbildung 12 zeigt, dass Belichtung mit Blaulicht erwartungsgemäß zur Bildung zahlreicher Rh1-Vesikel führte, TRPLpositive Vesikel konnten jedoch nahezu keine beobachtet werden (<0.4± 0,5/ /Ommatidium) (Abb. 12E-H). Belichtung mit grünem oder weißem Licht führte gleichermaßen zur Abschnürung von Rh1und TRPL-positiven Vesikeln. Nach Belichtung mit orangenem Licht konnten fast ausschließlich TRPL-positive Vesikel detektiert werden (5,8 ± 1,4/Ommatidium), diese Lichtqualität führte zu einer äußerst geringen Rh1-Endozytose (0.3 ± 0.4 /Ommatidium). Auch die entsprechende Quantifizierung (Abb. 13) zeigt, dass Blaubelichtung zur Bildung der meisten Rh1-Vesikel führte (6,6 ± 1,3/Ommatidium), wohingegen oranges Licht kaum zur Internalisierung von Rh1 beitrug ($<0,3 \pm$ 0,4/Ommatidium), was erwartungsgemäß die jeweils vorherrschenden Metarhodopsinmengen widerspiegelt (Tabelle. 7). Belichtung mit grünem oder weißem Licht führte bei Rh1 zu einer mittleren Endozytoserate (5,5 \pm 1,5 und 4,5 \pm 1,2/Ommatidium), was sich ebenfalls gut mit den gemessenen Metarhodopsinmengen deckt. Wellenlängen, die zu einer sehr starken Rh1-Internalisierung führen (beispielsweise Blaulicht), induzieren demnach nur eine sehr geringe TRPL-Internalisierung ($<0.3 \pm$ 0,5/Ommatidium) und umgekehrt.



Abbildung 12: Der Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf die TRPL- und Rh1-Internalisierung. Die Abbildung zeigt Querschnitte wildtypischer Fliegen, die über Nacht dunkeladaptiert wurden und anschließend für zwei Stunden der jeweiligen Lichtqualiät ausgesetzt wurden. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 wurde durch einen primären Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (weiß). In dunkeladaptierten Fliegen (A-D) sind sowohl TRPL als auch Rh1 innerhalb der Rhabdomere lokalisiert. Blaubelichtung führt zur Internalisierung von Rh1, nicht aber von TRPL (E.H). Fliegen, die grünem (I-L) oder weißem Licht (Q-T) ausgesetzt waren, zeigen sowohl Rh1, als auch TRPL-Internalisierung. Die Belichtung mit orangem Licht führte lediglich zur Internalisierung des TRPL-Kanals (M-P). Der Maßstab entspricht 5 µm.



Abbildung 13: Quantitative Analyse der unter verschiedenen Lichtqualitäten gebildeten Vesikelmengen. Es wurden für jede Bedingung (dunkel bzw. nach 2 h Belichtung mit der angegebenen Lichtqualität) die Mittelwerte der gezählten Vesikel aus 20-40 Ommatidien, die wiederum aus mindestens drei verschiedenen Fliegen stammen, verwendet. Rote Balken veranschaulichen die Anzahl der Rh1- Vesikel unter verschiedenen Lichtqualitäten, grüne Balken die der gebildeten TRPL-Vesikel und gelbe Balken zeigen die Anzahl der Vesikel in denen Kolokalisation beobachtet wurde. In dunkeladaptierten Fliegen wurden nahezu keine Vesikel detektiert. Belichtung mit orangem, weißem oder grünem Licht führte jeweils zur Bildung von unterschiedlichen Mengen an TRPL-positiven Vesikeln. Lediglich Blaubelichtung führte zu keiner nennenswerten Anzahl von TRPL-Vesikeln. Belichtung mit blauem, weißem oder grünem Licht führte jeweils zur Bildung von unterschiedlichen Mengen an Rh1-positiven Vesikeln. Lediglich Orangebelichtung führte zu keiner nennenswerten Anzahl von Rh1-Vesikeln. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

6.1.5 Alle verwendeten Lichtqualitäten führen zu vergleichbaren elektrophysiologischen Antworten.

Eine mögliche Erklärung für die, je nach verwendeter Lichtqualität, unterschiedlich starke Rh1-Endozytoserate, wäre eine unterschiedlich starke Aktivierung der Photosignalkaskade, bedingt durch verschiedene Metarhodopsinmengen. Um dies zu überprüfen, wurden Elektroretinogramme (ERG) von wildtypischen Fliegen aufgezeichnet, bei denen als Lichtstimulus jeweils die entsprechende Lichtqualität bzw. der entsprechende Farbfilter verwendet wurde. Das ERG einer wildtypischen Fliege reagiert auf einen geeigneten Lichtstimulus mit einer anhaltenden Depolarisation des Rezeptorpotentials, wobei am Anfang und Ende des Reizes ein sogenannter On- bzw. Off-Transient auftritt (Abb. 14). Der Großteil der lichtinduzierten Potentialänderung, welche beim ERG gemessen werden kann, stammt aus den Photorezeptorzellen selbst. Der On- und Off-Transient entsteht hingegen durch Potentialänderungen von Neuronen der Lamina, dem ersten optischen Ganglion. Die noch während des Lichtstimulus zu beobachtende Abnahme der Amplitude wird als Inaktivierung bezeichnet. Die letzte Phase der Repolarisation, welche nach Beendigung des Lichtstimulus folgt, wird als Deaktivierung bezeichnet.

Um individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Fliegen auszuschließen wurden die verschiedenen Filter jeweils nacheinander zur Stimulation derselben wildtypischen Fliege verwendet. Die in Abbildung 14 dargestellten Elektroretinogramme zeigen, dass alle verwendeten Lichtqualitäten zu vergleichbaren elektrophysiologischen Antworten führten. Alle getesteten Farbfilter führten zur Ausbildung von On und Off-Transienten, und auch die Höhe der Amplituden zeigte lediglich eine geringe Varianz. Daraus lässt sich folgern, dass bereits die geringe, bei Orangebelichtung gebildete Menge an Metarhodopsin ausreicht, um eine nahezu maximale Reizantwort zu induzieren.



Abbildung 14: Alle verwendeten Lichtqualitäten führen zu vergleichbaren elektrophysiologischen Antworten. Es wurden insgesamt drei wildtypische Fliegen nacheinander den entsprechenden Lichtqualitäten ausgesetzt, indem der jeweilige Filter in den Strahlengang der Apparatur appliziert wurde. Als Lichtquelle diente eine weiße LED. Die Dauer des Lichtstimulus war 5 Sekunden und ist durch schwarze Balken dargestellt. Die Elektroretinogramme zeigen, dass alle verwendeten Lichtqualitäten zu ähnlichen elektrophysiologischen Reaktionen führen, auch die Höhe der Amplitude zeigte lediglich geringe Varianz.

6.1.6 TRPL wird in Fliegen, welche ektopisch Rh3 exprimieren auch bei Blaubelichtung internalisiert.

Die vorhergehenden elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben, dass alle verwendeten Farbfilter in der Lage sind, zur Ausbildung eines ausreichenden Rezeptorpotentials beizutragen (Abbildung 14). Trotzdem kann unter Blaubelichtung keine TRPL-Translokation beobachtet werden, während Rhodopsin1 hier seine maximale Endozytoserate aufweist. Geht man im Fall von TRPL und Rhodopsin1 tatsächlich von einem gemeinsamen lichtabhängigen Internalisierungsweg aus, liegt der Verdacht nahe, dass es bei Blaubelichtung zu einer Art Kompetition zwischen den beiden Proteinen kommen könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, und um gleichzeitig zu untersuchen, ob Blaulicht generell in der Lage ist, die Translokation des TRPL-Kanals zu induzieren, kamen transgene Fliegen zum Einsatz, welche anstatt des Rh1 ektopisch Rh3 in den Photorezeptorzellen R1-R6 exprimieren (Feiler et al. 1992). Das Absorptionsmaxima des Rhodopsin3 liegt im UV-Bereich ($\lambda_{max} = 345$ nM) und wird somit bei Blaubelichtung nur schwach aktiviert. Demnach sollte es auch keine starke Internalisierung zeigen, die möglicherweise in Konkurrenz zur TRPL-Internalisierung stehen könnte. Abbildung 15 zeigt Querschnitte der für zwei Stunden blaubelichteten transgenen Fliegen, im Vergleich zum Wildtyp. Auf den gezeigten Schnitten wurde jeweils eine Doppelmarkierung von TRPL und dem jeweils exprimierten Rhodopsin durchgeführt, um parallel die Internalisierung der Rhodopsine zu überprüfen. Wie erwartet konnte in wildtypischen Fliegen zwar eine starke Vesikelbildung bei Rh1 beobachtet werden, TRPL hingegen zeigte keine Internalisierung, sondern war vielmehr innerhalb der Rhabdomere lokalisiert (Abb. 15A-D). Anders verhielt es sich im Fall der Rh3-exprimierenden Fliegen. Hier verhielt es sich genau umgekehrt, TRPL wurde stark internalisiert, während für Rh3 keine Vesikelbildung zu erkennen war. Somit konnte gezeigt werden, dass blaues Licht generell in der Lage ist, die Translokation des TRPL-Kanals zu induzieren, wenn das jeweils vorherrschende Rhodopsin selbst nicht internalisiert wird.



Abbildung 15. TRPL wird in Fliegen, welche ektopisch Rh3 exprimieren auch bei Blaubelichtung internalisiert. Die Abbildung zeigt Querschnitte von wildtypischen Fliegen sowie von Fliegen, welche ektopisch Rh3 exprimieren. Die Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden mit Blaulicht belichtet. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 und Rh3 wurden durch primäre Antikörper markiert, welche letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurden (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (weiß). Blaubelichtung induziert im Wildtyp zwar die Internalisierung von Rh1 (B), nicht aber die von TRPL (A). Fliegen, die anstatt Rh1 ektopisch Rh3 exprimieren zeigen bei Blaubelichtung eine starke TRPL-Internalisierung, Rh3 jedoch wird nicht internalisiert, da sein Absorptionsmaximum im UV-Bereich liegt. Der

6.1.7 Die Translokationsgeschwindigkeit des TRPL-Kanals korreliert negativ mit der vorherrschenden Menge an Metarhodopsin

Die vorhergehenden Ergebnisse haben gezeigt, dass sich eine zu hohe Metarhodopsinmenge, wie sie beispielsweise bei Blaubelichtung vorliegt, negativ auf die Endozytoserate des TRPL-Kanals auswirkt. Umgekehrt verhält es sich bei einem sehr niedrigen Metarhodopsinlevel. Im Fall von oranger Belichtung wird TRPL stark internalisiert, wohingegen Rh1 keiner erkennbaren Endozytose unterliegt (Abb. 13). Sollte es sich also bei den beobachteten TRPL-positiven Vesikeln tatsächlich um die Haupttransportform des Kanals bei Belichtung handeln, so müssten sich unterschiedliche Lichtqualitäten auch auf die Geschwindigkeit der Translokation auswirken. Ein geeignetes Experiment um diese Hypothese zu überprüfen, sind Zeitverläufe bei unterschiedlichen Lichtqualitäten.

Hierfür wurden Fliegen verwendet, die ein TRPL-EGFP-Fusionsprotein exprimieren, welches die Analyse der Translokation *in vivo* ermöglicht (Meyer et al. 2006).

Anschließend wurde die Lokalisation des TRPL-eGFPs mittels Wasserimmersionsmikroskopie dokumentiert. Diese Methode ermöglicht durch optische Neutralisation der Cornea einen Einblick in die Photorezeptorzellen, ohne störende Lichtbrechung durch den dioptrischen Apparat der Fliege zu erhalten. Bei dunkeladaptierten wildtypischen Fliegen ist das TRPL-eGFP vollständig innerhalb der Rhabdomere lokalisiert, und bildet dort ein charakteristisches trapezoidales Muster (Abb. 16A). Die zentrale Photorezeptorzelle zeigt keine Fluoreszenz, da das markierte Protein unter Kontrolle des Rh1-Promotors steht, und Rhodopsin1 ausschließlich in den Photorezeptorzellen R1-R6 exprimiert wird. Nach 10 Stunden Orangebelichtung (Abb. 16A) befindet sich das TRPL-eGFP Fusionsprotein fast vollständig außerhalb der Rhabdomere, folglich ist die eGFP-Fluoreszenz auf den Zellkörper der Photorezeptorzelle begrenzt. Die Rhabdomere treten nun als dunkle Strukturen in Erscheinung. Um etwaige Unterschiede in den Translokationsgeschwindigkeiten besser darstellen zu können, wurden die aufgenommenen Fluoreszenz-Bilder einer Quantifizierung unterzogen. Hierfür wurde eine Methode verwendet, bei welcher die relative Fluoreszenz innerhalb der Rhabdomere im Vergleich zum Hintergrund berechnet wird (Meyer et al. 2006).

Aus Abbildung 16A lässt sich ablesen, dass die Translokation unter Orangebelichtung am schnellsten abläuft, während Blaubelichtung zu einer stark verzögerten TRPL-Wanderung führt. Durch Belichtung mit grünem oder weißem Licht ergab sich eine mittlere Translokationsgeschwindigkeit. Die beobachteten Geschwindigkeitsdifferenzen werden auch durch die, sich aus der Quantifizierung ergebende, Grafik abgebildet (Abb. 16B). Außerdem fällt auf, dass sich bei Blaubelichtung, und in geringerem Maße auch bei Belichtung mit grünem oder weißem Licht, auch nach 10 Stunden noch relativ viel TRPL-eGFP innerhalb der Rhabdomere befindet, was ebenfalls auf die retardierte Translokation zurückgeführt werden kann. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die unterschiedlichen Vesikelmengen (Abb. 13), welche bei verschiedenen Lichtqualitäten auftraten, und auch die dazugehörigen Translokationsgeschwindigkeiten (Abb. 16) negativ mit der vorhandenen Metarhodopsinmenge korrelieren.



Abbildung 16: Zeitverläufe der TRPL-eGFP Translokation unter verschiedenen Lichtqualitäten. In Abbildung A werden Wasserimmersionsaufnahmen von Fliegen gezeigt, welche ein TRPL-eGFP Konstrukt im wildtypischen Hintergrund exprimieren. Die entsprechenden Fliegen wurden nach 16h Dunkeladaption für die entsprechende Zeit mit der jeweiligen Lichtqualität bestrahlt. Der farbige Balken über den Einzelbildern zeigt jeweils die verwendete Lichtqualität an. Der Maßstab entspricht 10 µm. Das Ergebnis der zugehörigen Quantifizierung ist in Abb. 16B dargestellt. Die verschiedenfarbigen Linien entsprechen den verwendeten Lichtqualitäten. Weißlicht wurde als gepunktete Linie dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurde der relative TRPL-eGFP-Gehalt innerhalb der Rhabdomere berechnet. Hierfür wurden jeweils die Mittelwerte aus 15 Ommatidien, die aus drei verschiedenen Fliegen stammen verwendet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

6.1.8 Lokalisation von internalisiertem Rhodopsin1 mittels Immunogold-EM

Die beobachtete Kolokalisation von TRPL und Rh1 in Vesikeln wirft Fragen nach der Natur der gebildeten Strukturen auf. In der Literatur existieren mehrere Bezeichnungen für Rh1-positive Vesikel, welche bei Belichtung auftreten. Eine Arbeitsgruppe, welche die Endozytose von Rh1 anhand später Puppenstadien untersuchte, bezeichnet sie als RLVs ("Rh1-containing large vesicles") und identifizierte sie letztendlich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen als MVBs ("Multi vesicular bodies") (Satoh and Ready 2005). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt die bei Belichtung auftretenden Rh1-positiven Vesikel als ERPs ("endocytic Rh1 particles"), welche ebenfalls aus mehreren kleinen Vesikeln bestehen (Han et al. 2007). Eine dritte Arbeitsgruppe bezeichnete die gebildeten Rh1-enthaltenden Strukturen als RPVs ("Rh1-positive vesicles") und charakterisierte auch diese als Strukturen, die sich aus mehreren Vesikeln zusammensetzten (Cao et al. 2011).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den vesikulären Strukturen, welche nach Belichtung eine Kolokalisation zwischen TRPL und Rhodopsin aufweisen, ebenfalls um MVBs handelt, wurden wildtypische Fliegen einer elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. In Ermangelung eines für diese Methode geeigneten TRPL-Antikörpers, wurde ein monoklonaler Rh1-Antikörper verwendet, um somit indirekt Rückschlüsse auf die subzelluläre Lokalisation von kointernalisiertem TRPL ziehen zu können. Interessant war neben der Art, der unter diesen Belichtungsbedingungen, gebildeten endozytotischen Strukturen auch deren Größe, um sie mit bereits publizierten Strukturen vergleichen zu können.

Abbildung 17 zeigt eine Gegenüberstellung von immunzytochemischen und Immunogold markierten Schnitten, die durch konventionelle elektronenmikroskopische Daten ergänzt wurden. Die untersuchten Fliegen wurden jeweils nach Dunkeladaption, sowie nach zwei und zehn Stunden Belichtung analysiert. Abbildung 17A, E und I zeigen die Lokalisation von Rh1 anhand immunzytochemischer Schnitte. In dunkeladaptierten Wildtypfliegen werden keine Rh1-positiven Vesikel gebildet, was auch die Immunogold-EM Daten widerspiegeln (Abb. 17B). Konventionelle EM-Schnitte lassen ebenfalls nur sehr vereinzelt endosomale Strukturen erkennen. Nach zwei Stunden Belichtung zeigen sich mehrere Rh1-positive Vesikel im Zytoplasma der Photorezeptorzelle und zwar sowohl anhand immunzytochemischer als auch anhand Immunogold-markierter Schnitte (Abb. 17E und F). Die elektronenmikroskopische Analyse offenbart, dass es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Endosomen handelt, die jeweils mehrere Rh1-positive Vesikel enthalten (Abb. 17F).



Abbildung 17: Immunlokalisation von internalisiertem Rhodopsin1 nach verschiedenen Belichtungszeiten. Die Abbildung zeigt Querschnitte wildtypischer Fliegen, die über Nacht dunkeladaptiert wurden und anschließend für zwei oder 10 Stunden mit Weißlicht belichtet wurden. Die Fliegen wurden entweder einer immunzytochemischen Untersuchung unterzogen (A, E und I) oder einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unter Verwendung desselben Rh1-Antikörpers (B, F und J). Zum Vergleich wurden für die entsprechenden Zeitpunkte Schnitte mit konventioneller Fixierung und Kontrastierung angefertigt. Alle drei Methoden erlauben die Darstellung lichtinduzierter vesikulärer Strukturen, die einen Hinweis auf eine Lokalisation des Rh1 in frühen bzw. späten Endosomen geben. Der Maßstab entspricht in Bild I 5 µm, in Bild J 1 µm und in Bild L 500 nm.

Zusätzlich sind in der konventionellen EM Vesikel zu erkennen, welche noch eine Clathrin-Hülle tragen ("coated pits") und keine weiteren Strukturen enthalten. Allerdings ist es aufgrund der geringen Größe dieser Strukturen (ca. 100 nm) eher unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um dieselben handelt, welche auch immunzytochemisch erkennbar sind, da sich coated pits direkt am stark fluoreszierenden Rhabdomer befinden und deswegen vermutlich "überstrahlt" werden würden (Abb. 7G und H). Nach zehn Stunden Belichtung zeigt sich ein vergleichbares Bild. Beide immunmarkierenden Methoden offenbaren eine ähnliche Anzahl von Rh1-positiven Vesikeln (Abb. 17I und J). Die konventionelle elektronenmikroskopische Analyse offenbart auch hier das Auftreten von Endosomen verschiedener Größe. Die Detailvergrößerung zeigt ein spätes Endosom, welches durch eine Sammlung endozytischer Vesikel gekennzeichnet ist. (Abb. 17K und L). Diese

Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es sich bei den internalisierten Strukturen, in welchen bei Belichtung Kolokalisationen zwischen Rhodopsin1 und TRPL beobachtet werden können eventuell ebenfalls um Endosomen handelt, welche jeweils durch ihre mehr oder weniger multivesikuläre Struktur gekennzeichnet sind. Der Übergang zwischen frühen und späten Endosomen (MVB) ist hierbei fließend und kann oft nicht klar voneinander abgegrenzt werden (Bohdanowicz und Grinstein 2010). Jedoch kommt eine Kolokalisation innerhalb später Endosomen eher nicht in Frage, da diese Kompartimente als klassische Lysosomen-Vorstufe gelten und für TRPL mehrere Hinweise existieren, welche einen Abbaumechanismus klar ausschließen. Zudem wurden sowohl für Rh1 als auch TRPL eine Kolokalisation mit Rab5 nachgewiesen, welches als Marker für frühe Endosomen gilt (Han et al. 2007; Oberegelsbacher et al. 2011). Für Rh1 wurde hingegen gezeigt, dass es außerdem mit späten Endosomen kolokalisiert, welche durch Rab7 markiert werden können (Han et al. 2007), was zu folgender Hypothese führt: Rh1- und TRPL-positive Clathrin-bedeckte Vesikel verschmelzen nach Internalisierung zu frühen Endosomen, wo sie lichtmikroskopisch anhand ihrer Kolokalisation in Erscheinung treten. Während TRPL vom frühen Endosom direkt ins Recycling-Endosom gelangt, verbleibt Rh1 in frühen Rab7-positiven Endosomen, welches anschließend einen Reifeprozess durchlaufen, der über späte Endosomen (MVB) in Lysosomen übergeht, wo Rh1 letztendlich degradiert wird.

6.2 Die Endozytose von TRPL erfolgt Dynamin-abhängig

Die GTPase Dynamin ist an der Abschnürung von Vesikeln an der Zellmembran beteiligt, weswegen ihr in vielen endozytotischen Prozessen eine Schlüsselrolle zukommt (De Camilli, Takei, und McPherson 1995). Vom Rhodopsin1 ist durch frühere Untersuchungen bereits bekannt, dass seine lichtabhängige Internalisierung durch Dynamin vermittelt wird (Han et al. 2007). Im Fall des TRPLs ergab jüngst eine Untersuchung, dass das erste Translokationsstadium des Kanals, welches durch eine laterale Diffusion innerhalb der rhabdomerischen Membran gekennzeichnet ist, Dynamin-unabhängig erfolgt (Lieu et al. 2012). Die Dynamin-Abhängigkeit des zweiten Translokationschrittes konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die verwendete Dynamin-Mutante nach längerer Belichtung starke Anzeichen von Degeneration zeigt (Pinal und Pichaud 2011).

Dem entgegen steht eine ältere Arbeit, in welcher eine Dynamin-unabhängige Translokation für TRPL-eGFP beschrieben wird (Meyer et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde dasselbe Dynamin-Allel (*shi*^{ts1}) untersucht, allerdings nach 16-stündiger Belichtungszeit. In Anbetracht neuerer Erkenntnisse wäre es also durchaus möglich, dass die früheren Ergebnisse durch degenerative Prozesse verfälscht wurden, und somit auf Basis damaliger Beobachtungen keine eindeutige Aussage gemacht werdenkann. In Anbetracht des Co- Transports von TRPL und Rh1 (Abb. 8) stellt sich deswegen erneut die Frage nach einer etwaigen Beteiligung von Dynamin am zweiten Translokations-Stadium von TRPL.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde die Temperatur-sensitive Dynamin-Mutante (Chen et al., 1991) erneut untersucht, allerdings nach nur sechsstündiger Belichtung. Diese Belichtungsdauer wurde gewählt, da einerseits das zweite Translokationsstadium induziert werden sollte, andererseits aber Degenerationsereignisse möglichst zu verhindern waren. Werden diese Dynamin-Mutanten (*shi*^{ts1}) nun der restriktiven Temperatur von 30 °C ausgesetzt, so kommt es zu einer reversiblen Blockade der Endozytose, die Fliegen sind paralysiert. Hält man sie hingegen bei 22 °C, der sogenannten "permissiven Temperatur", so verhalten sie sich wildtypisch, und dienen somit als zusätzliche Kontrolle (Grigliatti et al. 1973; van der Bliek und Meyerowitz 1991).



Abbildung 18: Die Lichtabhängige Translokation von TRPL-eGFP erfolgt Dynamin-abhängig. Es wurde jeweils der Wildtyp im Vergleich zur shibire-Mutante bei 30 °C untersucht (restriktive Temperatur). Als zusätzliche Kontrolle diente die Mutante bei 22 °C, was der permissiven Temperatur entspricht. Die Fliegen wurden entweder über Nacht dunkeladaptiert oder aber für 6h belichtet. Anschließend wurde die Fluoreszenz des TRPL-eGFPs mittels Wasserimmersionsmikroskopie dokumentiert. A und B zeigen die lichtabhängige Translokation des TRPLeGFP im Wildtyp. In helladaptierten Fliegen befindet sich der Kanal im Zellkörper, während er in Dunkelheit innerhalb der Rhabdomere lokalisiert. In C und D ist die wildtypische Translokation des TRPL-eGFPs in der Dynamin-Mutante bei 22 °C gezeigt. E und F zeigt die Dynamin-Mutante bei 30 °C. Im Dunkeln ist der Kanal im Rhabdomer lokalisiert, nach 6h Belichtung jedoch ist der TRPL-eGFP-Kanal teilweise immer noch innerhalb der Rhabdomere lokalisiert und zeigt einen eindeutigen Translokationsdefekt. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Die lichtabhängige Translokation des Kanals im Dynamin-mutanten Hintergrund wurde anhand des TRPL-eGFPs *in vivo* untersucht. Abbildung 18 zeigt repräsentative Ausschnitte von Wasserimmersionsmikroskopischen Aufnahmen der *shibire*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp, der als Kontrolle bei 30 °C diente. Außerdem wurde die *shibire*-Mutante bei der permissiven Temperatur

von 22 °C untersucht, was als zusätzliche Kontrolle diente. Die Bilder 18C und D zeigen, dass sich die Temperatur-sensitive Dynamin-Mutante bei der permissiven Temperatur wildtypisch verhält. Ein anderes Bild ergibt sich bei der restriktiven Temperatur (Abb. 18E und F). Hier zeigt das TRPL-eGFP einen deutlichen Translokationsdefekt im Vergleich zum Wildtyp. Es fällt auf, dass einige Rhabdomere noch deutliche eGFP-Fluoreszenz zeigen, während sie bei 22 °C nur als dunkle Umrisse zu erkennen sind.

Um diesen Translokationsdefekt im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation des nativen TRPLs und Anzeichen von Degeneration genauer analysieren zu können, wurden Querschnitte angefertigt. Anhand immunzytochemischer Schnitte ist es außerdem möglich Vesikel darzustellen, was die Analyse mittels Wasserimmersionsmikroskopie nicht erlaubt.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein zweistündiger Belichtungszeitpunkt gewählt, da hier die Anzahl gebildeter TRPL-positiver Vesikel im Wildtyp am größten ist (Abb. 13), und somit etwaige Unterschiede am stärksten ins Gewicht fallen. Außerdem ist nach so kurzer Belichtungszeit noch keine Degeneration zu beobachten (Han et al. 2007).



Abbildung 19: Die Translokation des TRPL-Kanals erfolgt Dynamin-abhängig. Die Abbildung zeigt Querschnitte durch die Augen der Dynamin-Mutante (*sh*^{fs1}) im Vergleich zum Wildtyp. Die Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei oder sechs Stunden bei 30 °C belichtet. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Nach zwei Stunden Belichtung zeigen sich beim Wildtyp Vesikel im Zytoplasma (B und C; Pfeilspitzen), die Dynamin-Mutante hingegen zeigt zwar deutliche Lokalisation des Kanals an der Rhabdomerbasis jedoch keine Vesikelbildung (H und I). Nach sechs Stunden Belichtung ist die Translokation des Kanals fast vollständig abgeschlossen, d.h. er befindet sich im Zellkörper der Photorezeptorzelle (H und I). Anders verhält es sich bei der Mutante. Hier befindet sich noch ein erheblicher Teil des TRPLs innerhalb der Rhabdomere, was deutlich anhand der in gelb dargestellten Überlagerung zu erkennen ist (K und L). Allerdings scheint die Form der Rhabdomere erste Degenerationsanzeichen aufzuweisen. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Abbildung 19 zeigt Querschnitte der Dynamin-Mutante (*shi^{ss1}*) nach zwei und sechs Stunden Belichtung bei 30 °C, zum Vergleich wird jeweils der Wildtyp gezeigt. Nach zwei Stunden Belichtung können beim Wildtyp endozytotische Vesikel im Zytoplasma der Photorezeptorzelle beobachtet werden (19B und C; Pfeilspitzen). Die Dynamin-Mutante hingegen zeigt zwar eine deutliche Lokalisation des Kanals an der Rhabdomerbasis jedoch keine Vesikelbildung (Abb. 19H und I). Nach sechs Stunden Belichtung ist das zweite Translokationsstadium des TRPL-Kanals fast vollständig abgeschlossen, die Rhabdomere zeigen keine TRPL-Markierung mehr (Ausnahme R7, Erklärung siehe Abb. 7). Der Kanal befindet sich nun im Zellkörper der Photorezeptorzelle (19H und I). Anders verhält es sich hingegen im Fall der Dynamin-Mutante. Hier befindet sich noch ein erheblicher Teil des TRPLs innerhalb der Rhabdomere, was deutlich anhand der in gelb dargestellten Überlagerung zu erkennen ist (19K und L). Ein kleiner Teil des TRPLs befindet sich auch hier im Zellkörper der Photorezeptorzelle. Allerdings weisen die Ommatidien im Vergleich zum zwei Stunden-Wert Veränderungen in der Form der Rhabdomere auf.

Um den Zustand der Rhabdomere und vor allem den Unterschied in der Anzahl der gebildeten Vesikel näher betrachten zu können, wurden Längsschnitte angefertigt, welche einen besseren räumlichen Überblick über das gesamte Rhabdomer erlauben.



Abbildung 20: Die Abschnürung TRPL-positiver Vesikel erfolgt Dynamin-abhängig. Die Abbildung zeigt Längsschnitte der Dynamin-Mutante (*shi^{ts1}*) im Vergleich zum Wildtyp. Die Fliegen wurden ÜN dunkeladaptiert und anschließend für zwei oder sechs Stunden bei 30 °C belichtet. Der TRPL-Kanal wurde durch einen Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Der Maßstab entspricht 10 µm

Abbildung 20 zeigt Längsschnitte durch die Augen der Dynamin-Mutante (*shi*^{ts1}) im Vergleich zum Wildtyp. Nach zwei Stunden Belichtung sind im Zellkörper des Wildtyps zahlreiche Vesikel zu erkennen, wobei sich die Vesikelabschnürung auf die gesamte Länge der Rhabdomere erstreckt (Abb. 20A links). Im Gegensatz dazu weist die Dynamin-Mutante erneut keine Vesikelbildung auf, vielmehr deutet die TRPL-Markierung der Rhabdomere auf eine rein rhabdomerische Lokalisation hin (Abb. 20A rechts). Nach sechs Stunden Belichtung ist die Translokation des Kanals beim Wildtyp fast vollständig abgeschlossen, der Kanal befindet sich nun im Zellkörper der Photorezeptorzelle, wo er relativ homogen verteilt vorliegt, teilweise aber auch die Zellkerne umgibt (Abb. 20B links). Anders verhält es sich im Fall der Dynamin-Mutante, hier befindet sich noch ein erheblicher Teil des TRPLs innerhalb der Rhabdomere, allerdings scheinen bereits erste Degenerationsanzeichen vorzuliegen, worauf sowohl die unregelmäßige Phalloidin- als auch die TRPL-Markierung hindeuten.

Um endgültig zu klären, ob der beobachtete Translokationsdefekt der Dynamin-Mutanten nach sechsstündiger Belichtung mit einer Degeneration der Rhabdomere einhergeht, bzw. eventuell durch diese verursacht wird, wurden Semi-Dünnschnitte der Dynamin-Mutante im Vergleich zum Wildtyp angefertigt. Die wesentlich stärkere Fixierung dieser Schnitte ermöglicht eine bessere Strukturerhaltung als die bei der Immuncytochemie angewandte, und ist somit sehr gut geeignet, um eine Degeneration der Rhabdomere in mutanten Fliegenstämmen aufzudecken. Die zu untersuchenden Fliegen wurden nach Dunkeladaption für sechs Stunden bei 30 °C belichtet und anschließend präpariert.

Abbildung 21 zeigt gefärbte Semidünnschnitte, die in Form von Längsschnitten einen Überblick über die gesamte Länge der Rhabdomere ermöglichen. Die Rhabdomere der Dynamin-Mutante zeigen, im Gegensatz zum Wildtyp, teilweise Vakuolenbildung (Abb. 21B Pfeile), was als Anzeichen von beginnender Degeneration gilt (Hsu, Adams, und O'Tousa 2002).

Somit kann die Ursache des Translokationsdefekts, welcher nach sechs Stunden Belichtung zu beobachten ist, aufgrund der beginnenden Degeneration nicht klar bestimmt werden. Allerdings legt der deutliche Phänotyp nach zwei Stunden Belichtung, wo noch keine Degeneration auftritt, eine unmittelbare Beteiligung von Dynamin am Internalisierungs-Prozess des TRPL-Kanals nahe.

59



Abbildung 21: Lichtabhängige Degeneration in der Dynamin -Mutante. Die Abbildung zeigt Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte durch die Augen der Dynamin-Mutante (*sh*^{ist}) (B) im Vergleich zum Wildtyp (A). Die Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für sechs Stunden bei 30 °C belichtet. Im Vergleich zum Wildtyp ist in der Dynamin-Mutante Vakuolenbildung (Pfeile) zu erkennen, was als Anzeichen von beginnender Degeneration gedeutet werden kann. Der Maßstab entspricht 10 μm.

6.3 Der Aktivierungsmechanismus der beiden Internalisierungsprozesse unterscheidet sich grundsätzlich

Frühere Arbeiten konnten durch Analyse geeigneter Mutanten bereits eine Abhängigkeit der TRPL-Translokation von der Aktivierung der Signalkaskade zeigen, wobei der entscheidende Stimulus hierbei der aus der Öffnung der TRP-Kanäle resultierende Ca²⁺-Einstrom ist (Meyer et al. 2006). Anders verhält es sich im Falle des Rhodopsin1; hier spielt zwar auch die Aktivität der Signalkaskade eine essentielle Rolle, jedoch ist die Anwesenheit von Ca²⁺ keineswegs ausschlaggebend für die Internalisierung.

In der *norpA*-Mutante, welcher das Schlüsselenzym der Photosignalkaskade, die Phospholipase C β und somit der Ca²⁺Einstrom fehlt, wird Rh1 trotzdem massiv internalisiert. Die Ursache liegt hierbei in der Endozytose von stabilen Rh1/Arr2-Komplexen, welche normalerweise durch die Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung von Arr2 verhindert wird (Alloway and Dolph 1999; Alloway et al. 2000; Orem and Dolph 2002).

Die TRPL-eGFP-Translokation hingegen wird in dieser Mutante aufgrund des fehlenden Ca²⁺-Einstroms nicht induziert (Meyer et al. 2006). Eine weitere Mutante, welche eine vollständige Blockade des Ca²⁺-Einstroms zeigt ist *trp*^{P343}. Um nun herauszufinden, wie sich diese beiden Mutationen, die jeweils Schlüsselkomponenten der Photosignalkaskade betreffen, auf die Internalisierung von Rh1 und TRPL, genauer gesagt auf die Anzahl gebildeter Vesikel auswirken, wurden sie einer immunzytochemischen Analyse unterzogen. Dafür wurden die beiden Fliegenstämme jeweils für zwei Stunden Weißlicht ausgesetzt, und die hergestellten Schnitte wurden für TRPL und Rh1 doppelmarkiert. Die Anzahl der gebildeten Vesikel wurde bestimmt.

Abbildung 22 zeigt Querschnitte der Mutanten $trp^{P_{343}}$, $norpA^{P_{24}}$ und des Wildtyps zum Vergleich. Die TRPL-Translokation ist in der Mutante $trp^{P_{343}}$ komplett inhibiert, was auch die entsprechende Quantifizierung widerspiegelt (Abb. 22A). Rhodopsin1 hingegen wird überraschenderweise auch in dieser Mutante massiv internalisiert, was anhand der Quantifizierung deutlich wird. In der $trp^{P_{343}}$ -Mutante werden fast doppelt so viele Vesikel gebildet wie im Wildtyp (9,4 Vesikel/Ommatidium vs. 4,5 Vesikel/Ommatidium). Ähnlich verhält es sich im Fall von $norpA^{P_{24}}$. Auch hier zeigt TRPL eine rein rhabdomerische Lokalisation, es können keine Vesikel verzeichnet werden. Rhodopsin hingegen wird in dieser Mutante erwartungsgemäß stark internalisiert, wobei die Anzahl der gebildeten Vesikel etwas geringer ist als in der $trp^{P_{343}}$ -Mutante. Die Ursache hierfür könnte allerdings der äußerst geringe Rh1-Gehalt der Rhabdomere sein, welcher eine Folge der massiven Internalisierung bzw. des anschließenden Abbaus ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass trotz eines teilweise gemeinsamen Transportes von TRPL und Rhodopsin1 ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Internalisierungsprozessen hinsichtlich ihrer Ca²⁺-Abhängigkeit vorliegt.

Daraus ergab sich nun die Frage nach dem Einfluss von Mutationen, welche zu einer verzögerten Inaktivierung der Signalkaskade führen. In Mutanten, welchen einen Inaktivierungsdefekt hervorrufen, liegt nun, im Gegensatz zu den beiden zuvor untersuchten trp^{P343} und $norpA^{P24}$, eine verlängerte Lichtantwort vor, und folglich ein damit einhergehender verlängerter Ca²⁺-Einstrom.

Eine interessante Mutante stellt in diesem Zusammenhang *ina* C^{P209} (inactivation no afterpotential C) dar, in welcher die augenspezifische Proteinkinase C (ePKC) mutiert ist, was einen Inaktivierungsphänotyp im ERG zur Folge hat. Als potentielle Substrate dieser Kinase werden TRP und INAD identifiziert, wobei der exakte Inaktivierungsmechanismus noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Liu et al. 2000).



Abbildung 22: Vergleich der lichtabhängigen Internalisierung von TRPL und Rh1 in den Mutanten *trp*^{P343} und *norpA*^{P24}. Fliegen der Stämme *trp*^{P343} und *norpA*^{P24} wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Der Wildtyp diente als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem ALF 680 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 wurde durch einen primären Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der gezählten Vesikel aus 20-40 Ommatidien, die wiederum aus mindestens drei verschiedenen Fliegen stammen. Rote Balken veranschaulichen die Anzahl der Rh1-Vesikel, grüne Balken die der gebildeten TRPL-Vesikel. In beiden Mutanten können nach zwei Stunden Belichtung kaum TRPL-Vesikel detektiert werden, während Rh1 massiv internalisiert wird. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Der Maßstab entspricht 10 μm.

Abbildung 23B zeigt Querschnitte der *inaC*^{P209}-Mutante nach zwei Stunden Belichtung mit Weißlicht. Der TRPL-Kanal (grün) zeigt nach dieser Belichtungszeit weder eine Diffusion an die Basis, noch Vesikelbildung, was dem zweiten Transportstadium entspräche. Rhodopsin1 (rot) zeigt in dieser Mutante nur vereinzelt Vesikelbildung, des Weiteren ist die Rh1-Markierung der Rhabdomere unregelmäßig, was auf unterschiedliche Rh1-Gehalte der Rhabdomere hindeutet. Ein Teil des Rhodopsins ist im Zytoplasma lokalisiert, was im Wildtyp nicht beobachtet werden kann (Abb. 23A).


Abbildung 23: Vergleich der lichtabhängigen Internalisierung von TRPL und Rh1 in verschiedenen Mutanten mit verlängerter Signalantwort. Die entsprechenden Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Der Wildtyp diente als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 wurden durch einen primären Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (blau). Der Maßstab entspricht 10 µm.

Die Phalloidinmarkierung (blau) offenbart eine unregelmäßige Rhabdomerstruktur, was auf Veränderungen im Aktinskelett zurückzuführen sein könnte, da Phalloidin spezifisch an F-Aktin bindet. Aufgrund dieser strukturellen Veränderungen kann die Ursache des beobachteten Translokationsdefekts nicht eindeutig auf den Verlust der PKC zurückgeführt werden.

Ein weiteres Protein, dessen Verlust einen Inaktivierungsdefekt zur Folge hat, ist NINAC (neither inactivation nor afterpotential C), ein unkonventionelles Myosin vom Typ III (Montell und Rubin 1988). NINAC besitzt sowohl eine Myosin-, als auch eine Kinasedomäne und bindet außerdem Calmodulin (Porter und Montell 1993). Frühere *in vivo* Untersuchungen anhand des TRPL-eGFPs schreiben diesem Protein eine indirekte Rolle bei der Internalisierung des TRPL-Kanals zu (Meyer et al. 2006). Abbildung 23C zeigt Querschnitte der *ninaC*⁵-Mutante nach zwei Stunden Belichtung. Der TRPL-Kanal (grün) zeigt sowohl rhabdomerische, als auch zytoplasmatische Lokalisation, wobei jedoch überwiegend die Basis eine starke Markierung zeigt. Auch in dieser Mutante ist ein Teil des Rhodopsins (rot) im Zellkörper lokalisiert, wo es inhomogen verteilt vorliegt. Da auch diese Mutante eine vom Wildtyp abweichende Rhabdomerstruktur aufweist, lassen sich keine gesicherten Rückschlüsse bezüglich des Einflusses der NINAC auf die Translokation des TRPL-Kanals ziehen (Abb. 23C). Ältere Untersuchungen ergaben zudem, dass das Aktin-Skelett in dieser Mutante stark reduziert ist, was die strukturellen Unterschiede zum Wildtyp erklärt (Hicks und Williams 1992).

Als letztes wurde der Einfluss des CAMTA Proteins auf die Internalisierung des TRPLs untersucht. Im Fall von CAMTA (calmodulinbinding transcription activator) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher auf bis dato unbekannte Weise zur Deaktivierung von Metarhodopsin beiträgt. Aufgrund dieses Phänotyps erhielten die ersten Mutanten die Bezeichnung "*tes"*, was für *"termination slow"* steht (Han et al. 2006). Fehlt dieser Faktor, so führt dies zu einer starken Internalisierung von Rh1, die jedoch nicht auf dem klassischen Arr2-vermittelten Weg erfolgt. Vielmehr wurde hier ein neuer Internalisierungsweg für Rhodopsin1 beschrieben, welcher durch die Aktivität der Gqα-Untereinheit des G-Proteins vermittelt wird (Han et al. 2007).

Abbildung 23D zeigt Querschnitte der *tes¹* (termination slow) -Mutante nach zwei Stunden Belichtung mit Weißlicht. Der TRPL-Kanal (grün) ist bereits nach dieser kurzen Belichtungszeit fast vollständig im Zellkörper der Photorezeptorzelle lokalisiert. Es können nur noch vereinzelt Vesikel im Zytoplasma detektiert werden. Die Rhabdomere zeigen nahezu keine TRPL-Markierung mehr, mit Ausnahme der R7-Zelle, die, begründet durch die spektralen Eigenschaften der dort exprimierten Rhodopsine, keine Aktivierung der Signalkaskade und somit auch keine TRPL-Internalisierung zeigt. Rhodopsin1 (rot) wird in dieser Mutante erwartungsgemäß stärker internalisiert als im Wildtyp, was in diesem Fall jedoch nicht mit einer zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins einhergeht.



Abbildung 24: Vergleich der lichtabhängigen Internalisierung von TRPL und Rh1 in verschiedenen Gqα -Mutanten. Die entsprechenden Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Der Wildtyp diente als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Rhodopsin1 wurden durch einen primären Antikörper markiert, welcher letztendlich durch einen Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde (rot). Der Maßstab entspricht 10 μm.

Auch die Rhabdomerstruktur zeigt keine Abweichungen vom Wildtyp, demnach scheint diese Mutation keine strukturellen Änderungen hervorzurufen.

Um die unterschiedlichen Stimuli der Internalisierung von TRPL bzw. Rhodopsin weiter zu analysieren wurden Mutanten untersucht, die entweder ein hypomorphes oder ein konstitutiv aktives Gq α -Protein exprimieren. Gleichzeitig sollte damit der Einfluss der verschiedenen Mutationen der Gq α -Untereinheit auf die Endozytose von Rh1 und TRPL untersucht werden, besonders im Hinblick auf einen möglichen alternativen Gq α -abhängigen Transportweg des Rhodopsins (Han et al. 2007).

Abbildung 24 zeigt Querschnitte verschiedener Gq α -Mutanten, die jeweils entweder dunkeladaptiert oder für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet wurden. Als Vergleich diente der Wildtyp (Abb. 24A und B). Als erste wurde eine hypomorphe Gq α ¹⁻Mutante untersucht, welche zu einer Reduktion des wildtypischen Gq α -Levels auf 1% führt (Scott et al. 1995).

Nach zweistündiger Belichtung zeigen die Rhabdomere ein und desselben Ommatidiums sehr unterschiedliche TRPL-Gehalte. Während manche noch die Menge eines dunkeladaptierten Auges enthalten, zeigen andere bereits keine TRPL-Markierung mehr (Abb. 24C). Die Rhabdomere mit sehr starker TRPL-Markierung zeigen zudem keine Vesikelbildung im Gegensatz zu denen, die kaum mehr TRPL enthalten. Diese Beobachtung deckt sich mit älteren Daten, welche anhand des TRPL-eGFPs gewonnen wurden und einen ähnlich großen Unterschied im TRPL-Gehalt benachbarter Rhabdomere zeigen. Als Erklärung wurde hier eine Art Schwellenwert bezüglich des Gq α -Gehalts vermutete der bei manchen Rhabdomeren überschritten wird, bei anderen hingegen nicht. Rhodopsin zeigt eine ähnlich starke Internalisierung wie im wildtypischen Hintergrund (Abb. 24D).

Abbildung 24E zeigt dunkeladaptierte Schnitte einer konstitutiv aktiven Gq α -Mutante. Es fällt auf, dass der durch die Mutation verursachte Ca²⁺-Einstrom selbst im Dunkeln hinreichend für eine vollständige Translokalisation des TRPLs in den Zellkörper ist. Rhodopsin hingegen wird nicht internalisiert, möglicherweise führt auch die Gq α -vermittelte Endozytose ausschließlich zur Internalisierung der aktiven Form, also des Metarhodopsins (Abb. 24E).

In Abbildung 24F sind Schnitte der konstitutiv aktiven Gq α -Mutante nach zweistündiger Belichtung mit Weißlicht gezeigt. Der TRPL-Kanal ist auch in diesen Fliegen vollständig im Zellkörper lokalisiert. Es können vereinzelt Rh1-positive Vesikel im Zytoplasma beobachtet werden. Außerdem offenbart diese Mutante, eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Rhabdomerstruktur, was anhand der Rh1-Markierung deutlich wird. Die toxische Wirkung des übermäßigen Ca²⁺Einstroms führt in dieser Mutante anscheinend zur Degeneration. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bereits längere Zeit bekannt (Trump und Berezesky 1996).

Um die vollständige Internalisierung des TRPLs in der konstitutiv aktiven Gq α -Mutante ursächlich auf den massiven Ca²⁺-Einstrom zurückführen zu können, wurde eine Doppelmutante hergestellt, welche die konstitutiv aktive Gq α -Untereinheit im trp^{P343} -Mutanten Hintergrund exprimiert. In dieser Fliege wird der durch die Gq α -Mutation verursachte Ca²⁺-Einstrom durch die Mutation des TRP-Kanals inhibiert.

Abbildung 24G zeigt dunkeladaptierte Schnitte der beschriebenen Doppelmutante. TRPL zeigt in dieser Mutante eine vollständig rhabdomerische Lokalisation, es treten weder Vesikel auf, noch finden sich TRPL-positive Strukturen im Zellkörper; dasselbe gilt für Rhodopsin1. Der durch die Aktivierung der Signalkaskade verursachte Ca²⁺-Einstrom ist also tatsächlich ausreichend, um unabhängig von der Lichtbedingung zu einer vollständigen Translokation des TRPL-Kanals zu führen. In Abbildung 23H sind Schnitte der Doppelmutante nach zweistündiger Belichtung mit Weißlicht gezeigt. TRPL ist auch hier komplett im Rhabdomer lokalisiert, Rhodopsin wird in geringem Maße internalisiert, allerdings zeigt auch diese Mutante bereits nach kurzer Belichtungszeit eine leicht veränderte Rhabdomerform, so dass strukturelle Änderungen bis hin zu beginnender Degeneration nicht ausgeschlossen werden können.

6.4 Der Einfluss von Rab-Proteinen auf die Internalisierung des TRPL-Kanals

6.4.1 Screening dominant-negativer Rab-Mutanten

Vesikuläre Transportprozesse, zu denen auch die Translokation des TRPL-Kanals gehört, werden häufig durch Rab-Proteine vermittelt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um monomere G-Proteine, welche zur Ras-Superfamilie gehören (Somsel Rodman und Wandinger-Ness 2000). Ein Beispiel für Rab-vermittelte Transportprozesse ist der anterograde Transport von Rhodopsin1 innerhalb des Golgi-Komplexes. Bei Überexpression einer dominant-negativen Form von Rab6 kann nur mehr die unreife Form von Rh1 nachgewiesen werden (Shetty et al. 1998). Auch der anschließende Transport von Rhodopsin1 und TRP zum Rhabdomer wird durch die Aktivität eines Rab-Proteins reguliert, in diesem Fall durch Rab11 (Satoh et al. 2005). Die lichtinduzierte Internalisierung von Rh1 wird durch Rab5 vermittelt, was nun in Anbetracht des gemeinsamen Transportweges von Rh1 und TRPL Fragen nach einer Beteiligung von Rab-Proteinen bei der TRPL-Translokation aufwirft (Han et al. 2007).

Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Sammlung von 31 dominant-negativen (DN) Rab-Mutanten einem Translokations-Screening unterzogen (Zhang et al. 2007). Die dominant-negativen Rab-Konstrukte stehen unter Kontrolle des UAS-Promotors und besitzen zudem einen YFP-Tag. Für die Durchführung des Screens wurde ein Treiberstamm hergestellt, welcher zusätzlich zu Rh1-Gal4, das den UAS-Promotor aktiviert, ein TRPL-eGFP-Fusionsprotein exprimiert, was die nichtinvasive Analyse der Mutanten in vivo ermöglichte. Das Translokationsverhalten in den DN-Mutanten wurde im ersten Schritt durch Dokumentation der sogenannten tiefen Pseudopupille analysiert. Hierbei handelt es sich um ein optisches Phänomen, das sich zum einen aus der regelmäßigen Anordnung der Ommatidien und zum anderen durch das sogenannte "offene Rhabdom" bei Drosophila ergibt. Die Überlagerung der virtuellen Einzelbilder benachbarter Ommatidien resultiert schließlich in einem charakteristischen trapezoidalen Muster, welches exakt die Anordnung der Rhabdomere der Photorezeptorzellen widerspiegelt (Franceschini and Kirschfeld 1971). Aufgrund dieses optischen Phänomens ist es möglich, die Translokation des TRPL-eGFPs am intakten Auge zu analysieren. Die zentrale Photorezeptorzelle zeigt hierbei keine eGFP-Fluoreszenz, da das TRPL-eGFP Konstrukt unter Kontrolle des Rh1-Promotors steht, und Rhododopsin1 ausschließlich in den Photorezeptorzellen R1-R6 exprimiert wird. Die dominant negativen Rab-Proteine werden ebenfalls spezifisch in R1-R6 Zellen exprimiert, da sie unter Kontrolle desselben Promotors stehen. Zur Durchführung des Screens wurden die F1-Nachkommen aus der Kreuzung zwischen Treiberstamm und Responderlinie für 16 Stunden dunkeladaptiert und anschließend für sechs Stunden orangem Licht ausgesetzt. Der Zeitpunkt wurde gewählt, da hier die Translokation des TRPL-eGFPs beim Wildtyp weitestgehend

abgeschlossen ist, und es somit möglich war, auch Mutationen zu identifizieren, welche sich beispielsweise auf die Kinetik der Translokation auswirken. Dominant negative Rab-Mutanten, welche eine vom Wildtyp abweichende Pseudopupille aufwiesen, wurden anschließend einer Analyse mittels Wasserimmersionsmikroskopie unterzogen. Um gleichzeitig Rab-Mutanten zu identifizieren, die einen Effekt auf den Import des TRPL-eGFPs ins Rhabdomer ausüben, wurde von allen untersuchten Mutanten zusätzlich die Pseudopupille nach 16 Stunden Dunkeladaption dokumentiert. Da sich hierbei jedoch in keinem Fall Abweichungen zum Wildtyp ergaben, wurde auf eine weitere Analyse mittels Wasserimmersionsmikroskopie verzichtet. Bei allen untersuchten dominant negativen Rab-Konstrukten existierten jeweils zwei verschiedene chromosomale Insertionsstellen, die auf dem zweiten. bzw. auf dem dritten Chromosom lagen und beide untersucht wurden.

Abbildung 25 zeigt Mutanten, die anhand der tiefen Pseudopupille einen leichten Translokationsdefekt aufwiesen. Diese Mutanten, die ein Rab1DN, Rab4DN, Rab10DN oder Rab19DN exprimierten, wurden anschließend mittels Wasserimmersion näher untersucht. Diese Analyse ergab, dass es sich in diesen Fällen lediglich um sehr leichte Translokationsdefekte handelte, die meist nur einzelne Rhabdomere betrafen. Außerdem zeigte bei einigen dieser Mutanten lediglich eine der beiden Insertionslinien Defekte. Deswegen wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Mutanten verzichtet.



Abbildung 25: Dominant negative Rab-Mutanten mit leichtem Translokationsdefekt. Die Fliegen wurden 16 Stunden in einer Dunkelbox gehalten oder für sechs Stunden Orangelicht ausgesetzt. Danach wurden sie zur Dokumentation der tiefen Pseudopupille (5 x Objektiv) mit CO² betäubt. Für die Wasserimmersion wurden sie auf Eis gestellt und anschließend mittels Insektennadel auf einem Objektträger, der mit Plastilin versehen war, fixiert. Es wurde ein 20 x Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Im Vergleich zum Wildtyp (A) zeigen alle ausgewählten Mutanten einen leichten Translokationsdefekt nach 6 h Belichtung. Maßstabsbalken Pseudopupille: 100 μm.

6.4.2 Isolierung zweier dominant negativer Rab-Linien mit defekter TRPL-Translokation

Es gelang im Verlauf des Screens zwei Mutanten zu identifizieren, die einen starken TRPL-Translokationsdefekt aufweisen. Die beiden Mutanten Rab5DN und RabX4DN zeigten sowohl anhand der Pseudopupille, als auch in der Wasserimmersion einen deutlich ausgeprägten Translokationsdefekt (Abb. 25C-F). Um die Lokalisation des nativen TRPLs eingehender analysieren zu können, wurden die dominant negativen Rab-Stämme Rab5DN und RabX4DN immunzytochemisch untersucht. Für dieses Experiment wurde ein Treiberstamm verwendet, welcher lediglich Rh1-Gal4 exprimiert, nicht aber das getaggte TRPL.



Abbildung 26: Fliegen, die ein dominant negatives Rab5 oder dominant negatives RabX4 exprimieren zeigen einen starken Translokationsdefekt. Die Fliegen wurden 16 Stunden in einer Dunkelbox gehalten oder für sechs Stunden Orangelicht ausgesetzt. Danach wurden sie zur Dokumentation der tiefen Pseudopupille (5 x Objektiv) mit CO2 betäubt. Für die Wasserimmersion wurden sie auf Eis gestellt und anschließend mittels Insektennadel auf einem Objektträger, der mit Plastilin versehen war, fixiert. Es wurde ein 20 x Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Im Vergleich zum Wildtyp (A und B) zeigen die beiden Mutanten sowohl anhand ihrer tiefen Pseudopupille, als auch mittels Wasserimmersionsmikroskopie einen starken Translokationsdefekt. Maßstabsbalken Pseudopupille: 100 µm. Maßstabsbalken Wasserimmersion: 10 µm

Abbildung 27 zeigt Querschnitte der beiden Mutanten nach zehn Stunden Belichtung. Beide dominant-negativen Mutanten zeigen eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation des endogenen TRPLs an der Basis der Rhabdomere sowie in der angrenzenden Stalk-Membran. Lediglich ein geringer Teil des TRPLs befindet sich im Zellkörper der Photorezeptorzelle (Abb. 27B und C). Diese Lokalisation deckt sich sehr gut mit dem zu erwartenden Phänotyp im Fall eines inhibierten Vesikeltransportes. Der Translokationsdefekt in den Mutanten Rab5DN und RabX4DN lässt sich sowohl anhand des TRPL-eGFPs als auch anhand des nativen TRPLs deutlich darstellen. Demnach kann von einer Beteiligung der beiden Rab-Proteine RabX4 und Rab5 an der Internalisierung des TRPL-Kanals ausgegangen werden.



Abbildung 27: Die Lokalisation des nativen TRPLs in den Mutanten Rab5DN und RabX4DN. Die entsprechenden Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zehn Stunden mit Weißlicht belichtet. Der Wildtyp fungierte als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 (grün) gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). In beiden Mutanten zeigt das endogene TRPL eine Lokalisation an der Basis der Rhabdomere, lediglich ein geringer Teil ist im Zellkörper der Photorezeptorzelle lokalisiert. Der Maßstab entspricht 10 µm.

6.4.3 Der TRPL-Kanal zeigt Kolokalisation mit Rab5 und RabX4

Im Fall einer Rab5- bzw. RabX4-vermittelten Endozytose des TRPLs wäre eine Kolokalisation des jeweiligen Rab-Proteins mit TRPL-positiven Vesikeln zu erwarten. Entsprechende Experimente an S2-Zellen ergaben, dass die beiden Proteine Rab5 und Rabx4 in frühen Endosomen kolokalisieren, und folglich im selben Kompartiment aktiv sind (Zhang et al. 2007). Um eine etwaige Kolokalisation von TRPL mit diesen beiden Rab-Proteinen aufzudecken, wurden Fliegenstämme verwendet, die entweder ein wildtypisches Rab5-YFP oder ein RabX4-YFP exprimieren. Von diesen Fliegen wurden Längsschnitte nach zwei Stunden Belichtung hergestellt. Die erhaltenen Schnitte wurden anschließend für TRPL und das jeweilige Rab-Protein unter Verwendung entsprechender Antikörper doppelmarkiert. Abbildung 28 zeigt jeweils ein einzelnes Ommatidium von Fliegen, die entweder ein Rab5-YFP (Abb. 28A, B und C) oder RabX4-YFP (Abb. 28D, E und F) exprimieren.



Abbildung 28: Der TRPL-Kanal zeigt Kolokalisation mit RabX4 und Rab5. Die Abbildung zeigt Längsschnitte durch die Augen von Fliegen, die entweder ein wildtypisches Rab5-YFP (A, B und C) oder ein wildtypisches RabX4-YFP (D, E und F) exprimieren. Die Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert und anschließend für zwei Stunden belichtet. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Der YFP-Tag der Rab-Konstrukte wurde durch einen GFP-Antikörper markiert (rot). Die Überlagerung beider Kanäle erscheint gelb. Nach zwei Stunden Belichtung zeigen sich in beiden Fliegenstämmen zahlreiche Vesikel im Zellkörper der Photorezeptorzelle. Die TRPL-positiven Vesikel zeigen sowohl mit Rab5 Kolokalisation, als auch mit RabX4 (Pfeile). Der Maßstab entspricht 10 µm.

Nach zwei Stunden Belichtung sind in beiden Fliegenstämmen zahlreiche TRPL-positive Vesikel im Zytoplasma der Photorezeptorzelle zu erkennen. Einige dieser Vesikel zeigen Kolokalisation mit Rab5 bzw. RabX4 und wurden zur Verdeutlichung mit Pfeilen markiert. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von Rab5 bzw. RabX4 an der lichtinduzierten Internalisierung des TRPL-Kanals.

6.4.4 Elektrophysiologische Analyse der beiden Mutanten Rab5 und RabX4

Da die lichtinduzierte Internalisierung des TRPL-Kanals stark von der Aktivität der Signalkaskade abhängt wäre eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Translokation in den beiden dominant negativen Rab-Mutanten Rab5 und RabX4 eine Beeinträchtigung der Signalkaskade. Diese könnte beispielsweise durch eine Beteiligung von Rab5 bzw. RabX4 am Transport von essentiellen Komponenten des Signalkomplexes zum Rhabdomer hervorgerufen werden. Um die Funktion der Signalkaskade in den beiden dominant-negativen Rab-Mutanten zu überprüfen, wurden die Fliegen einer elektrophysiologischen Analyse unterzogen. Die aufgezeichneten Elektroretinogramme (ERG) in Abbildung 29 zeigen eindeutig, dass die Lichtantwort in den beiden Mutanten Rab5 bzw. RabX4 nicht beeinträchtigt ist und somit nicht als Grund für das Ausbleiben der lichtabhängigen Internalisierung des TRPL-Kanals in Frage kommt. Das Fehlen des Off-Transienten (Abb. 29) wurde für dominant negative Rab5-Mutanten bereits beschrieben und wird durch die Funktion des Rab5 bei der Vesikelabschnürung in den Synapsen der Photorezeptorzellen verursacht (Shimizu, Kawamura, und Ozaki 2003).



Abbildung 29: Die beiden dominant negativen Rab-Mutanten Rab5 und RabX4 zeigen wildtypische elektrophysiologischen Antworten. Es wurden jeweils drei Fliegen einem orangen Lichstimulus ausgesetzt. Die Dauer des Lichstimulus war 5 Sekunden und ist durch schwarze Balken dargestellt. Die Elektroretinogramme zeigen, dass die beiden dominant negativen Rab-Mutanten Rab5 und RabX4 annähernd wildtypische elektrophysiologische Antworten ausbilden und folglich eine Beeinträchtigung der Signalkaskade nicht als Ursache für den beobachteten Translokationsdefekt in den Rab-Mutanten in Frage kommt.

6.5 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von TRPL nach Belichtung

6.5.1 Recyclingendosomen sind an der Sortierung von internalisiertem TRPL beteiligt

Die lichtabhängige Internalisierung des TRPL-Kanals, mit anschließender Reintegration in die Zellmembran wird als Recycling-Prozess beschrieben, wobei bis dato nichts Näheres über die subzelluläre Lokalisation des TRPLs in helladaptierten Fliegen bekannt ist. Eine Arbeitsgruppe schlägt einen Verbleib des TRPL-Kanals in der basolateralen Membran vor, was jedoch mit Hilfe immunzytochemischer Studien falsifiziert werden konnte (Meyer et al. 2008). Gleich mehreren Arbeiten gelang es zu widerlegen, dass es sich bei diesem Transportmechanismus um eine Kombination aus Degradation und de novo Synthese handelt (Bähner et al. 2002; Lieu et al. 2012). Deswegen war es naheliegend, TRPL-positive Vesikel auf Kolokalisation mit dem Recycling-Endosomenmarker Rab11 hin zu untersuchen (Ullrich et al. 1996). Zu diesem Zweck wurden Markerfliegen verwendet, welche über ein UAS-Rab11-GFP verfügen. Durch Verkreuzung mit einem Rh1-Gal4 Treiberstamm, der zusätzlich ein TRPL-hcRed-Fusionsprotein unter Kontrolle des Rh1-Promotors exprimiert, konnten beide Proteine anhand ihres jeweiligen Tags ohne Verwendung von Antikörpern visualisiert werden. Hierfür wurden Ommatidien aus den F1-Fliegen der zuvor 16-stündiger beschriebenen Kreuzung isoliert, und nach Belichtung direkt einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen.



Abbildung 30: Der TRPL-Kanal zeigt Kolokalisationen mit dem Endosomen-Marker Rab11-GFP. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein UAS-Rab11-GFP-Konstrukt exprimieren (grün). Der entsprechende Treiberstamm exprimierte neben Rh1-Gal4 zusätzlich TRPL-hcRed zur Visualisierung des TRPLs (rot). Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt vesikuläre Strukturen, in welchen TRPL-hcRed Kolokalisation mit Rab11-GFP zeigt. Der Pfeil deutet ebenfalls auf Vesikel, die Kolokalisation aufweisen. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Abbildung 30 zeigt ein isoliertes Ommatidium, welches aus Fliegen der zuvor beschriebenen Kreuzung isoliert wurde. TRPL-hcRed (rot) ist nach 16 Stunden Belichtung größtenteils außerhalb der Rhabdomere lokalisiert, wo es eine inhomogene Verteilung aufweist (Abb. 30A). Eine ähnliche Verteilung offenbart Rab11-GFP (grün) mit dem Unterschied, dass zusätzlich eine Markierung der Rhabdomere zu beobachten ist. Eine teilweise Lokalisation innerhalb der Rhabdomere wurde für Rab11 bereits gezeigt (Satoh et al. 2005).

Die Überlagerung beider Kanäle offenbart mehrere Bereiche der Kolokalisation zwischen TRPL und Rab11. Diese Bereiche wurden zur Verdeutlichung vergrößert bzw. mit Pfeilen markiert. Zusätzlich treten Strukturen auf, welche lediglich eines der beiden Proteine enthalten. Diese Beobachtung legt nahe, dass Recyclingendosomen tatsächlich an der Sortierung des internalisierten TRPLs beteiligt sind.

6.5.2 Der TRPL-Kanal kolokalisiert nach Belichtung mit Teilen des Golgi-Apparates

Recyclingprozesse können unter Beteiligung verschiedenster zytosolischer Kompartimente vonstattengehen. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, internalisierte Proteine direkt vom Recyclingendosom in die Membran zu reintegrieren oder aber sie vorerst in ein Speicherkompartiment zu dirigieren (Jovic et al. 2010). Im Falle des TRPL-Kanals wird die Existenz eines Speicherkompartiments angenommen, da das immunzytochemische Verteilungsmuster auf eine intrazelluläre Struktur hindeutet, welche sich nahezu über den gesamten Zellkörper der Photorezeptorzelle erstreckt, was für Recyclingendosomen nicht zutrifft (Satoh et al. 2005). Diese Beschreibung trifft aber beispielsweise auf den Golgi-Apparat zu, dessen Beteiligung an Recyclingprozessen für eine ganze Reihe von Proteinen beschrieben wurde (Burd 2011).

Aus diesem Grund wurden Fliegen auf Kolokalisation mit TRPL-hcRed hin untersucht, die Marker für den Cis- bzw. Trans- Golgi-Apparat exprimieren. Das entsprechende Golgi-Protein trug jeweils eine GFP-Markierung und befand sich unter Kontrolle des UAS-Promotors. Durch Verkreuzung mit einem Treiberstamm, welcher neben Rh1-Gal4 zusätzlich ein TRPL-hcRed-Fusionsprotein unter Kontrolle des Rh1-Promotors exprimiert, konnten beide Proteine anhand ihres jeweiligen Tags visualisiert werden. Hierfür wurden Ommatidien aus den F1-Fliegen der zuvor beschriebenen Kreuzung isoliert, und nach 16 Stunden Belichtung direkt einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen.

76



Abbildung 31: Der TRPL-Kanal zeigt Kolokalisationen mit dem Trans-Golgi-Marker GalT-GFP. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein UAS-GalT-GFP-Konstrukt exprimieren. Der entsprechende Treiberstamm exprimierte neben Rh1-Gal4 zusätzlich TRPL-hcRed zur Visualisierung des TRPLs (rot). Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt Bereiche, in welchen TRPL-hcRed Kolokalisation mit GalT-GFP aufweist. Der Pfeil deutet ebenfalls auf Strukturen, die Kolokalisation aufweisen. Der

Abbildung 31 zeigt ein isoliertes Ommatidium, das neben TRPL-hcRed zusätzlich eine GFP markierte Galaktosyltransferase (GalT) exprimiert, welche als Marker für den Trans-Golgi-Apparat (TGN) dient und dort den Transfer von Galaktose auf Akzeptorproteine katalysiert (Roth and Berger 1982). TRPL-hcRed (rot) ist nach 16 Stunden Belichtung größtenteils außerhalb der Rhabdomere lokalisiert, wo es eine inhomogene Verteilung aufweist (Abb.31A). GalT-GFP (grün) zeigt eine ähnliche Verteilung, wobei auch hier tendenziell eine Konzentration im apikalen Bereich des Ommatidiums zu beobachten ist (Abb. 31B). Die Überlagerung beider Kanäle offenbart Bereiche der Kolokalisation zwischen TRPL und GalT, die zur Verdeutlichung vergrößert bzw. mit Pfeilen markiert wurden (Abb. 31C).

Zusätzlich treten auch hier zahlreiche Strukturen auf, welche lediglich eines der beiden Proteine enthalten. Diese Beobachtung könnte auf eine Beteiligung des Trans Golgi Netzwerkes (TGN) an der Speicherung bzw. dem Recycling des TRPL-Kanals hindeuten oder aber ein Indiz für Neusynthese bei Helladaption sein.

Sollte es tatsächlich zu nennenswerter Neusynthese von TRPL bei Belichtung kommen, so wäre außerdem eine Lokalisation im Cis-Golgi-Apparat zu erwarten.

Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Fliegenstämme verwendet, welche jeweils verschiedene Marker für den Cis-Golgi-Apparat exprimieren. Zum einen wurden für diesen Zweck markiertes Grasp65 ("Golgi reassembly stacking protein") verwendet, das überwiegend eine Funktion bei der Stapelbildung des Golgi-Apparates wahrnimmt (Xiang and Wang 2010)

. Zum anderen wurde ein markiertes γ Cop-Protein verwendet. γ Cop-Proteine sind Bestandteile des COPI-Komplexes ("coat protein complex I"), der als sogenanntes Hüllprotein eine prominente Rolle im retrograden Transport zwischen Cis-Golgi-Apparat und ER einnimmt (Hoffman et al. 2003).

Auch in diesem Fall standen die GFP-markierten Proteine unter Kontrolle des UAS-Promotors und wurden mit Hilfe des TRPL-hcRed-exprimierenden Treiberstammes aktiviert.

In Abbildung 32 ist ein isoliertes Ommatidium dargestellt, das neben TRPL-hcRed zusätzlich GFP markiertes Grasp65 exprimiert, welches als Marker für den Cis-Golgi-Apparat fungiert. Nach 16stündiger Belichtung zeigt sowohl TRPL-hcRed (Abb. 32A) als auch Grasp65-GFP eine Lokalisation außerhalb der Rhabdomere, wobei im Falle des Grasp65 tendenziell eine Konzentration in Zellkernnähe zu beobachten ist (Abb. 32B). Die Überlagerung beider Kanäle offenbart Bereiche partieller Kolokalisation zwischen TRPL und Grasp65, die auch hier zur Verdeutlichung vergrößert wurden (Abb. 32C). Um diese Beobachtung zu überprüfen wurden anschließend zusätzlich helladaptierte Fliegen, welche einen anderen Cis-Golgi-Marker exprimieren auf etwaige Kolokalisation mit TRPL-hcRed hin untersucht.



Abbildung 32: Der TRPL-Kanal zeigt partielle Kolokalisation mit dem Cis-Golgi-Marker Grasp65-GFP. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein UAS-Grasp65-GFP-Konstrukt exprimieren. Der entsprechende Treiberstamm exprimierte zusätzlich TRPL-hcRed zur Visualisierung des TRPLs. Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt Bereiche, in welchen TRPL-hcRed partielle Kolokalisation mit Grasp65-GFP aufweist. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Abbildung 33 zeigt ein isoliertes Ommatidium, welches neben TRPL-hcRed zusätzlich γ Cop-GFP exprimiert, einen weiteren Marker für den Cis-Golgi-Apparat. Auch dieser Marker stand unter Kontrolle des UAS-Promotors und wurde für die Untersuchungen mit Hilfe des TRPL-hcRed-exprimierenden Treiberstammes aktiviert. Die Nachkommen dieser Kreuzung dienten auch in diesem Fall der Gewinnung isolierter Ommatidien mit dem Ziel einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse.

Nach 16 Stunden Belichtung zeigt sowohl TRPL-hcRed als auch γ Cop-GFP eine Lokalisation außerhalb der Rhabdomere im Zellkörper der Photorezeptorzelle (Abb. 33A und B). Die Überlagerung beider Kanäle offenbart Bereiche partieller Kolokalisation zwischen TRPL und γ Cop, die zur Verdeutlichung vergrößert wurden (Abb. 33C).



Abbildung 33: Der TRPL-Kanal zeigt partielle Kolokalisation mit dem Cis-Golgi-Marker γCop-GFP. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein UAS- γCop-GFP Konstrukt exprimieren. Der entsprechende Treiberstamm exprimierte zusätzlich TRPL-hcRed zur Visualisierung des TRPLs. Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt Bereiche, in welchen TRPL-hcRed partielle Kolokalisation mit γCop -GFP aufweist. Der Maßstab entspricht 10 μm.

Die auftretenden Kolokalisationen mit Teilen des Cis- und Trans-Golgi-Apparates könnten auch ein Indiz dafür sein, dass in helladaptierten Fliegen auf niedrigem Level TRPL-Neusynthese stattfindet, und somit ein kleiner Teil des bei Dunkelheit zurück ins Rhabdomer gelangenden TRPLs aus dieser Quelle stammt. Die stärkere Kolokalisation, welche im Falle des Trans-Golgi-Apparates festgestellt wurde, könnte allerdings auch auf eine Beteiligung am Recyclingmechanismus des TRPL-Kanals zurückzuführen zu sein.

6.5.3 Der TRPL-Kanal zeigt nach Belichtung Kolokalisation mit Teilbereichen des Endoplasmatischen Retikulums

Ein weiteres subzelluläres Kompartiment, welches als möglicher, wenn auch ungewöhnlicher, Speicherort für internalisiertes TRPL in Frage käme, ist das Endoplasmatische Retikulum (ER). Das immunzytochemische Verteilungsmuster des ERs innerhalb der Photorezeptorzelle weist zudem große Ähnlichkeit zur Lokalisation des TRPL-Kanals in helladaptierten Fliegen auf. Frühere immunzytochemische Studien zeigten, dass der Kanal bei Belichtung nicht nur im Zellkörper der Photorezeptorzelle lokalisiert ist, sondern auch in Zellkernnähe akkumuliert, was ebenfalls auf das ER zutrifft (Raghu et al. 2000; Meyer et al. 2008). Aus diesem Grund wurden Fliegen untersucht, die fluoreszenzmarkierte ER-Retentionsmotive besitzen und somit als Marker für das Endoplasmatischen Retikulum dienen können. Auch diese Stämme funktionierten auf Basis des UAS/Gal4-Systems und wurden folglich für die anstehende Kolokalisationsstudie zuvor mit einem geeigneten Rh1-Gal4 Treiberstamm verkreuzt, der ein markiertes TRPL-Fusionsprotein exprimiert. Da in diesem Fall keine unterschiedlichen ER-Marker erhältlich waren, wurden stattdessen parallel zwei Stämme verwendet, welche denselben Marker exprimieren, allerdings mit jeweils anderen Fluoreszenz-Tags. Dementsprechend kamen für dieses Experiment auch zwei verschiedene TRPL-Fusionsproteine zum Einsatz, um trotzdem eine simultane Markierung von TRPL und dem ER-Marker zu ermöglichen. So kann ausgeschlossen werden, dass vermeintliche Kolokalisationsereignisse durch Interaktionen der verwendeten Tags verursacht werden.

Auch für dieses Experiment wurden Ommatidien aus den F1-Fliegen der zuvor beschriebenen Kreuzung isoliert, und nach 16 Stunden Belichtung direkt einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen. Abbildung 34A zeigt isolierte Ommatidien, die neben TRPL-hcRed ein GFP-markiertes ER-Retentionssignal (KDEL) exprimieren (Pelham 1990). Anhand der Ommatidien lässt sich erkennen, dass sowohl TRPL-hcRed (rot) als auch KDEL-GFP eine unregelmäßige Verteilung außerhalb der Rhabdomere aufweisen (Abb. 34A). Eine ähnliche Verteilung kann für TRPL-eGFP und KDEL-RFP beobachtet werden (Abb. 34B). Die Überlagerung der beiden Kanäle offenbart, unabhängig von den verwendeten Fluoreszenz-Tags, Bereiche der Kolokalisation zwischen TRPL und KDEL. Diese wurden zur Verdeutlichung vergrößert bzw. mit Pfeilen markiert (Abb. 34A und B). Außerdem treten zahlreiche TRPL-positive Strukturen auf, welche keine Kolokalisation aufweisen, was gegen das ER als alleiniges Speicherkompartiment spricht. Eine Beteiligung des ERs am Recycling des TRPL-Kanals kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die beobachtete Kolokalisation mit Teilen des ERs könnte aber auch eine Konsequenz von Neusynthese während der Helladaption sein, was im Einklang mit den zuvor detektierten Kolokalisationen mit Bereichen des Golgi-Apparates stünde.



Abbildung 34: Der TRPL-Kanal zeigt Kolokalisationen mit dem ER-Retentionsmotiv KDEL. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die entweder ein UAS-KDEL-GFP Konstrukt (A) oder ein UAS-KDEL-RFP Konstrukt (B) exprimieren. Der entsprechende Treiberstamm exprimierte zusätzlich TRPL-hcRed bzw. TRPL-eGFP zur Visualisierung des TRPLs. Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt Bereiche, in welchen TRPL Kolokalisation mit KDEL zeigt. Der Maßstab entspricht 10 µm.

6.5.4 Der TRPL-Kanal zeigt nach Belichtung keine Kolokalisation mit Peroxisomen

Peroxisomen sind äußerst anpassungsfähige Organellen, welche anfänglich als "Microbodies" bezeichnet wurden. Zu ihren Aufgaben gehören vielfältige oxidative Reaktionen, wozu sie eine große Zahl verschiedener Abbauenzyme beherbergen können (Titorenko and Rachubinski 2001). Aufgrund ihrer Funktion ist eine mögliche Beteiligung an der Speicherung des TRPL-Kanals nahezu ausgeschlossen, weshalb sich diese Organellen sehr gut als Kontrolle für die zuvor verwendeten Kompartimentmarker eignen, um aufzudecken, ob etwaige Kolokalisationen als Artefakte einzustufen sind. Hierfür wurden Fliegen verwendet, welche SKL-GFP, ein mit einer peroxisomalen Zielsequenz markiertes GFP exprimieren (Fujiki 1992).

Abbildung 35A zeigt isolierte Ommatidien, die neben TRPL-hcRed zusätzlich SKL-GFP exprimieren. Anhand der Ommatidien lässt sich erkennen, dass TRPL-hcRed (rot) eine unregelmäßige Verteilung außerhalb der Rhabdomere aufweist (Abb. 35A). Anders stellt es sich im Falle des SKL-GFP dar. Hier treten lediglich einige wenige punktförmige Markierungen im Zytoplasma der Photorezeptorzelle auf (Abb. 35B). Die Überlagerung beider Kanäle zeigt, auch in der Detailvergrößerung, keine Bereiche der Kolokalisation zwischen TRPL und KDEL (Abb. 35C). Peroxisomen spielen demnach, wie zu erwarten war, keine Rolle im Recyclingprozess des TRPL-Kanals.



Abbildung 35: Der TRPL-Kanal zeigt keine Kolokalisationen mit einem Peroxisomenmarker. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein UAS-SKL-GFP-Konstrukt exprimieren. Der entsprechende Treiberstamm exprimierte zusätzlich TRPL-hcRed zur Visualisierung des TRPLs. Die verwendeten Fliegenstämme wurden 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung zeigt, dass keine Kolokalisationen mit KDEL auftreten. Der Maßstab entspricht 10 µm.

6.5.5 Internalisiertes Rhodopsin1, nicht jedoch TRPL, wird einem lysosomalen Abbau zugeführt

Lysosomen vermitteln den Abbau von zellfremdem sowie von zelleigenem Material. Dies gilt insbesondere für eine Vielzahl endozytierter Proteine, zum Beispiel den EGF-Rezeptor ("epidermal growth factor"). Nach Bindung des Liganden wird der aktivierte Rezeptor einem lysosomalen Abbau zugeführt, was die Sensitivität der Zelle für EGF herabsetzt (Dikic 2003). Signalproteine, welche einer lichtinduzierten Endozytose unterliegen, könnten daher ebenfalls auf diesem Weg reguliert werden. Im Falle von Rhodopsin1 wurde bereits gezeigt, dass es einem lysosomalen Abbau unterliegt, welcher die Beteiligung eines Tetraspanins namens Sunglasses erfordert (Xu et al. 2004). Für den TRPL-Kanal wird jedoch ein Recyclingmechanismus angenommen, was in mehreren Publikationen gezeigt wurde (Bähner et al. 2002; Lieu et al. 2012). Allerdings wurde bisher nicht experimentell überprüft, ob tatsächlich kein internalisiertes TRPL einem lysosomalen Abbau zugeführt wird, was in Anbetracht des gemeinsamen Endozytose-Weges von TRPL und Rh1 durchaus vorstellbar wäre. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde ein Lysotracker Blue verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzmarker, der in vivo zur Markierung saurer Kompartimente geeignet ist, da er in diesen akkumuliert. Um die Funktionalität des verwendeten Systems zu überprüfen, wurde zuerst Rhodopsin1 auf Kolokalisationen mit diesem Marker hin untersucht. Da der Lysotracker lediglich für die Anwendung an lebenden Zellen geeignet ist, kam für dieses Experiment ein GFP-markiertes Rh1 zum Einsatz (Mecklenburg et al. 2010). Die Rh1-GFP exprimierenden Fliegen wurden sechs Stunden Blaulicht ausgesetzt, um eine maximale Rh1-Endozytoserate zu induzieren. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und einer Inkubation mit dem Lysotracker Blue zugeführt. Die anschließende Analyse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

Abbildung 36 zeigt ein solches isoliertes Ommatidium nach Inkubation mit dem Lysotracker Blue. Rh1-GFP (grün) befindet sich auch nach sechs Stunden Blaubelichtung größtenteils innerhalb der Rhabdomere, zusätzlich treten vesikuläre Strukturen im Zytoplasma der Photorezeptorzelle auf (Abb. 36A).



Abbildung 36: Internalisiertes Rhodopsin1 wird einem Iysosomalen Abbau zugeführt. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein Rh1-GFP-Konstrukt (A) exprimieren. Lysosomen wurden mit Hilfe des Lysotrackers Blue markiert. Die Fluoreszenz des Lysotracker Blue wurde rot dargestellt, da sich so Kolokalisationen deutlicher darstellen lassen. Die Fliegen wurden nach 16 Stunden Dunkeladaption für sechs Stunden mit Blaulicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung sowie der Pfeil zeigen Bereiche, in welchen Rh1-GFP Kolokalisation mit Lysosomen zeigt. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Die mittels Lysotracker sichtbar gemachten Lysosomen (rot) zeigen eine gleichmäßige Verteilung im Zellkörper der Photorezeptorzelle, und erstrecken sich über die gesamte Länge des Ommatidiums (Abb. 36B). Die Überlagerung beider Kanäle offenbart einzelne Vesikel, in welchen Kolokalisation zwischen Rh1 und Lysosomen auftritt, was besonders anhand der Detailvergrößerung deutlich wird (Abb. 36C). Somit kann der lysosomale Abbau von Rhodopsin1 unter Verwendung eines Lysotrackers eindeutig dargestellt werden, was eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgenden Kolokalisationsstudien anhand des TRPLs war.



Abbildung 37: Internalisiertes TRPL-eGFP wird nicht lysosomal abgebaut. Für diese Kolokalisationsstudie wurden Fliegen verwendet, die ein TRPL-eGFP exprimieren (A). Lysosomen wurden mit Hilfe des Lysotrackers Blue markiert. Die Fluoreszenz des Lysotracker Blue wurde rot dargestellt, da sich so Kolokalisationen deutlicher darstellen lassen. Die Fliegen wurden nach 16 Stunden Dunkeladaption für 16 Stunden mit Weißlicht belichtet. Anschließend wurden Ommatidien isoliert und sofort dokumentiert. Die Detailvergrößerung verdeutlicht, dass TRPL-eGFP keine Kolokalisationen mit Lysosomen zeigt. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Abbildung 37 zeigt ein TRPL-eGFP-exprimierendes isoliertes Ommatidium nach Inkubation mit dem Lysotracker. Das TRPL-eGFP (grün) helladaptierter Fliegen weist wie gewohnt eine unregelmäßige Verteilung außerhalb der Rhabdomere auf (Abb. 37A). Die Fluoreszenz-markierten Lysosomen (rot) zeigen eine gleichmäßige Verteilung im Zellkörper der Photorezeptorzelle und erstrecken sich über die gesamte Länge des Ommatidiums (Abb. 37B). Die Überlagerung beider Kanäle zeigt, auch in der Detailvergrößerung; keine Vesikel in denen eine Kolokalisation zwischen TRPL und Lysosomen auftritt (Abb. 37C). Diese Beobachtung liefert somit einen weiteren Beweis dafür, dass internalisiertes TRPL tatsächlich einem Recycling-Weg, und nicht einem lysosomalen Abbau zugeführt wird.

6.6 Die Rolle von Arrestin2 in Bezug auf Lokalisation und Stabilität des TRPL-Kanals

In Drosophila existieren zwei verschiedene Arrestine, denen eine prominente Rolle sowohl in der Deaktivierung als auch in der Internalisierung von Rhodopsin1 zugeschrieben wird. Während Arr2 zur Beendigung der Signalantwort beiträgt, vermittelt Arr1 die lichtinduzierte Endozytose des Rhodopsin1 (Dolph et al. 1993; Satoh und Ready 2005) Die Internalisierung von TRPL hingegen wird nicht durch Arrestine vermittelt (Meyer et al. 2006). Allerdings übt Arr2 einen Einfluss auf die rhabdomerische Lokalisation des TRPLs im Dunkeln aus. Im dunkeladaptierten Wildtyp lokalisiert TRPL gleichmäßig innerhalb der Rhabdomere, wohingegen junge arr2⁵-Mutanten eine Lokalisation des TRPLs an der Basis der Rhabdomere und in der Stalk-Membran aufweisen, wie sie im Wildtyp erst nach Belichtung auftritt (Cronin et al. 2006). Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Stabilität des TRPL-Proteins in Arr2-Mutanten. Es stellte sich durch Western-Blot-Analysen heraus, dass lediglich in sehr jungen arr2⁵-Mutanten noch wildtypische Mengen an TRPL vorhanden sind, die mit zunehmenden Alter der Fliegen stetig abnehmen, bis schließlich nach zehn Tagen in Dunkelheit kein TRPL mehr detektierbar ist (Cronin et al. 2006). Aufgrund dieser Daten wurde dem Arr2 eine zweifache Rolle zugesprochen: Zum einen im Hinblick auf die korrekte Lokalisation im Rhabdomer und zum anderen für die Stabilität des TRPL-Proteins. Ein ähnlicher Zusammenhang besteht zwischen dem Gerüstprotein INAD und dem TRP-Kanal. Der Verlust von INAD führt ebenfalls zu einer Misslokalisation von TRP, und auch die Menge des TRP-Kanals nimmt mit der Zeit ab (Chevesich, Kreuz, und Montell 1997a). In Anbetracht dieser Befunde wird für TRPL und Arrestin2 ein analoger Mechanismus diskutiert (Cronin et al. 2006).

6.6.1 Western-Blot- Analyse des TRPL-Gehaltes arr2-mutanter Fliegen

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Verlust von TRPL tatsächlich auf die Abwesenheit von Arr2 zurückzuführen ist oder ob eine andere Hintergrundmutation in den untersuchten $arr2^5$ -Nullmutanten den Abbau verursacht, wurde ein weiteres arr²-Allel mittels Western-Blot untersucht. Die $arr2^3$ -Mutante besitzt ein hypomorphes Allel und entspringt ebenfalls einem EMS-Mutagenese-Screen (Dolph et al. 1993). Da junge $arr2^5$ –Mutanten noch über nennenswerte TRPL-Mengen verfügen, wurde auch in den $arr2^3$ -Mutanten zuerst die Ausgangsmenge an TRPL in frisch geschlüpften Fliegen bestimmt, um anschließend den Verlust des TRPL-Proteins nach zehn Tagen in Dunkelheit zu überprüfen.



Abbildung 38: Vergleich der TRPL-Mengen in der *arr2*³-Mutante nach null und zehn Tagen Dunkelheit. Es wurden pro Spur vier Kopfäquivalente aufgetragen und in einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-Plus System. Als Kontrolle diente der Wildtyp. In frisch geschlüpften *arr2*³-Mutanten kann nur eine sehr geringe Menge an TRPL detektiert werden (A). Nach zehn Tagen Dunkeladaption kann in dieser Mutante kein TRPL mehr nachgewiesen werden (B).

Abbildung 38A zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse frischgeschlüpfter $arr2^3$ -Mutanten. Zuerst wurde der Arr2-Gehalt der Mutanten überprüft, der laut Literatur bei < 1% liegt, was durch diese Analyse bestätigt werden konnte (Dolph et al. 1993). Überraschend war, dass der TRPL-Gehalt in dieser Mutante, selbst in frischgeschlüpften Fliegen, wesentlich geringer als im Wildtyp war. Nach zehn Tagen Dunkeladaption war kein TRPL-Signal mehr detektierbar (Abb. 38B). Als Ladekontrolle diente jeweils der TRP-Kanal. Demnach wird der altersabhängige Verlust des TRPLs tatsächlich durch das Fehlen von Arrestin2 verursacht und nicht durch eine andere Mutation im genetischen Hintergrund der Fliegen.

Wie wirkt sich nun die Abwesenheit des Arr2-Proteins auf das TRPL-eGFP Fusionsprotein aus? Wird die getaggte Form von TRPL ebenfalls altersabhängig abgebaut oder wird dies durch den C-terminalen eGFP-Tag verhindert? Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde das TRPL-eGFP-Transgen in den *arr2*³-mutanten Hintergrund eingekreuzt. Die Doppelmutanten wurden anschließend, frisch geschlüpft, auf ihren TRPL-Gehalt hin untersucht. Als Kontrolle dienten hierbei sowohl der Wildtyp, als auch Fliegen, welche das TRPL-eGFP-Transgen im wildtypischen Hintergrund exprimieren.

In Abbildung 39 ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dargestellt. Als Kontrolle diente der Wildtyp sowie Fliegen, die das TRPL-eGFP-Transgen im wildtypischen Hintergrund exprimieren.



Abbildung 39: Western-Blot-Analyse der TRPL-eGFP-Menge im arr2³-mutanten Hintergrund. Es wurden pro Spur 4 Kopfäquivalente aufgetragen und in einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-Plus System. Als Kontrolle diente der Wildtyp sowie Fliegen, die das TRPL-eGFP-Transgen im wildtypischen Hintergrund exprimieren. In frisch geschlüpften *TRPL-eGFP;; arr23*-Mutanten kann nur eine sehr geringe Menge an TRPL detektiert werden. Demnach hat der C-terminale Tag keinen Einfluss auf den zeitabhängigen Abbau von TRPL im arr2³-mutanten Hintergrund.

In diesen Fliegen existieren zwei TRPL-Banden, die des nativen, und eine zusätzliche höhermolekulare welche das TRPL-eGFP Fusionsprotein repräsentiert. In frisch geschlüpften *TRPL*-eGFP;; $arr2^3$ -Mutanten kann im Vergleich zur Kontrollfliege, welche das TRPL-eGFP Transgen im wildtypischen Hintergrund exprimiert, nur eine sehr geringe Menge an TRPL und TRPL-eGFP detektiert werden. Demnach hat der C-terminale Tag keinen Einfluss auf den Abbau von TRPL im $arr2^3$ -mutanten Hintergrund.

6.6.2 Immunzytochemische Analyse der TRPL-Lokalisation im *arr2*mutanten Hintergrund

Um den Einfluss des Arr2-Verlustes auf die Anzahl gebildeter TRPL-Vesikel nach Belichtung zu analysieren, wurde die $arr2^5$ -Mutante verwendet, da diese Untersuchungen einen gewissen TRPL-Gehalt erfordern, welcher in frisch geschlüpften Fliegen dieses Genotyps noch vorhanden ist. Gleichzeitig sollte die vom Wildtyp abweichende Lokalisation an der Basis der Rhabdomere überprüft werden. Die $arr2^5$ -mutanten Fliegen wurden entweder 16 Stunden dunkeladaptiert oder für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet.

Abbildung 40C zeigt, dass TRPL in dunkeladaptierten $arr2^5$ -Mutanten tatsächlich eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation an der Rhabdomerbasis und in der angrenzenden Stalk-Membran zeigt. Die Verteilung des TRPLs an der Basis ist unregelmäßig. Es existieren sowohl Rhabdomere, die noch größere Mengen an TRPL enthalten, während andere nur noch eine Markierung der Stalk-Membran aufweisen. Nach zwei Stunden Belichtung befindet sich in der $arr2^5$ -Mutante bereits ein großer Teil des TRPLs außerhalb der Rhabdomere (Abb. 40D), wohingegen es im Wildtyp nach dieser Belichtungszeit lediglich an die Basis der Rhabdomere gelangt oder bereits in vesikulären Strukturen lokalisiert ist (Abb. 40B). Eine mögliche Erklärung für dieses beschleunigte Translokationsverhalten wäre der durch den Deaktivierungsdefekt verursachte, stärkere Ca²⁺-Einstrom analog zur tes¹-Mutante. Um zu überprüfen, ob dieser verstärkte Ca²⁺-Einstrom zum Verlust des TRPL-Proteins beiträgt, oder ob dieser Mechanismus vollkommen unabhängig von der Aktivierung der Signalkaskade ist, wurde eine $arr2^5, trp^{P343}$ - Doppelmutante hergestellt. Diese Doppelmutante wurde anschließend einer immunzytochemischen Analyse unterzogen, um den Einfluss der zusätzlichen trp^{P343} -Mutation auf Lokalisation und Translokation des TRPLs im $arr2^5$ -mutanten Hintergrund zu untersuchen.



Abbildung 40: Analyse der TRPL Lokalisation in der *arr2⁵*–Mutante. Die entsprechenden Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert oder für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Der Wildtyp fungierte als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). In dunkeladaptierten *arr2⁵*–Mutanten zeigt TRPL eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation an der Rhabdomerbasis (C). Nach zwei Stunden Belichtung befindet sich bereits ein großer Teil des TRPLs außerhalb der Rhabdomere (D), während es im Wildtyp nach dieser Belichtungszeit lediglich an die Basis der Rhabdomere gelangt (B). Der Maßstab entspricht 10 μm.

Aus Abbildung 401 wird deutlich, dass die Abwesenheit des TRP-Kanals im $arr2^5$ -mutanten Hintergrund keinen Einfluss auf die Lokalisation des TRPLs in dunkeladaptierten Fliegen ausübt (Abb. 41C). In der $arr2^5$, trp^{P343} - Doppelmutante zeigt TRPL dieselbe Lokalisation, an der Basis der Rhabdomere und in der angrenzenden Stalk-Membran, wie sie auch in der $arr2^5$ -Einzelmutante auftritt (Abb. 40C). Anders verhält es sich im belichteten Zustand. Hier treten deutliche Unterschiede im Internalisierungsverhalten des TRPL-Kanals in Erscheinung; während TRPL in der $arr2^5$ -Mutante bereits nach zweistündiger Belichtung die Rhabdomere fast vollständig verlassen hat, besteht in der Doppelmutante kein Unterschied zur Lokalisation im dunkeladaptierten Zustand (Abb. 41D). Folglich erfordert die Internalisierung des TRPL-Kanals auch im $arr2^5$ -mutanten Hintergrund, bei stark vom Wildtyp abweichender Lokalisation im Dunkeln, den mittels TRP-Kanal realisierten Ca²⁺-Einstrom.



Abbildung 41: Analyse der TRPL-Lokalisation in der *arr2*⁵,*trp*^{P343}- **Doppelmutante**. Die entsprechenden Fliegen wurden über Nacht dunkeladaptiert oder für zwei Stunden mit Weißlicht belichtet. Die *arr2*⁵-Mutante fungierte als Vergleich. Der TRPL-Kanal wurde durch einen primären Antikörper markiert, der von einem Cy5 gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Die Rhabdomere wurden mit Alexa Fluor 546 konjugiertem Phalloidin markiert (rot). In dunkeladaptierten *arr2*⁵,*trp*^{P343}-Doppelmutanten zeigt TRPL eine Lokalisation an der Rhabdomerbasis, wie sie auch in der *arr2*⁵-Mutante zu beobachten ist (C). Allerdings ist im Vergleich zur *arr2*⁵-Mutante nach zweistündiger Belichtung in der Doppelmutante keine Translokation zu erkennen, (B). Der Maßstab entspricht 10 μm.

Welchen Einfluss übt nun aber die Abwesenheit des TRP-vermittelten Ca²⁺-Einstroms auf die Stabilität bzw. den zeitabhängigen Abbau des TRPL-Kanals aus? Erfolgt der Abbau vollkommen unabhängig von der Aktivierung der Signalkaskade? Zur Beantwortung dieser Frage wurde sowohl in der *arr2⁵,trp*^{P343}- Doppelmutante als auch in der *arr2⁵*-Einfachmutante zuerst die TRPL-Ausgangsmenge in frisch geschlüpften Fliegen bestimmt, um anschließend den Verlust des TRPL-Proteins nach zehn Tagen in Dunkelheit zu überprüfen. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Western-Blot Analysen. Da eine der untersuchten Mutanten eine *trp*-Mutation besitzt wurde als Ladekontrolle anstatt des TRPs Rh1 verwendet. Außerdem wurde routinemäßig die Abwesenheit der Proteine TRP und Arr2 in den entsprechenden Mutanten überprüft.



Abbildung 42: Vergleich der TRPL-Mengen in der $arr2^5$, trp^{P343} - Doppelmutante nach null und zehn Tagen Dunkelheit. Es wurden pro Spur vier Kopfäquivalente aufgetragen und in einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-Plus System. Als Kontrolle diente der Wildtyp sowie die $arr2^{5-}$ Einfachmutante. Sowohl in frisch geschlüpften $arr2^{5-}$ Mutanten als auch in $arr2^{5}$, trp^{P343-} Doppelmutanten können wildtypische Mengen an TRPL detektiert werden (A). Nach zehn Tagen Dunkeladaption kann in der $arr2^{5-}$ Einfachmutante nur noch eine geringe Menge an TRPL nachgewiesen werden. Die $arr2^{5}$, trp^{P343-} Doppelmutante enthält nach zehn Tagen Dunkelheit kaum detektierbare Mengen an TRPL (B).

Sowohl in frisch geschlüpften $arr2^5$ -Mutanten als auch in $arr2^5$, trp^{P343} - Doppelmutanten können wildtypische Mengen an TRPL detektiert werden (Abb. 42A). Nach zehn Tagen Dunkeladaption können in beiden Mutanten nur noch geringe Mengen an TRPL nachgewiesen werden (Abb. 42B). Folglich kann aus den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse geschlossen werden, dass der zeitabhängige Verlust von TRPL unabhängig von der Photosignalkaskade bzw. dem daraus resultierenden Ca2⁺-Einstrom abläuft. Der Abbau des TRPL-Proteins in *arr2*-Mutanten ist demzufolge unabhängig von der Aktivität der visuellen Signalkaskade und tritt auch in Dunkelheit auf. Wie wirkt sich nun aber Licht, und der damit einhergehende Ca²⁺-Einstrom auf die Stabilität des TRPL-Proteins aus? Um diese Frage zu klären wurden Fliegen, welche jeweils eines der beiden mutanten Allele *arr2⁵* oder *arr2³* besitzen nach dreitägiger Belichtung auf ihren TRPL-Gehalt hin untersucht. Als Vergleich dienten, neben dem Wildtypen, dieselben mutanten Stämme nach dreitägiger Dunkeladaption. Die Belichtungsdauer wurde gewählt, da im Fall der *arr2^{3-Mutante}* eine lichtabhängige Degeneration der Photorezeptorzellen nach fünf Tagen Belichtung nachgewiesen werden konnte (Dolph et al. 1993). Abbildung 43 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analyse.



Abbildung 43: Vergleich der TRPL-Mengen in der arr2⁵- bzw. der arr2³- Mutante nach drei Tagen Belichtung oder Dunkelheit. Es wurden pro Spur vier Kopfäquivalente aufgetragen und in einem 8% SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL- Plus System. Als Kontrolle diente der Wildtyp. In beiden helladaptierten arr2-Mutanten können höhere TRPL-Mengen detektiert werden, als in den entsprechenden dunkeladaptierten Mutanten.

Auch nach dreitägiger Belichtung besitzt die *arr2⁵⁻*Mutante noch wildtypische Mengen an TRPL, wohingegen sie eine deutliche Abnahme der TRPL-Menge in Dunkelheit aufweist. Auch Mutanten, welche das *arr2³*-Allel besitzen zeigen eine stärkere Abnahme im Dunkeln, wo kaum noch TRPL nachgewiesen werden konnte. Der Abbau bei Belichtung wird vermutlich durch die bereits einsetzende Degeneration verursacht, was sich anhand der Ladekontrolle nachvollziehen lässt. Demnach lässt sich feststellen, dass der Abbau des TRPL-Kanals in Abwesenheit von Arrestin2 durch Aktivierung der Signalkaskade inhibiert werden kann.

7 Diskussion

7.1 Der Co-Transport von TRPL und Rhodopsin1

Die reizabhängige Änderung der Rezeptor- bzw. Ionenkanalausstattung von Zellmembranen stellt einen universellen Mechanismus dar, auf vielfältigste extrazelluläre Signale adäquate intrazelluläre Antworten/Reaktionen zu generieren. Dabei erfolgt die Regulation durch ein fein abgestimmtes Wechselspiel zwischen Exozytose, Endozytose oder dem Recycling des jeweiligen Rezeptors.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die lichtinduzierte Internalisierung und das anschließende Recycling des Ionenkanals TRPL aus *Drosophila* eingehend untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die lichtabhängige Endozytose dieses Kanals, zumindest teilweise, auf demselben Weg erfolgt, welcher auch für die lichtinduzierte Endozytose des Rhodopsin1 aus *Drosophila* verwendet wird (Schwemer 1984; Alloway et al. 2000).

Die Endozytoserate von Rh1 lässt sich durch die Wahl der verwendeten Lichtqualiät steuern, da sie von der Menge an gebildetem Metarhodopsin abhängig ist (Schwemer 1984). Die quantitative Untersuchung der Endozytose von TRPL und Rhodopsin1 bei verschiedenen Wellenlängen, auch unter dem Aspekt der Kolokalisation, führte zu einem überraschenden Ergebnis. Wellenlängen, welche zu einer maximalen Rh1-Endozytoserate führen (z.B. blau), induzieren die Internalisierung von TRPL nur in äußerst geringem Maße. Im Gegensatz dazu zeigt TRPL seine maximale Endozytoserate bei Orangelicht, welches die Internalisierung von Rh1 jedoch kaum induziert. Als mögliche Erklärung käme eine Konkurrenz der beiden Proteine in Frage, bei der die massive Endozytose des Rhodopsins die Internalisierung des TRPL-Kanals blockiert. Hierfür spricht auch die stark verlangsamte TRPL-Translokation bei massiver Rh1-Endozytose, was anhand von Zeitverläufen beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis kann nicht durch eine unterschiedlich starke Aktivierung der Phototransduktionskaskade begründet werden, da die elektrophysiologische Analyse der unterschiedlichen Wellenlängen mittels ERG-Messung eindeutig belegte, dass jede Lichtqualität für sich die Ausbildung einer vergleichbaren Lichtantwort induziert. Eine mögliche Erklärung bestünde daher in der Annahme einer Art von Kompetition zwischen diesen beiden Membranproteinen innerhalb des gemeinsamen Internalisierungsweges. Beispielsweise wäre denkbar, dass TRPL und Rhodopsin1 um einen limitierenden Faktor konkurrieren, welcher essentiell für die Internalisierung beider Proteine ist. Ein Beleg für diese These ist die in normalem Umfang ablaufende TRPL-Endozytose bei Blaubelichtung in Fliegen, welche ektopisch Rhodopsin3 statt des üblichen Rhodopsin1 in den Photorezeptoren R1-R6 exprimieren. Dieses besitzt, im Gegensatz zu Rh1, ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich und wird deswegen bei Blaubelichtung nicht internalisiert, so dass die Kapazität des Endozytoseapparates dem TRPL-Kanal in vollem Umfang zur Verfügung steht.

Ein ähnlicher Kompetitions-Mechanismus wurde für das lysosomale Glykoprotein Lamp1 und den Transferrinrezeptor (TfR) beschrieben (Warren et al. 1998). In der zugrunde liegenden Arbeit wurden verschiedene Rezeptoren, deren Clathrin-vermittelte Endozytose durch ein C-terminales Tyrosin-Motiv (YXRF) (Collawn et al. 1990) induziert wird, in Zellkultur überexprimiert, um somit etwaige Kompetitions-Ereignisse bezüglich ihrer Internalisierung aufzudecken. Die Clathrin-vermittelte Endozytose kann entweder durch ein Tyrosin- oder ein Dileucin-Motiv eingeleitet werden (Marks et al. 1997).



Abbildung 44: Die Rolle der Konnektor-Proteine bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. a: In untransfizierten Zellen sind die Konnektoren für LDLR und TfR/Lamp1 im Überschuss vorhanden und können somit ihre Rezeptoren zu den coated pits dirigieren. b: In Zellen, die den TfR-Rezeptor überexprimieren, ist der Pool an TfR/Lamp1- Konnektoren erschöpft, was zu einer Akkumulation von TfR und Lamp1 an der Membran führt, die sich in Wartestellung befinden. Die Endozytose des LDLR wird nicht beeinflusst, da weiterhin genügend freie LDL-Konnektoren vorhanden sind. Verändert nach Warren et al. 1998.

Die untersuchten Rezeptoren waren in diesem Fall TfR, LDL-Rezeptor, EGF-Rezeptor und Lamp1. Es konnte keine Kompetition zwischen TfR, LDLR und dem EGF-Rezeptor beobachtet werden. Vielmehr scheint es so zu sein, dass die Endozytose eines jeden Rezeptors einen spezifischen
Sättigungsbereich aufweist, welcher auch bei Überexpression des Proteins nicht überschritten wird (Warren et al. 1998).

Die Endozytose von Membranrezeptoren, beispielsweise des EGFRs (Vieira, Lamaze, und Schmid 1996), wird meist nach Bindung ihres Liganden eingeleitet, allerdings gilt diese Voraussetzung nicht für Rezeptoren, die einer konstitutiven Endozytose unterliegen wie z.B. der Transferrin- (Hopkins und Trowbridge 1983) oder LDL-Rezeptor (Anderson 1982). Die Interaktion mit "Konnektoren", welche das Cargo-Protein zu einem "Coated pit" (Goldstein et al. 1985) dirigieren, erfolgt in diesem Fall ohne vorherige Liganden-Bindung. Allerdings existieren für konstitutiv endozytierte Rezeptoren Hinweise auf eine geclusterte Lokalisation in unmittelbarer Nähe von "Coated pits". Dadurch wird die Interaktion mit Adaptorproteinen wie z.B. AP-2 (Robinson 1989) erleichtert.

Bei AP-2 handelt es sich um ein tetrameres Protein, das aus vier Adaptinen aufgebaut ist und die Bindung zwischen dem zu internalisierenden Protein und Clathrin vermittelt (Boll et al. 1996). Gleichzeitig sorgt die Retention mittels Adaptorproteinen innerhalb eines "Coated pits" dafür, dass die Endozytose rasch ablaufen kann. Ihre Beobachtungen dienten der Arbeitsgruppe von Warren schließlich als Basis für ein Modell, welches den Kompetitions-Mechanismus zwischen dem Transferrinrezeptor und Lamp1 gut abbildet (Abb. 44). Die Kompetition zwischen den zu internalisierenden Proteinen TfR und Lamp1 tritt erst auf, nachdem TfR überexprimiert wurde (Abb. 44b). In untransfizierten Zellen sind die Konnektoren für TfR/Lamp1 und LDL im Überschuss vorhanden und können somit ihre Rezeptoren zu Clathrin coated pits dirigieren (Abb. 44a). Anders stellt sich die Situation in Zellen dar, in welchen der Transferrin-Rezeptor (TfR) überexprimiert wurde. Durch den Überschuss an TfR erschöpft der Pool an freien TfR/Lamp1- Konnektoren, was schließlich zu einer Akkumulation von TfR und Lamp1 an der Membranoberfläche führt. Die Rezeptoren befinden sich in einer Art "Wartestellung" und zwar solange, bis erneut freie Konnektoren verfügbar sind. Die Endozytose des LDLR wird nicht beeinflusst, da weiterhin genügend freie LDL-Konnektoren vorhanden sind (Warren et al. 1998). Aus diesen Beobachtungen schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass in der Clathrin-vermittelten Endozytose mehrere limitierende Faktoren existieren, welche essentiell für die Internalisierung des betreffenden Rezeptors sind. Dadurch ließen sich sowohl die unterschiedlichen Sättigungsbereiche der Rezeptoren, als auch die Kompetition zwischen manchen Rezeptortypen erklären. Bemerkenswert ist außerdem, dass diese Art der Kompetition nicht bei allen Rezeptoren auftritt, die aufgrund ihres Internalisierungssignals in denselben "Coated pit" gelangen. Die Konkurrenz wird erst durch die gemeinsamen limitierenden Komponenten ausgelöst. In diesem Fall wurden die limitierenden Faktoren als "Konnektoren" bezeichnet, wobei die genaue Identität dieser Proteine bisher nicht geklärt werden konnte. Allerdings wird vermutet, dass diese "Konnektoren" in die Rekrutierung von AP-2 zur Plasmamembran involviert sind, womit sie direkt oder indirekt die Endozytose des jeweiligen Rezeptors einleiten.

Wenn dieses Modell auf die gemeinsame Internalisierung von TRPL und Rh1 übertragen wird, wäre folgender Mechanismus denkbar: Die Endozytose von TRPL und Rhodopsin1 (Han et al. 2007) erfolgt Dynamin-abhängig. Darüber hinaus wurde für Rhodospin1 die Beteiligung des Adaptorproteins AP-2 an der Internalisierung nachgewiesen, wobei die Interaktion durch ein C-terminales Motiv von Arrestin2 vermittelt wird (Kiselev et al. 2000; Orem et al. 2006). Mit Hilfe einer Software zur Sequenzanalyse (http://elm.eu.org) ließen sich für TRPL und Rhodopsin putative Tyrosin-Bindemotive nachweisen, welche bei der Clathrin-vermittelten Endozytose die Interaktion mit Adaptorkomplexen vermitteln. Hierbei handelte es sich um das Tyrosinbindemotiv $YXX\Phi$, das im Fall von TRPL gleich mehrfach im N-Terminus auftrat und sich auch in der Sequenz des Rhodopsins wiederfindet. Dadurch ergibt sich folgender theoretischer Kompetitionsmechanismus für die Internalisierung von TRPL und Rhodopsin bei Blaubelichtung: Das durch Belichtung mit blauem Licht in großer Menge gebildete Metarhodopsin wird durch Bindung von Arrestin2 in Kontakt zum Adaptorprotein AP-2 gebracht. Anschließend vermittelt ein hypothetischer "Rh1/TRPL-Konnektor", eventuell durch Interaktion mit Tyrosin-Bindemotiven, die Diffusion zu einem geeigneten "Coated pit". Dort wird die Bildung der Clathrinhülle durch Rekrutierung von Clathrin durch AP-2 eingeleitet. Durch die massive Endozytose von Rhodopsin1 sind keine freien Rh1/TRPL-Konnektoren mehr vorhanden, weswegen TRPL zwar an die Basis der Rhabdomere diffundiert, jedoch keinen regulierten Transport zu einem "Coated pit" erfährt und somit nicht in Vesikel abgeschnürt wird. Dadurch ließe sich auch die stark verlangsamte Translokationsgeschwindigkeit von TRPL bei Blaubelichtung erklären bzw. die schnelle Translokation bei Orangelicht, wo ein sehr niedriger Metarhodopsin-Level vorherrscht (Abb. 16).

7.2 Der Einfluss von Rab-Proteinen auf die Internalisierung des TRPL-Kanals

Die Endozytose von Rhodopsin1 wird durch das monomere G-Protein Rab5 vermittelt (Satoh et al. 2005; Han et al. 2007). Folglich ließ der gemeinsam genutzte Endozytoseweg von Rhodopsin1 und TRPL eine Beteiligung von Rab-Proteinen an der Internalisierung des TRPL-Kanals vermuten, weshalb die TRPL-Translokation in 29 dominant negativen Rab-Mutanten (Zhang et al. 2007) untersucht wurde. Dieser Mutanten-Screen führte letztlich zur Identifikation zweier Kandidaten, welche eine defekte TRPL-Internalisierung bei Belichtung offenbarten.

Der Translokationsdefekt in Fliegen, die entweder ein dominant negatives Rab5DN oder RabX4DN exprimierten, ließ sich sowohl *in vivo* für das Fusionsprotein TRPL-eGFP, als auch anhand markierter Schnitte für das native TRPL nachweisen. Beide Mutanten zeigten auch nach zweistündiger Belichtung überwiegend eine Lokalisation des TRPLs an der Basis der Rhabdomere, die dem ersten

schnellen Translokationsstadium nach wenigen Minuten Belichtung entspricht (Cronin et al. 2006). Der Eintritt ins zweite Translokationsstadium, welches zu einer Lokalisation im Zellkörper der Photorezeptorzelle führt, unterbleibt in den beiden dominant negativen Rab-Mutanten Rab5DN und RabX4DN. Diese Beobachtung deckt sich ausgezeichnet mit dem erwarteten Phänotyp im Fall einer inhibierten Vesikelabschnürung.

Bei Rab5 handelt es sich um ein gut untersuchtes monomeres G-Protein, welches zwischen *Drosophila* und Vertebraten konserviert ist (Bucci et al. 1992; Li 1996). Die Rolle von Rab5 in der Endozytose von Membranproteinen konnte bereits weitestgehend aufgeklärt werden. Seine Funktion besteht einerseits in der Regulation der Endozytose an der Plasmamembran, andererseits vermittelt Rab5 die Fusion von Vesikeln mit frühen Endosomen ("Sorting Endosomen") sowie den Transport von frühen zu späten Endosomen (Gorvel et al. 1991; Somsel Rodman und Wandinger-Ness 2000). Es existieren zahlreiche Beispiele für die Beteiligung von Rab5 an endozytotischen Mechanismen, beispielswiese wird die Internalisierung des β_2 -Adrenorezeptors (Chuang und Costa 1979), des Dopaminrezeptors D2 (Bartlett et al. 2005) und des Transferrinrezeptors (Trischler et al. 1999) von Rab5 vermittelt. Die in der Literatur beschriebene Funktion von Rab5 trifft demnach auch für die lichtinduzierte Internalisierung des TRPL-Kanals zu.

Über die Funktion des RabX4-Proteins aus *Drosophila* liegen bisher nur wenige Daten vor. Allerdings offenbarten Lokalisationsstudien in Zellkultur eine Kolokalisation von RabX4 mit Rab5 in frühen Endosomen, weshalb RabX4 ebenfalls eine Funktion an der Endozytose zugeschrieben wurde (Zhang et al. 2007). Darüber hinaus ergaben neuere Expressionsstudien, dass RabX4 außerdem während der Embryonalentwicklung in Neuronen von Photorezeptoren sowie in Augen-Imaginalscheiben vorkommt (Chan et al. 2011).

Darüber hinaus gelang es im Verlauf dieser Arbeit Kolokalisationen zwischen TRPL und Rab5 bzw. zwischen TRPL und RabX4 aufzudecken, was ebenfalls für eine Beteiligung von RabX4 an endozytotischen Prozessen, genauer gesagt an der Internalisierung des TRPLs spricht.

Nicht nur die Internalisierung, sondern auch die regulierte Exozytose von Membranproteinen wird häufig durch Rab-Proteine vermittelt (von Mollard et al. 1994). Die Exozytose des Rhodopsin1 erfolgt beispielsweise zusammen mit dem TRP-Kanal Rab11-abhängig (Satoh et al. 2005). Allerdings konnte durch frühere Untersuchungen anhand einer dominant negativen Rab11-Mutante eine Beteiligung am sekretorischen TRPL-Transport ausgeschlossen werden (Richter 2007).

Ein weiteres Beispiel für einen Rab-vermittelten Transport stellt die Exozytose des Glukostransporters (GLUT4) dar, welcher nach Insulin-Stimulation unter Mitwirkung von Rab4 und Rab11 zur Zellmembran gelangt (Vollenweider et al. 1997; Kessler et al. 2000).

Auch für einige Vertreter der TRP-Familie wurde eine Beteiligung von Rab-Proteinen an der Exozytose beschrieben, beispielsweise wird der Transport der epithelialen Ca²⁺-Kanäle TRPV5 und TRPV6 durch Rab11a vermittelt, wobei die Interaktion mit dem Rab-Protein über den C-Terminus der

Kanäle erfolgt (van de Graaf et al. 2006). Darüber hinaus hängt das Recycling des TRPC6-Kanals, welcher in Podozyten einen Liganden-induzierten Ca²⁺-Einstrom vermittelt, von Rab11 ab. Anschließend gelangt der Kanal unter Einwirkung von Angiotensin II zurück zur Plasmamembran (Cayouette et al. 2010; Greka und Mundel 2011).

Auch für Rhodopsin1 aus *Drosophila* wurde gezeigt, dass dessen Transport zur Plasmamembran durch Rab11 vermittelt wird (Satoh et al. 2005). Der in dieser Arbeit durchgeführte Screen dominant negativer Rab-Mutanten führte nicht zur Identifikation von Kandidaten, welche einen Defekt in der Exozytose des TRPL-Kanals aufwiesen. Ein möglicher Grund hierfür könnte im Mechanismus der dominant negativen Rab-Mutanten liegen. Die untersuchten Fliegen exprimierten dominant negative Rab-Konstrukte, welche eine Mutation in Form eines Aminosäure-Austausches in der konservierten GTP-Bindedomäne tragen, welcher zu einer Arretierung des Rab-Proteins in der GDP-gebundenen Form führt (Zhang et al. 2007). In wildtypischen Rab-Proteinen wird die Funktion durch einen zyklischen Wechsel von der GDP- zur GTP-gebundenen Form reguliert (Abb. 45).



Abbildung 45: Der GTPase-Zyklus von Rab-Proteinen. Der Wechsel zwischen der GDP- und der GTP-gebundenen Form des Rab-Proteins wird durch einen GDP/GTP-Exchange Faktor (GEF) katalysiert. Die Rekonversion zurück zur GDPgebundenen Form erfolgt durch Hydrolyse des GTPs, die durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) vermittelt wird. Die aktive GTP-gebundene Form ist in der Lage, mit Effektor-Proteinen zu interagieren und somit eine Vielzahl zellulärer Prozesse in Gang zu setzen, darunter z.B. Transport, Recycling, Endozytose und Exozytose. Verändert nach Wiesmuller and Wittinghofer 1994).

Die Aktivierung des Rab-Proteins erfolgt hierbei durch sogenannte GDP/GTP-Exchange Faktoren (GEF), welche wiederum durch externe Stimuli aktiviert werden. Nachdem das Rab-Protein GTP gebunden hat, vermag es Effektorproteine zu aktivieren und letztendlich seine Funktion in der Endobzw. Exozytose zu verrichten (Wiesmuller and Wittinghofer 1994). Die anschließende Hydrolyse des GTPs wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) vermittelt, die ihrerseits extern reguliert werden (Bourne, Sanders, und McCormick 1991). Für dominant negative Rab- und Ras-Proteine wurde nachgewiesen, dass sie verschiedene Effektorproteine z.B. GEFs oder GAPs sequestrieren, so dass diese für die Funktion der nativen Rab-Proteine bzw. für deren GTPase-Zyklus nicht mehr zur Verfügung stehen (Powers, O'Neill, und Wigler 1989; Burstein, Brondyk, und Macara 1992; Jones et al. 1995; Assaker et al. 2010). Dadurch wird die Funktion des jeweiligen nativen Rab-Proteins inhibiert, es kann allerdings kein vollständiger Funktionsverlust, wie er bei Nullmutanten auftritt, erreicht werden, da es sich bei dem zugrundeliegenden Mechanismus um eine Kompetition handelt, bei welcher das Gleichgewicht vom Verhältnis zwischen Rab- bzw. dominant negativem Rab-Protein abhängt (Chen, Ernst, und Williams 2003). Je nachdem in welchem Bereich des Genoms das dominant negative Rab-Konstrukt zufällig inseriert, wird das entsprechende dominant negative Rab-Protein unterschiedlich stark exprimiert. Dadurch ist es theoretisch möglich, dass die Aktivität des dominant negativen Gens zu gering ist, um die Funktion des wildtypischen Rab-Proteins in ausreichender Weise zu beeinträchtigen. Dies ist möglicherweise die Erklärung dafür, warum im Verlauf des Screens keine Rab-Kandidaten identifiziert wurden, welche eine defekte TRPL-Exozytose aufweisen.

7.3 Die Rolle von Arrestin2 für Stabilität und Lokalisation des TRPL-Kanals

Immunzytochemische Untersuchungen von *arr2⁵*-Mutanten offenbarten eine stark vom Wildtyp abweichende Lokalisation des TRPL-Kanals im Dunkeln (Cronin et al. 2006). Während er sich in wildtypischen Fliegen vollständig innerhalb der Rhabdomere befindet, ist der TRPL-Kanal in *arr2⁵*-Mutanten an deren Basis lokalisiert, was vergleichbar mit dem ersten schnellen Translokationsstadium nach wenigen Minuten Belichtung ist. Diese Fehllokalisation führt nun auf unbekannte Weise innerhalb weniger Tage zu einem zeitabhängigen Verlust des TRPL-Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte experimentell belegt werden, dass der Verlust von TRPL tatsächlich allein vom Verlust des Arrestin2-Proteins abhängt, da er in verschiedenen *arr2*-Allelen mit jeweils unterschiedlichen genetischen Hintergründen dokumentiert werden konnte. Eine Mutation im TRPL-Kanal kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden, zumal auch das Fusionsprotein TRPL-eGFP vom Verlust betroffen ist. Der Verlust von TRPL erfolgt überwiegend im Dunkeln, wenn TRPL im Rhabdomer lokalisiert ist, nicht jedoch im Licht, wenn sich TRPL in einem Speicherkompartiment im Zellkörper befindet. Arr2 scheint daher lediglich im Rhabdomer für die Stabilität von TRPL nötig zu sein. Was den Mechanismus des zeitabhängigen Verlusts von TRPL angeht, wird für Arrestin2 in dunkeladaptierten Fliegen die Funktion eines Anker- oder Gerüstproteines, analog zur Rolle des INADs in Bezug auf TRP, diskutiert (Shieh und Niemeyer 1995; Shieh und Zhu 1996). In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von TRP und inaD über die dritte und fünfte PDZ-

Domäne (von insgesamt fünf) des inaDs erfolgt (Liu et al. 2011). *inaD*²¹⁵-Mutanten, welche eine Mutation in dieser PDZ-Domäne besitzen, zeigen nur kurz nach dem Schlüpfen noch wildtypische TRP-Mengen, die jedoch (analog zur TRPL-Menge in *arr2*⁵-Mutanten) innerhalb von zehn Tagen abgebaut werden (Tsunoda et al. 1997; Chevesich, Kreuz, und Montell 1997b).

Was die Rolle des Arrestin2 in Bezug auf Verankerung und Stabilität des TRPLs angeht stellt sich die Frage, wie diese Funktion mit der lichtabhängigen Translokation des Arrestin2 zu vereinbaren ist, zumal diese in entgegengesetzter Richtung wie die des TRPL-Kanals verläuft (Byk et al. 1993; Alloway et al. 2000). Allerdings wird durch mehrere unabhängige Untersuchungen belegt, dass sich selbst in dunkeladaptierten Fliegen noch ca. 25% des Arrestin2 innerhalb der Rhabdomere befindet, was somit eine wie auch immer geartete Interaktion mit TRPL ermöglichen würde (Satoh und Ready 2005; Satoh et al. 2010). Was die Mengenverhältnisse der rhabdomerischen Proteine zueinander angeht wäre eine Interaktion zwischen Arrestin und TRPL, die zu einer vollständigen Retention aller TRPL-Proteine führt, durchaus denkbar, da 25% der Arrestin2-Menge ungefähr dem 20fachen der TRPL-Menge entspricht (Kiselev und Subramaniam 1994; Hermann 1996).

Was den zugrundeliegenden Mechanismus der Arrestin2-Translokation angeht, wurden vor kurzem neue Erkenntnisse gewonnen. In dunkeladaptierten Fliegen ist ein Großteil des Arr2 im Zytoplasma der Photorezeptorzelle lokalisiert, wo es gebunden an das unkonventionelle Myosin NINAC vorliegt (Satoh et al. 2010) (Abb. 46 links). Darüber hinaus wird vermutet, dass in Dunkelheit auch die rhabdomerische Fraktion des Arrestin2 mit einer Isoform von NINAC interagiert. Bei Belichtung werden die Bindungen zwischen NINAC und Arr2 Ca²⁺-abhängig aufgehoben, was zu einer Freisetzung des Arrestin2 im Rhabdomer und folglich zu einer schnellen Inaktivierung eines Teils des Metarhodopsins führt (Hardie et al. 2012). Auch die zytosolische Fraktion des Arr2 vermag nun aufgrund ihrer Affinität zu Metarhodopsin ins Rhabdomer zu diffundieren, wo es ebenfalls zu seiner Inaktivierung beiträgt (Abb. 46 rechts). Die Ca²⁺-Abhängigkeit der Arr2-Freisetzung wird wahrscheinlich durch die C-terminalen Calmodulin-Bindemotive des NINACs vermittelt. Eine umfassende Analyse der Arrestin2-Translokation in *ninaC*-Mutanten legt allerdings die Existenz eines weiteren Ca2+-abhängigen Bindungspartners des Arr2 nahe. Auch die Beobachtung einer verlangsamten Arr2-Translokation in dunkeladaptierten ninaC-Mutanten stützt diese Hypothese. Die Geschwindigkeit der Arr2-Translokation in dieser Mutante kann allerdings durch vorherige Orangebelichtung wieder annähernd auf ein wildtypisches Niveau beschleunigt werden. Die Autoren vermuten, dass dieser alternative Bindungspartner in Abwesenheit von Ca²⁺ im Zytosol lokalisiert ist, allerdings lassen ihre Beobachtungen unterschiedliche Interpretationen zu (Hardie et al. 2012).



Abbildung 46: Modell der lichtabhängigen Arrestin2-Translokation. In dunkeladaptierten Rhabdomeren (links) liegt Rhodopsin in seiner inaktiven Form vor (blau). Ein Teil des Arrestin2-Pools (grün) ist im Zytoplasma lokalisiert, wo es an NINAC (pink) gebunden vorliegt. TRPL (gelb) ist innerhalb der rhabdomerischen Membran lokalisiert, wo es mit Arrestin2 interagiert. Arr2 ist gleichzeitig an die rhabdomerische Form von NINAC gebunden (pink). In helladaptierten Fliegen (rechts) wurde die Bindung zwischen Arrestin2 und seinen Bindungspartnern TRPL und NINAC Ca²⁺-abhängig gelöst. Rhabdomerisches Arrestin2 bindet an Metarhodopsin (rot) und leitet somit dessen Inaktivierung ein. Auch die zytoplasmatische Fraktion des Arrestin2 befindet sich nun innerhalb des Rhabdomers, wohin es aufgrund seiner Affinität zu Metarhodopsin durch Diffusion gelangte. Die Arrestin2-Menge ist nicht ausreichend, um alle Metarhodopsin-Moleküle zu inaktivieren. Verändert nach Satoh et al., 2010.

Dieser hypothetische zweite "Dunkel-Sink" könnte auch in Form von TRPL existieren, wodurch sich folgender hypothetischer Mechanismus ergibt (Abb. 46 links): Die Retention des TRPL-Kanals im Rhabdomer wird in dunkeladaptierten Fliegen durch eine Bindung an Arrestin2 bzw. an einen Arr2/NINAC-Komplex vermittelt. Bei Belichtung wird diese Bindung Ca²⁺-abhängig gelöst, was durch die Calmodulin-Bindemotive des TRPLs vermittelt werden könnte. Dadurch vermag TRPL nun an die Basis der Rhabdomere zu gelangen, von wo aus es schließlich internalisiert wird. Das frei gewordene Arr2 kann seinerseits an aktiviertes Rhodopsin binden und dieses schnell inaktivieren, noch bevor zytosolisches Arr2 zu diesem Zweck ins Rhabdomer diffundiert. Nach mehrstündiger Belichtung gelangt TRPL letztendlich in ein Speicherkompartiment, wo es bis zum Eintritt der Dunkelheit verbleibt (Abb. 46 rechts). In Abwesenheit von Arr2 unterbleibt die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen und folglich auch die Retention von TRPL im Rhabdomer, weshalb der TRPL-Kanal auch in Abwesenheit von Ca²⁺ zur Basis der Rhabdomere gelangen kann. Dies deckt sich mit neueren Erkenntnissen, die darauf hindeuten, dass das erste Translokations-Stadium ATP-unabhängig, möglicherweise sogar passiv erfolgt (Lieu et al. 2012). Von dort aus gelangt TRPL

mittels endozytotischer Vesikel ins Zytoplasma der Photorezeptorzelle, wo es allerdings nicht in Recycling-Endosomen sortiert wird, sondern einem lysosomalen Abbau zugeführt wird.

Dies wirft die Frage auf, warum TRPL, welches in Dunkelheit, also in Abwesenheit von Ca²⁺ internalisiert wird, keiner regulären Speicherung im Zellkörper der Photorezeptorzelle unterliegt, wie es für TRPL, das lichtabhängig internalisiert wurde, der Fall ist. Möglicherweise liegt die Ursache in Unterschieden im Phosphorylierungsmuster zwischen der licht- bzw. dunkeladaptierten Form des Proteins, die zu der geänderten Sortierung und letztlich zu seinem Abbau beitragen. Ein wesentlicher lichtabhängiger Unterschied im Phosphorylierungsmuster des TRPL-Kanals wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen gezeigt. Darüber hinaus gelang es, einen Zusammenhang zwischen der Stabilität des Proteins und seinem Phosphorylierungsmuster nachzuweisen. Anhand Phoyphorylierungsmutanten konnte überdies verschiedener gezeigt werden, dass das Phosphorylierungsmuster auch die subzelluläre Lokalisation des Kanals beeinflusst (A. Cerny, persönliche Mitteilung).

Erreicht nun aber in Abwesenheit von Arrestin2 dunkeladaptiertes TRPL (mit entsprechendem Phosphorylierungsmuster) die Basis der Rhabdomere, so wird es zwar internalisiert, gelangt jedoch anschließend nicht ins Recyclingendosom oder das subzelluläre Speicherkompartiment, sondern wird stattdessen einem Abbau zugeführt. Demnach wäre also durchaus denkbar, dass erst das korrekte lichtabhängige Phosphorylierungsmuster des TRPL-Kanals zu einer korrekten Sortierung ins Speicherkompartiment führt. Dies verhindert nicht nur seine Degradation, sondern schafft gleichzeitig die Voraussetzung für das anschließende Recycling bzw. die Reinsertion des Kanals in die Membran.

Eine Beeinflussung der Lokalisation durch eine Änderung im Phosphorylierungsmuster wurde bereits für verschiedene Arten von Membranproteinen beschrieben. Beispielsweise wurde für den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv2.1, welcher überwiegend in den Neuronen von Säugern vorkommt, gezeigt, dass jeweils unterschiedliche C-terminale Phosphorylierungsmuster (in Form von bestimmten Kombinationen mehrerer Phosphorylierungsstellen) für die Lokalisation in der Zellmembran bzw. in Teilbereichen des Endoplasmatischen Retikulums verantwortlich sind und eine Mutation der entsprechenden Phosphorylierungsstellen folglich zu einer geänderten Lokalisation des Kanals führen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich hierbei um eine Art von Phosphorylierungsstellen je nach Lokalisation auftritt (Yang et al. 2007). Dieses Art der Regulation wurde auch für den Muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M₃) aus der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gezeigt, der je nach Lokalisation in unterschiedlichen Gewebetypen verschiedene Phosphorylierungsmuster aufweist, die gleichsam als Sortierungssignale fungieren (Butcher et al. 2011).

Auch der Einwärtsgleichrichter-K⁺-Kanal ROMK ("Renal Outer Medullary Potassium channel"; Genprodukt von Kir1.1), welcher an der Regulation der Kaliumausscheidung in der Niere maßgeblich beteiligt ist, zeigt eine phosphorylierungsabhängige Translokation zur Zelloberfläche (Yoo et al. 2005). Eine Erklärung für den zeitabhängigen Abbau von TRPL in Abwesenheit von Arrestin2 könnte demnach tatsächlich in der Eigenschaft von Arrestin2 als Gerüstprotein gegeben sein. Funktionen, die durch Arrestine vermittelt werden, sind vielfältig und reichen weit über ihre klassische Rolle in der Inaktivierung von Rezeptoren hinaus. Mehrere Arbeiten thematisieren Arrestine in ihrer Funktion als Gerüstproteine, welche beispielsweise aktivierte GPCRs mit ihren Interaktionspartnern zu einem Reaktionskomplex zusammenfassen. Zu diesen Partnern gehört neben Clathrin auch das Adaptorprotein-2 sowie verschiedene Kinasen (z.B. Src und JNK3), die durch die Phosphorylierung von Zielproteinen zur Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalwege beitragen (Miller und Lefkowitz 2001; Milano et al. 2002).

Ebenso werden Komponenten der mehrstufigen MAP-Kinasekaskade (Mitogen activated), welche die zelluläre Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren vermitteln, durch β -Arrestine in Kontakt gebracht. Auch in diesem Fall vermittelt Arrestin die Interaktionen zwischen den verschiedenen Kinasen und ihren Zielproteinen (ERK, JNK etc.) wobei interessanterweise ein "Crosstalk" zwischen Signalwegen, die GPCR-vermittelt aktiviert werden, und MAP-Kinasekaskaden besteht (Morrison and Davis 2003; Lefkowitz, Rajagopal, und Whalen 2006).

Was die Retention von TRPL innerhalb der Rhabdomere angeht, wäre denkbar, dass Arrestin2 durch seine Gerüstfunktion verhindert, dass TRPL in dunkeladaptierten Fliegen diffusionsvermittelt an die Basis der Rhabdomere gelangt.

7.4 Hypothetischer Transportmechanismus des TRPL-Kanals

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Internalisierung des TRPL-Kanals auf demselben Endozytoseweg erfolgt wie die lichtinduzierte Internalisierung des Rhodosopin1. Beide Prozesse zeichnen sich durch ihre Dynamin-Abhängigkeit und eine Beteiligung der kleinen GTPase Rab5 an der Endozytose aus. Allerdings gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht zu klären, ob es sich hierbei tatsächlich um eine gemeinsame Abschnürung handelt oder ob die jeweiligen TRPL-bzw. Rhodopsin1-positiven endozytotischen Vesikel erst in Endosomen kolokalisieren, nachdem sie getrennt internalisiert wurden. Darüber hinaus ist unklar, an welcher Stelle des Endozytosewegs sich die Wege der beiden internalisierten Proteine, die letztlich völlig unterschiedliche Schicksale erfahren, trennen. Eine Cointernalisierung wurde bereits für mehrere Membranproteine nachgewiesen, beispielsweise erfolgt die Endozytose des Adenosinrezeptors A_{2A} ($A_{2A}R$) in humanen Neuroblastomzellen gemeinsam mit dem Dopaminrezeptor D2 (D2R) (Joelle et al. 2002).

Auch die beiden Opioidrezeptoren MOR (μ -opioid Rezeptor) und DOR (δ -opioid Rezeptor) zeigen nach Behandlung mit DOR-spezifischen Antagonisten eine Cointernalisierung mit anschließender Ubiquitinierung und lysosomalem Abbau (He et al. 2011).

Demnach wäre auch eine gemeinsame Internalisierung von TRPL und Rhodopsin1 vorstellbar. Eine abschließende Klärung dieser Frage ist aber ohne entsprechende elektronenmikroskopische Analyse mittels Doppelmarkierung beider Proteine kaum möglich. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der lichtinduzierten Internalisierung des Rhodopsin1 im Verlauf dieser Arbeit ergab, dass es sich bei den endozytotischen Rh1-positiven Strukturen, die nach Belichtung auftreten, überwiegend um frühe bzw. späte Endosomen handelt, wobei sich späte Endosomen durch ihre charakteristische "multivesikuläre" Struktur auszeichnen, die durch Abschnürung von Vesikeln ins Innere (Intraluminale Vesikel) entstehen (Piper und Katzmann 2007). Eine exakte morphologische Abgrenzung zwischen den beiden Organelltypen ist aufgrund des "Ineinander Übergehens" bzw. Reifens nicht exakt möglich, jedoch weiß man, dass dieser Prozess mit einem Wechsel von Rab5 zu Rab7 bzw. Rab9 als Markerprotein einhergeht (Lombardi et al. 1993; Rink et al. 2005). Frühe Endosomen entstehen durch Fusion von endozytotischen Vesikeln an der Plasmamembran und fungieren als multifunktionale Sortierstationen der Zelle. An dieser Stelle entscheidet sich gleichsam das Schicksal des internalisierten Proteins, das anschließend entweder via Recyclingendosom zurück zur Plasmamembran gelangt (z.B. Transferrinrezeptor) oder aber einem Abbau zugeführt wird, was mit einer Reifung zu späten Endosomen und der Fusion mit Lysosomen einhergeht (Woodman 2000; Spang 2009). Im Verlauf dieses Sortier- und Reifungsvorgangs ändert sich neben dem pH-Wert auch die Form des Endosoms; es bildet schlauchförmige "Ausläufer", in welche Proteine sortiert werden, die anschließend recycelt werden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Struktur des frühen Endosoms weitaus komplexer ist als bisher angenommen, weswegen es auch als "Tubuläres endosomales Netzwerk" (TES) bezeichnet wird. Die dynamische, zugleich tubuläre und vesikuläre Struktur ermöglicht eine effiziente Proteinsortierung, allerdings ist der zugrundeliegende Mechanismus bisher weitestgehend unklar (Carlton et al. 2005; Cullen 2008).

Im Prozess der Protein-Sortierung im frühen Endosom spielen "Sorting Nexine (SNX)" eine wichtige Rolle. Hierbei handelt es sich um evolutionär stark konservierte Proteine, welche sich durch eine SNX-PX-Domäne, eine Unterfamilie der Phox (PX) Domänen auszeichnen, welche als Phosphoinositid (PI)-Bindemotiv fungieren. Diese Domäne erlaubt es Nexinen, an PI-reiche Membranen (wie sie Sorting Endosomen besitzen) zu binden, und somit die Umgestaltung der Membran, die mit dem Prozess der Proteinsortierung einhergeht, zu koordinieren. Darüber hinaus besitzen Nexine zusätzlich noch weitere Domänen, welche Interaktionen mit Proteinen und Lipiden vermitteln (Kurten, Cadena, und Gill 1996; Carlton et al. 2004; Cullen und Korswagen 2012).

Aufgrund der unterschiedlichen Funktion der beiden Endosomentypen ist es am wahrscheinlichsten, dass es sich bei den vesikulären Strukturen, in denen eine Kolokalisation von TRPL und Rhodopsin1 beobachtet werden kann, um Rab5-positive Sorting Endosomen handelt, zumal beide Proteine einzeln betrachtet jeweils mit Rab5 kolokalisieren. Ferner wurde für internalisiertes Rh1 Kolokalisation sowohl mit Rab7 (Satoh et al. 2005) als auch mit einem Lysosomenmarker (Xu et al. 2004) gezeigt, was charakteristische Stationen eines Abbauweges darstellt. Im Gegensatz dazu gelang es in dieser Arbeit, Kolokalisationen von internalisiertem TRPL mit dem Recycling-Endosomenmarker Rab11 darzustellen, jedoch keine mit einem Lysotracker, was als weiteres Indiz für ein Recycling dieses Kanals dient.

Alle bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der lichtinduzierten Internalisierung von TRPL und Rhodopsin1 dienten als Basis für das nachfolgende hypothetische Schema (Abb. 47): In dunkeladaptierten Fliegen befinden sich sowohl TRPL als auch Rhodopsin1 innerhalb der rhabdomerischen Membran, wobei TRPL möglicherweise an Arrestin2 gebunden vorliegt (Abb. 47 links). Arrestin kommt neben seiner Lokalisation im Rhabdomer auch zytosolisch vor, wo es ans Endoplasmatische Retikulum und Endosomen gebunden ist (Satoh et al. 2010).



Abbildung 47: Hypothetischer Transportmechanismus des TRPL-Kanals. In dunkeladaptierten Fliegen befinden sich TRPL und Rhodopsin1 innerhalb des Rhabdomers, wobei TRPL möglicherweise an Arr2 gebunden vorliegt. Arrestin kommt auch zytosolisch vor, wo es mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. Endosomen assoziiert ist. Bei Belichtung (rechts) wird die Bindung zwischen TRPL und Arr2 gelöst, TRPL gelangt an die Basis der Rhabdomere und Arr2 bindet an Metarhodopsin, wodurch dieses inaktiviert wird. TRPL und Rhodopsin1 werden Rab5-vermittelt internalisiert, im Fall von TRPL ist außerdem RabX4 an der Endozytose beteiligt. Im Rab5-markierten frühen Endosomen erfahren die beiden Proteine eine unterschiedliche Sortierung. Rh1 gelangt schließlich ins Lysosom, wo es abgebaut wird, während TRPL aus dem frühen Endosom ins Recycling-Endosom gelangt, wo es möglicherweise bis zum Eintritt der Dunkelheit verbleibt, bevor es zurück ins Rhabdomer gelangt.

Bei Belichtung wird die Bindung zwischen TRPL und Arrestin2 möglicherweise Ca²⁺-vermittelt gelöst, und TRPL gelangt an die Basis der Rhabdomere (Abb. 47 rechts). Sowohl rhabdomerisches, als auch zytoplasmatisches Arrestin2 bindet an Metarhodopsin, wodurch dieses inaktiviert wird. Anschließend werden TRPL und Rhodopsin1 Dynamin-vermittelt in Vesikel abgeschnürt, wobei dieser Vorgang außerdem Rab5-vermittelt abläuft. Für TRPL konnte darüber hinaus eine Beteiligung von RabX4 an der Endozytose gezeigt werden. Anschließend fusionieren TRPL- bzw. Rh1-positive Vesikel mit Rab5-markierten frühen Endosomen, wo sie nun eine unterschiedliche Sortierung erfahren. Rhodopsin1 verbleibt im frühen Endosom, das eine Reifung zum späten Rab7-positiven Endosom durchläuft. Letztendlich fusioniert dieses mit einem Lysosom, was die Degradation von Rh1 zur Folge hat. Anders verhält es sich im Fall des internalisierten TRPLs. Dieses wird aus dem frühen Endosom ins Recycling-Endosom abgeschnürt, wo es möglicherweise bis zum Eintritt der Dunkelheit verbleibt, bevor es zurück ins Rhabdomer gelangt. Allerdings konnte anhand der experimentellen Daten nicht eindeutig bestimmt werden, ob es sich bei besagten Recycling-Endosomen um das einzige Speicherkompartiment des Kanals handelt oder ob der internalisierte Kanal für die mehrstündige Zeitdauer der Helladaption anschließend noch in ein anderes subzelluläres Kompartiment gelangt.

Die Existenz verschiedener Speicherkompartimente für Membranproteine, die einem Recycling bzw. regulierter Exozytose unterliegen, wurde z.B. für den Glucostransporter GLUT4 gezeigt. Nachdem der Transporter internalisiert wurde, erfolgt anschließend eine Sortierung ins Recyclingendosom. Von dort aus gelangt internalisiertes GLUT4 in das sogenannte "Perinulear reticular GLUT4 storage compartment (PR-GSC), welches morphologische Ähnlichkeiten mit dem Trans Golgi Apparat (TGN) aufweist. Neben diesem Speicherort existiert jedoch noch ein weiterer, das "dispersed vesicular GLUT4 storage compartment (DV-GSC)", welches eine Lokalisation in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran aufweist ("aktive Zone") und somit schnelle Reaktionen auf Insulin ermöglicht. Die beiden Speicherkompartimente stehen im Gleichgewicht miteinander, wodurch jederzeit eine effiziente Membran-Insertion des Transporter, welche aus Neusynthese stammen, direkt vom TGN in das PR-GSC gelangen (Rea und James 1997; Holman und Sandoval 2001).

8 Literaturverzeichnis

- Alloway, P. G., L. Howard, and P. J. Dolph. 2000. "The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration." *Neuron* 28:129-138.
- Alloway, Paul G. and Patrick J. Dolph. 1999. "A role for the light-dependent phosphorylation of visual arrestin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:6072-6077.
- Anderson, R. G. 1982. "Mutations that affect membrane receptor for LDL are useful for studying normal receptor function." *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 243:E5-E14.
- Assaker G, Ramel D, Wculek SK, González-Gaitán, Emery G. 2010. Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration. Proceedings of the National Academy of Sciences 107:22558-22563.
- Astorga G, Härtel S, Sanhueza M, Bacigalupo J. 2012. TRP, TRPL and Cacophony Channels Mediate Ca(2+) Influx and Exocytosis in Photoreceptors Axons in *Drosophila*. PLoS ONE.Bach, G. and others. 2010. "Mucolipidosis type IV and the mucolipins." *Biochem Soc Trans*. 1432-1435.
- Bähner M, Sander P, Paulsen R, Huber A. 2000. The visual G protein of fly photoreceptors interacts with the PDZ domain assembled INAD signaling complex via direct binding of activated Gaq to phospholipase Cb. J. Biol. Chem. 275:2901-2904.
- Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, Waldhoer M, Mailliard WS, Armstrong R, Bonci A, Whistler JL. 2005. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:11521-11526.
- Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). Proceedings of the National Academy of Sciences 84:8879-8882.
- Bloomquist BT, Shortridge RD, Schneuwly S, Perdew M, Montell C, Steller H, Rubin G, Pak WL. 1988. Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction. Cell 54:723-733.

Bohdanowicz, M. and S. Grinstein. 2010. "Vesicular traffic: a Rab SANDwich." Curr. Biol. 311-400.

- Boll W, Ohno H, Songyang Z, Rapoport I, Cantley LC, Bonifacino JS, Kirchhausen T. 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. EMBO J:5789-5795.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1991. "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." *Nature* 349:117-127.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. Cell 70:715-728.
- Burd, Christopher G. 2011. "Physiology and Pathology of Endosome-to-Golgi Retrograde Sorting." *Traffic* 12:948-955.

- Burstein, E. S., W. H. Brondyk, and I. G. Macara. 1992. "Amino acid residues in the Ras-like GTPase Rab3A that specify sensitivity to factors that regulate the GTP/GDP cycling of Rab3A." *Journal of Biological Chemistry* 267:22715-22718.
- Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, Tobin AB. 2011. Differential G-protein-coupled Receptor Phosphorylation Provides Evidence for a Signaling Bar Code. Journal of Biological Chemistry 286:11506-11518.
- Byk T, Bar-Yaacov M, Doza YN, 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. 90:1907-1911.
- Campbell PT, Hnatowich M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. 1991. Mutations of the human beta 2-adrenergic receptor that impair coupling to Gs interfere with receptor down-regulation but not sequestration. Molecular Pharmacology 39:192-198.
- Cao J, Li Y, Xia W, Reddig K, Hu W, Xie W, Li HS, Han J. 2011. A *Drosophila* metallophosphoesterase mediates deglycosylation of rhodopsin. EMBO J 30:3701-3713.
- Carlton J, Bujny M, Rutherford A, Cullen P. 2004. Sorting Nexins Unifying Trends and New Perspectives. Traffic 6:75-82.
- Carlton JG, Bujny MV, Peter BJ, Oorschot VMJ, Rutherford A, Arkell RS, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ. 2005. Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. Journal of Cell Science 118:4527-4539.
- Cayouette S, Bousquet SM, Francoeur N, Dupr+® +, Monet Ml, Gagnon H, Guedri YB, Lavoie C, Boulay G. 2010. Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1803:805-812.
- Cerny, Alexander and A. Huber. 2011. "Regulation of TRP signalling by ion channel translocation between cell compartments." Pp. 545-572 in *Regulation of TRP signalling by ion channel translocation between cell compartments.*.
- Chan CC, Scoggin S, Wang D, Cherry S, Dembo T, Greenberg B, Jin E, Kuey C, Lopez A, Mehta S, Perkins T, Brankatschk M, Rothenfluh A, Buszczak M, Hiesinger P. 2011. Systematic Discovery of Rab GTPases with Synaptic Functions in *Drosophila*. Current Biology 21:1704-1715.
- Chang, H. Chang constructs and insertions. 2004.
- Chen, Xuequn, Stephen A. Ernst, and John A. Williams. 2003. "Dominant Negative Rab3D Mutants Reduce GTP-bound Endogenous Rab3D in Pancreatic Acini." *Journal of Biological Chemistry* 278:50053-50060.
- Chevesich, J., A. J. Kreuz, and C. Montell. 1997a. "Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex." *Neuron* 18:95-105.
- Chevesich, Jorge, Andrew J. Kreuz, and Craig Montell. Requirement for the PDZ Domain Protein, INAD, for Localization of the TRP Store-Operated Channel to a Signaling Complex. Neuron 18[1], 95-105. 1-1-1997b.
- Chinchore, Yashodhan, Amitavo Mitra, and Patrick J. Dolph. 2009. "Accumulation of Rhodopsin in Late Endosomes Triggers Photoreceptor Cell Degeneration." *PLoS Genet* 5:e1000377.

- Chuang, DM. and E. Costa. 1979. "Evidence for internalization of the recognition site of betaadrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76:3024-3028.
- Chyb, S., P. Raghu, and R. C. Hardie. 1999. "Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* lightsensitive channels TRP and TRPL." *Nature* 397:255-259.
- Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing S, Trowbridge IS, Tainer JA. 1990. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. In. p 1061-1072.
- Craft, C. M., D. H. Whitmore, and A. F. Wiechmann. 1994. "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." *Journal of Biological Chemistry* 269:4613-4619.
- Cronin, M. A., F. Diao, and S. Tsunoda. 2004. "Light-dependent subcellular translocation of Gqalpha in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC." *J.Cell Sci.* 117:4797-4806.
- Cronin, M. A., M. H. Lieu, and S. Tsunoda. 2006. "Two stages of light-dependent TRPL-channel translocation in *Drosophila* photoreceptors." *J.Cell Sci.* 119:2935-2944.
- Cullen, Peter J. 2008. "Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:574-582.
- Cullen, Peter J. and Hendrik C. Korswagen. 2012. "Sorting nexins provide diversity for retromerdependent trafficking events." *Nat Cell Biol* 14:29-37.
- De Camilli, Pietro, Kohji Takei, and Peter S. McPherson. 1995. "The function of dynamin in endocytosis." *Current Opinion in Neurobiology* 5:559-565.
- de Groot T, Verkaart S, Xi Q, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. 2010. The Identification of Histidine 712 as a Critical Residue for Constitutive TRPV5 Internalization. Journal of Biological Chemistry 285:28481-28487.
- Danscher, G. "Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue."
- Di Palma F, Belyantseva IA, Kim HJ, Vogt TF, Kachar B, Noben-Trauth K. 2002. Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:14994-14999.
- Dikic, I. 2003. "Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation." *Biochem Soc Trans*. 1178-1181.
- Dolph PJ, Ranganathan R, Colley NJ, Hardy RW, Socolich M, Zuker CS. 1993. Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. Science 260:1910-1916.
- Dolph PJ, Ranganathan R, Colley NJ, Hardy RW, Socolich M, Zuker CS. 1993. Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. Science 260:1910-1916.
- Dong XP, Cheng X, Mills E, Delling M, Wang F, Kurz T, Xu H. 2008. The type IV mucolipidosisassociated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. Nature 455:992-996.

- Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismer D, Rubin GM, Smith DP, Socolich M, Zuker CS. 1992. Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. The Journal of Neuroscience 12:3862-3868.
- Ferguson, S. S. G. 2001. "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol.Rev.* 53:1-24.
- Ferguson SSG, Zhang J, Barak LS, Caron MG. 1998. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. Life Sci. 62:1561-1565.
- Flores, Emma N. and García-Añoveros Jaime. 2011. "TRPML2 and the Evolution of Mucolipins Transient Receptor Potential Channels." Pp. 221-228 edited by M. Islam. Springer Netherlands.
- Franceschini, N. and K. Kirschfeld. 1971. "[Pseudopupil phenomena in the compound eye of *drosophila*]." *Kybernetik.* 9:159-182.
- Frechter S, Elia N, Tzarfaty V, Selinger Z, Minke B. 2007. Translocation of Gqα Mediates Long-Term Adaptation in *Drosophila* Photoreceptors. The Journal of Neuroscience 27:5571-5583.
- Frechter, Shahar and Baruch Minke. 2006. "Light-regulated translocation of signaling proteins in Drosophila photoreceptors." Journal of Physiology-Paris 99:133-139.
- Freedman NJ and R. J. Lefkowitz. 1996. "Desensitization of G protein-coupled receptors." *Recent Prog Horm Res*. 319-351.
- Fujiki, Y. 1992. "Biogenesis of peroxisome--targeting signal and peroxisome assembly factor." *No To Hattatsu*181-185.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, Schneider WJ. 1985. Receptor-Mediated Endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System. Annu. Rev. Cell. Biol. 1:1-39.
- Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. 1996. [beta]-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the [beta]2-adrenergic receptor. Nature 383:447-450.
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. In. p 915-925.
- Grant, BD and J. G. Donaldson. 2009. "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:597-608.
- Greka, Anna and Peter Mundel. 2011. "Balancing Calcium Signals through TRPC5 and TRPC6 in Podocytes." *Journal of the American Society of Nephrology* 22:1969-1980.
- Grieder, N. P{UASp-gammaCop.EGFP} construct and insertions from Nicole Grieder. 2010.
- Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT. 1973. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. Molecular and General Genetics MGG 120:107-114.
- Han, J., K. Reddig, and H. S. Li. 2007. "Prolonged G(q) activity triggers fly rhodopsin endocytosis and degradation, and reduces photoreceptor sensitivity." *EMBO J.* 26:4966-4973.

- Han J, Gong P, Reddig K, Mitra M, Guo P, Li HS. 2006. The Fly CAMTA Transcription Factor Potentiates Deactivation of Rhodopsin, a G Protein-Coupled Light Receptor. In. p 847-858.
- Hardie, R. C. 1985. "Functional organization of the fly retina." Pp. 1-81 in *Progress in sensory physiology 5*, edited by H. Autrum, D. Ottoson, E. R. Perl, R. F. Schmidt, H. Shimazu, and W. D. Willis. New York: Springer-Verlag.
- Hardie, R. C. and P. Raghu. 2001. "Visual transduction in Drosophila." Nature 413:186-193.
- Hardie, Roger C., Akiko K. Satoh, and Che Hsiung Liu. 2012. "Regulation of Arrestin Translocation by Ca2+ and Myosin III in *Drosophila* Photoreceptors." *The Journal of Neuroscience* 32:9205-9216.
- Harris, B. Z. and W. A. Lim. 2001. "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J.Cell Sci.* 114:3219-3231.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1989. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. Journal of Biological Chemistry 264:12657-12665.
- He SQ, Zhang ZN, Guan JS, Liu HR, Zhao B, Wang HB, Li Q, Yang H, Luo J, Li ZY, Wang Q, Lu YJ, Bao L, Zhang X. 2011. Facilitation of Opioid Receptor Activity by Preventing delta-Opioid Receptor-Mediated Codegradation. Neuron 69:120-131.
- Hermann, R. 1996. "Charakterisierung und Quantifizierung von Membranproteinen der Sehkaskade in der rhabdomerischen Photorezeptormembran.".
- Hicks, J. L. and D. S. Williams. 1992. "Distribution of the myosin I-like ninaC proteins in the *Drosophila* retina and ultrastructural analysis of mutant phenotypes." *Journal of Cell Science* 101:247-254.
- Hoffman GR, Rahl PB, Collins RN, Cerione RA. 2003. Conserved Structural Motifs in Intracellular Trafficking Pathways: Structure of the γCOP Appendage Domain. In. p 615-625.
- Holman, Geoffrey D. and Ignacio V. Sandoval. 2001. "Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage." *Trends in cell biology* 11:173-179.
- Hopkins, C. R. and I. S. Trowbridge. 1983. "Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells." *The Journal of Cell Biology* 97:508-521.
- Hsu, C. D., S. M. Adams, and J. E. O'Tousa. 2002. "Rpr- and hid-driven cell death in *Drosophila* photoreceptors." *Vision research* 42:507-516.
- Huang J, Liu C-S, Hughes SA, Postma M, Schwiening CJ, Hardie RC. 2010. Activation of TRP Channels by Protons and Phosphoinositide Depletion in *Drosophila* Photoreceptors. Curr. Biol. 20:189-197.
- Huber A, Sander P, Bahner M, Paulsen R. 1998. The TRP Ca²⁺ channel assembled in a signaling complex by the PDZ domain protein INAD is phosphorylated through the interaction with protein kinase C (ePKC). FEBS Lett. 425:317-322.

Irvine, K. P{UAS-GFP.KDEL} construct and insertions. 2007.

- Joelle HC, Torvinen M, a, a, Casado³ V, nt, Scott R, y, Terasmaa A, on, Hansson A, a, Watson S, ley, Olah M, E., Mallol J, Canela E, I., Zoli M, Agnati LF, Ibanez C, s F., Lluis C, me, Franco, fael, Ferr. 2002. Coaggregation, Cointernalization, and Codesensitization of Adenosine A2A Receptors and Dopamine D2Receptors. Journal of Biological Chemistry 277:18091-18097.
- Johannes, Ludger and Vincent Popoff. Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking. Cell 135[7], 1175-1187. 26-12-2008.
- Jones S, Litt RJ, Richardson CJ, Segev N. 1995. Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport. The Journal of Cell Biology 130:1051-1061.
- Jörs S, Kazanski V, Foik A, Krautwurst D, Harteneck C. 2006. Receptor-induced Activation of *Drosophila* TRPγ by Polyunsaturated Fatty Acids. Journal of Biological Chemistry 281:29693-29702.
- Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol Histopathol. 25(1):99-112.
- Karacsonyi, Claudia, Anitza San Miguel, and Rosa Puertollano. 2007. "Mucolipin-2 Localizes to the Arf6-Associated Pathway and Regulates Recycling of GPI-APs." *Traffic* 8:1404-1414.
- Kessler A, Tomas E, Immler D, Meyer HE, Zorzano A, Eckel J. 2000. Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. Diabetologia 43:1518-1527.
- Kim HJ, Soyombo AA, Tjon-Kon-Sang S, So I, Muallem S. 2009. The Ca²⁺ Channel TRPML3 Regulates Membrane Trafficking and Autophagy. Traffic 10:1157-1167.
- Kiselev A, Socolich M, Vinos J, Hardy RW, Zuker CS, Ranganathan R. 2000. A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. Neuron 28:139-152.
- Kiselev, A. and S. Subramaniam. 1994. "Activation and regeneration of rhodopsin in the insect visual cycle [published errata appear in Science 1995 Jan 13;267(5195):160 and 1995 Mar 17;267(5204):1581]." *Science* 266:1369-1373.
- Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, Timberg R, Zars TD, Hyde DR, Minke B, Selinger Z. 2003. Regulation of light-dependent Gq alpha translocation and morphological changes in fly photoreceptors. Embo Journal 22:459-468.
- Kristaponyte I, Hong Y, Lu H, Shieh BH. 2012. Role of Rhodopsin and Arrestin Phosphorylation in Retinal Degeneration of *Drosophila*. The Journal of Neuroscience 32:10758-10766.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. 1997. The Role of Sequestration in G Proteincoupled Receptor Resensitization. Journal of Biological Chemistry 272:5-8.
- Krupnick, Jason G., Vsevolod V. Gurevich, and Jeffrey L. Benovic. 1997. "Mechanism of Quenching of Phototransduction." *Journal of Biological Chemistry* 272:18125-18131.
- Kurten, Richard C., Deborah L. Cadena, and Gordon N. Gill. 1996. "Enhanced Degradation of EGF Receptors by a Sorting Nexin, SNX1." *Science* 272:1008-1010.
- Lee, S. J. and C. Montell. 2004a. "Suppression of constant-light-induced blindness but not retinal degeneration by inhibition of the rhodopsin degradation pathway." *Curr.Biol.* 14:2076-2085.

- Lee SJ, Xu H, Kang LW, Amzel LM, Montell C. 2003. Light Adaptation through Phosphoinositide-Regulated Translocation of *Drosophila* Visual Arrestin. Neuron 39:121-132.
- Lee, Seung Jae and Craig Montell. Light-Dependent Translocation of Visual Arrestin Regulated by the NINAC Myosin III. Neuron 43[1], 95-103. 8-7-2004b.
- Lee, Seung Jae, Hong Xu, and Craig Montell. 2004. "Rhodopsin kinase activity modulates the amplitude of the visual response in *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11874-11879.
- Lee YJ, Shah S, Suzuki E, Zars T, O'Day PM, Hyde DR. 1994. The *Drosophila* dgq gene encodes a G alpha protein that mediates phototransduction. Neuron 13:1143-1157.
- Lefkowitz, Robert J., Keshava Rajagopal, and Erin J. Whalen. New Roles for βArrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. Molecular cell 24[5], 643-652. 8-12-2006.
- Lelouvier B, Tamagno G, Kaindl AM, Roland A, Lelievre V, Le Verche V, Loudes C, Gressens P, Faivre-Baumann A, Lenkei Z, Dournaud P. 2008. Dynamics of Somatostatin Type 2A Receptor Cargoes in Living Hippocampal Neurons. The Journal of Neuroscience 28:4336-4349.
- Li, G. 1996. "Rab5 GTPase and endocytosis." Biocell. 3:325-330.
- Lieu MH, Vallejos MJ, Michael E, Tsunoda S. 2012. Mechanisms Underlying Stage-1 TRPL Channel Translocation in *Drosophila* Photoreceptors. PLoS ONE 7:e31622.
- Liu M, Parker LL, Wadzinski BE, Shieh BH. 2000. Reversible phosphorylation of the signal transduction complex in *Drosophila* photoreceptors. J. Biol. Chem. 275:12194-12199.
- Liu CH, Satoh AK, Postma M, Huang J, Ready DF, Hardie RC. 2008. Ca²⁺-Dependent Metarhodopsin Inactivation Mediated by Calmodulin and NINAC Myosin III. In. p 778-789.
- Liu W, Wen W, Wei Z, Yu J, Ye F, Liu CH, Hardie R, Zhang M. 2011. The INAD Scaffold Is a Dynamic, Redox-Regulated Modulator of Signaling in the *Drosophila* Eye. In. p 1088-1101.
- Lok, CN. and T. T. Loh. 1998. "Regulation of transferrin function and expression: review and update." *Biol Signals Recept*.157-178.
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR. 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. EMBO J:677-682.
- MacPherson MR, Pollock VP, Kean L, Southall TD, Giannakou ME, Broderick KE, Dow JAT, Hardie RC, Davies SA. 2005. Transient Receptor Potential-Like Channels Are Essential for Calcium Signaling and Fluid Transport in a *Drosophila* Epithelium. Genetics 169:1541-1552.
- Marks MS, Ohno H, Kirchnausen T, Bonracino JS. 1997. Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. In. p 124-128.
- Matsui, T. and M. Fukuda. 2011. "Small GTPase Rab12 regulates transferrin receptor degradation: Implications for a novel membrane trafficking pathway from recycling endosomes to lysosomes." *Cell Logist.* 4:155-158.
- Matsumoto H, Kurien BT, Takagi Y, Kahn ES, Kinumi T, Komori N, Yamada T, Hayashi F, Isono K, Pak WL, Jackson KW, Tobin SL. 1994. Phosrestin I undergoes the earliest light-induced phosphorylation by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *drosophila* photoreceptors. In. p 997-1010.

- Mecklenburg K, Takemori N, Komori N, Chu B, Hardie RC, Matsumoto H, O'Tousa JE. 2010. Retinophilin is a light-regulated phosphoprotein required to suppress photoreceptor dark noise in *Drosophila*. J. Neurosci.:1238-1249.
- Meyer NE, Joel-Almagor T, Frechter S, Minke B, Huber A. 2006. Subcellular translocation of the eGFP-tagged TRPL channel in *Drosophila* photoreceptors requires activation of the phototransduction cascade. J. Cell Sci. 119:2592-2603.
- Meyer NE, Oberegelsbacher C, Dürr TD, Schäfer A, Huber A. 2008. An eGFP-based genetic screen for defects in light-triggered subcelluar translocation of the *Drosophila* photoreceptor channel TRPL. Fly 2:384-394.
- Milano SK, Pace HC, Kim YM, Brenner C, Benovic JL. 2002. Scaffolding Functions of Arrestin-2 Revealed by Crystal Structure and Mutagenesis. Biochemistry 41:3321-3328.
- Miller, William E. and Robert J. Lefkowitz. 2001. "Expanding roles for β-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking." *Current Opinion in Cell Biology* 13:139-145.
- Minke, B. 1986. "Photopigment-dependent adaptation in invertebrates implications for vertebrates." edited by H. Stieve. Berlin: Springer-Verlag.
- Minke, B. and B. Cook. 2002. "TRP channel proteins and signal transduction." *Physiological Reviews* 82:429-472.
- Minke, B. and M. Parnas. 2006. "Insights on TRP channels from in vivo studies in *Drosophila*." *Annu.Rev.Physiol.* 68:649-684.
- Minke, B., C. Wu, and W. L. Pak. 1975. "Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant." *Nature* 258:84-87.
- Montell, C. and G. M. Rubin. 1988. "The *Drosophila* ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head." *Cell* 52:757-772.
- Montell, Craig. 2012. "Drosophila visual transduction." Trends in Neurosciences 35:356-363.
- Moore RH, Sadovnikoff N, Hoffenberg S, Liu S, Woodford P, Angelides K, Trial JA, Carsrud ND, Dickey BF, Knoll BJ. 1995. Ligand-stimulated beta 2-adrenergic receptor internalization via the constitutive endocytic pathway into rab5-containing endosomes. Journal of Cell Science 108:2983-2991.
- Morrison, Deborah K. and Roger J. Davis. 2003. "REGULATION OF MAP KINASE SIGNALING MODULES BY SCAFFOLD PROTEINS IN MAMMALS*." Annual Review of Cell and Developmental Biology 19:91-118.
- Moser E, Kargl J, Whistler JL, Waldhoer M, Tschische P. 2010. G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. Pharmacology 86:22-29.
- Nilius, Bernd and Grzegorz Owsianik. 2011. "The transient receptor potential family of ion channels." *Genome Biology* 12:218.
- Oberegelsbacher, C. 2008. "Biochemische und immunocytochemische Charakterisierung von *Drosophila melanogaster* Mutanten mit Wanderungsdefekt im Ionenkanal TRPL." Universität Hohenheim.

- Oberegelsbacher C, Schneidler C, Voolstra O, Cerny A, Huber A. 2011. The Drosophila TRPL ion channel shares a Rab-dependent translocation pathway with rhodopsin. European Journal of Cell Biology 90:620-630.
- Oppermann, Martin. 2004. "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation." *Cellular Signalling* 16:1201-1210.
- Orem, Nicholas R. and Patrick J. Dolph. 2002. "Loss of the phospholipase C gene product induces massive endocytosis of rhodopsin and arrestin in *Drosophila* photoreceptors." *Vision research* 42:497-505.
- Orem, Nicholas R., Luxi Xia, and Patrick J. Dolph. 2006. "An essential role for endocytosis of rhodopsin through interaction of visual arrestin with the AP-2 adaptor." *Journal of Cell Science* 119:3141-3148.
- Parent A, Hamelin E, Germain P, Parent JL. 2009. Rab11 regulates the recycling of the beta2adrenergic receptor through a direct interaction. Biochem J 418:163-172.
- Paulsen R, Bähner M, Bentrop J, Schillo M, Schulz S, Huber A. 2001. The molecular design of a visual cascade: Assembly of the *Drosophila* phototransduction pathway into a supramolecular signaling complex. In: Musio C, editor. Vision: The approach of biophysics and neurosciences. Singapure, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific. p 60-73.
- Pelham, H. R. 1990. "The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum." *Trends Biochem.Sci.*485-486.
- Pfister C, Chabre M, Plouet J, Tuyen VV, De Kozak Y, Faure JP, Kuhn H. 1985. Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. Science 228:891-893.
- Phillips, A. M., A. Bull, and L. E. Kelly. 1992. "Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene." *Neuron* 8:631-642.
- Pinal, Noelia and Franck Pichaud. 2011. "Dynamin- and Rab5-dependent endocytosis is required to prevent *Drosophila* photoreceptor degeneration." *Journal of Cell Science* 124:1564-1570.
- Piper, Robert C. and David J. Katzmann. 2007. "Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies." Annual Review of Cell and Developmental Biology 23:519-547.
- Pitcher J, Inglese J, Higgins J, Arriza J, Casey P, Kim C, Benovic JL, Kwatra M, Caron M, Lefkowitz RJ. 1992. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. Science 257:1264-1270.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1998. G PROTEIN–COUPLED RECEPTOR KINASES. Annu. Rev. Biochem. 67:653-692.
- Popescu, D. C., A. J. Ham, and B. H. Shieh. 2006. "Scaffolding protein INAD regulates deactivation of vision by promoting phosphorylation of transient receptor potential by eye protein kinase C in *Drosophila*." *J.Neurosci.* 26:8570-8577.
- Porter, J. A. and C. Montell. 1993. "Distinct roles of the *Drosophila* ninaC kinase and myosin domains revealed by systematic mutagenesis." *J.Cell Biol.* 122:601-612.

Powers, S., K. O'Neill, and M. Wigler. 1989. "Dominant yeast and mammalian RAS mutants that interfere with the CDC25-dependent activation of wild-type RAS in Saccharomyces cerevisiae." *Molecular and Cellular Biology* 9:390-395.

Ratnakumar, K. and C. Desplan. P{rh1-GAL4} and P{Rh4-GAL4} insertions. 2004.

- Raghu P, Usher K, Jonas S, Chyb S, Polyanovsky A, Hardie RC. 2000. Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the Drosophila diacylglycerol kinase mutant, rdgA. Neuron 2000. Apr. ;26. (1.):169. -79. 26:169-179.
- Rea, Shane and David E. James. 1997. "Moving GLUT4: The Biogenesis and Trafficking of GLUT4 Storage Vesicles." *Diabetes* 46:1667-1677.
- Richter, D. 2007. "Struktur-Funktionsanalysen von TRP-Ionenkanälen in den Photorezeptorzellen von Drosophila melanogaster." Universität Karlsruhe.
- Rikhy, R. and J. Lippincott-Schwartz. Golgi and ER marker insertions. 2010.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. 2005. Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. Cell 122:735-749.
- Robinson, M. S. 1989. "Cloning of cDNAs encoding two related 100-kD coated vesicle proteins (alpha-adaptins)." *The Journal of Cell Biology* 108:833-842.
- Rosenzweig, Mark, KyeongJin Kang, and Paul A. Garrity. 2008. "Distinct TRP channels are required for warm and cool avoidance in *Drosophila* melanogaster." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:14668-14673.
- Roth, J. and E. G. Berger. 1982. "Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae." *The Journal of Cell Biology* 93:223-229.
- Satoh AK, O'Tousa JE, Ozaki K, Ready DF. 2005. Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of Drosophila photoreceptors. Development. 132:1487-1497.
- Satoh, Akiko K. and Donald F. Ready. 2005. "Arrestin1 Mediates Light-Dependent Rhodopsin Endocytosis and Cell Survival." *Current Biology* 15:1722-1733.
- Satoh AK, Xia H, Yan L, Liu CH, Hardie RC, Ready DF. 2010. Arrestin Translocation Is Stoichiometric to Rhodopsin Isomerization and Accelerated by Phototransduction in Drosophila Photoreceptors. Neuron 67:997-1008.
- Schwemer, J. 1984. "Renewal of visual pigment in photoreceptors of the blowfly." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 154:535-547.
- Scott K, Becker A, Sun Y, Hardy R, Zuker C. 1995. Gq alpha protein function in vivo: genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. Neuron 15:919-927.
- Scott, K. and C. Zuker. 1997. "Lights out: deactivation of the phototransduction cascade." *Trends.Biochem.Sci.* 22:350-354.
- Seachrist, Jennifer L. and S. S. G. Ferguson. 2003. "Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases." *Life Sciences* 74:225-235.

- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon. 1999. "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." *Trends Biochem.Sci.* 24:311-316.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. 2001. Regulation of Receptor Fate by Ubiquitination of Activated β2-Adrenergic Receptor and β-Arrestin. Science 294:1307-1313.
- Shetty, Kiran M., Phani Kurada, and Joseph E. OTousa. 1998. "Rab6 Regulation of Rhodopsin Transport in *Drosophila*." *Journal of Biological Chemistry* 273:20425-20430.
- Shieh, B. H. and B. Niemeyer. 1995. "A novel protein encoded by the InaD gene regulates recovery of visual transduction in *Drosophila*." *Neuron* 14:201-210.
- Shieh, B. H. and M. Y. Zhu. 1996. "Regulation of the TRP Ca²⁺ channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors." *Neuron* 16:991-998.
- Shimizu, Hideyuki, Satoru Kawamura, and Koichi Ozaki. 2003. "An essential role of Rab5 in uniformity of synaptic vesicle size." *Journal of Cell Science* 116:3583-3590.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness. 2000. "Rab GTPases coordinate endocytosis." *Journal of Cell Science* 113:183-192.
- Spang, Anne. On the fate of early endosomes. Biological Chemistry. bchm 390, 753. 2009. 13-9-2012.
- Spencer, Susan, Carrie Brachmann, and Ross Cagan. 2001. "Drosophila Retinal Patterning." in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Steele, F. and J. E. O'Tousa. 1990. "Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila* rdgC mutant." *Neuron* 4:883-890.
- Tian Y, Hu W, Tong H, Han J. 2012. Phototransduction in *Drosophila*. SCIENCE CHINA Life Sciences 55:27-34.
- Titorenko, Vladimir I. and Richard A. Rachubinski. 2001. "The life cycle of the peroxisome." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:357-368.
- Trejo, JoAnn. 2005. "Internal PDZ Ligands: Novel Endocytic Recycling Motifs for G Protein-Coupled Receptors." *Molecular Pharmacology* 67:1388-1390.
- Trischler, M., W. Stoorvogel, and O. Ullrich. 1999. "Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway." *Journal of Cell Science* 112:4773-4783.
- Trump, BF and I. K. Berezesky. 1996. "The role of altered [Ca²⁺]i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis." *Biochim.Biophys.Acta* 1313:173-178.
- Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Kurose H, Nagao T. 1994. Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. Journal of Biological Chemistry 269:32522-32527.
- Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS. 1997. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G- protein-coupled cascade. Nature 388:243-249.

- Ullrich O, Reinsch S, Urb+® S, Zerial M, Parton RG. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. The Journal of Cell Biology 135:913-924.
- van de Graaf SF, Chang Q, Mensenkamp AR, Hoenderop JG, Bindels RJ. 2006. Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca2+ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. Mol. Cell Biol. 26:303-312.
- van der Bliek, Alexander M. and Elliot M. Meyerowitz. 1991. "Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic." *Nature* 351:411-414.
- Verkman, A. S. and Alok K. Mitra. 2000. "Structure and function of aquaporin water channels." American Journal of Physiology - Renal Physiology 278:F13-F28.
- Vieira, Amandio V., Christophe Lamaze, and Sandra L. Schmid. 1996. "Control of EGF Receptor Signaling by Clathrin-Mediated Endocytosis." *Science* 274:2086-2089.
- Vinos J, Jalink K, Hardy RW, Britt SG, Zuker CS. 1997. A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. Science 277:687-690.
- Vollenweider P, Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Nelson JG, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Rose DW, Olefsky JM. 1997. The Small Guanosine Triphosphate-Binding Protein Rab4 Is Involved in Insulin-Induced GLUT4 Translocation and Actin Filament Rearrangement in 3T3-L1 Cells. Endocrinology 138:4941-4949.
- von Mollard GF, Stahl B, Li C, Südhof TC, Jahn R. 1994. Rab proteins in regulated exocytosis. Trends in Biochemical Sciences 19:164-168.
- Wang J, Kean L, Yang J, Allan A, Davies S, Herzyk P, Dow J. 2004. Function-informed transcriptome analysis of Drosophila renal tubule. Genome Biology 5:R69.
- Wang, T. and C. Montell. 2007. "Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*." *Pflugers Arch.* 454:821-847.
- Warren RA, Green FA, Stenberg PE, Enns CA. 1998. Distinct Saturable Pathways for the Endocytosis of Different Tyrosine Motifs. Journal of Biological Chemistry 273:17056-17063.
- Wegierski T, Hill K, Schaefer M, Walz G. 2006. The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. EMBO J 25:5659-5669.
- Wiesmuller, L. and F. Wittinghofer. 1994. "Signal transduction pathways involving Ras. Mini review." *Cell Signal*.247-267.
- Wojcikiewicz, Richard J. H. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. Trends in Pharmacological Sciences 25[1], 35-41. 1-1-2004.
- Woodman, Philip G. 2000. "Biogenesis of the Sorting Endosome: The Role of Rab5." *Traffic* 1:695-701.
- Xiang, Yi and Yanzhuang Wang. 2010. "GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking." *The Journal of Cell Biology* 188:237-251.
- Xu H, Lee SJ, Suzuki E, Dugan KD, Stoddard A, Li HS, Chodosh LA, Montell C. 2004. A lysosomal tetraspanin associated with retinal degeneration identified via a genome-wide screen. EMBO J 23:811-822.

- Yang JW, Vacher H, Park KS, Clark E, Trimmer JS. 2007. Trafficking-dependent phosphorylation of Kv1.2 regulates voltage-gated potassium channel cell surface expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:20055-20060.
- Yoo D, Fang L, Mason A, Kim BY, Welling PA. 2005. A Phosphorylation-dependent Export Structure in ROMK (Kir 1.1) Channel Overrides an Endoplasmic Reticulum Localization Signal. Journal of Biological Chemistry 280:35281-35289.
- Zastrow, Mark von. 2003. "Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway." *Life Sciences* 74:217-224.
- Zerial, Marino and Heidi McBride. 2001. "Rab proteins as membrane organizers." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.
- Zhang J, Schulze KL, Hiesinger PR, Suyama K, Wang S, Fish M, Acar M, Hoskins RA, Bellen HJ, Scott MP. 2007. Thirty-one flavors of Drosophila rab proteins. Genetics. 176:1307-1322.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SSG. 1997. A Central Role for β-Arrestins and Clathrin-coated Vesicle-mediated Endocytosis in β2-Adrenergic Receptor Resensitization. Journal of Biological Chemistry 272:27005-27014.
- Zhao X, Huang J, Khani SC, Palczewski K. 1998. Molecular Forms of Human Rhodopsin Kinase (GRK1). Journal of Biological Chemistry 273:5124-5131.
- Zuker, C. S. 1996. "The biology of vision of Drosophila." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:571-576.
- Zuker CS, Montell C, Jones K, Laverty T, Rubin GM. 1987. A rhodopsin gene expressed in photoreceptor cell R7 of the Drosophila eye: homologies with other signal-transducing molecules. J. Neurosci. 7:1550-1557.

9 Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AP-1	Adapterprotein1
AP-2	Adapterprotein2
Arr1	Arrestin1
Arr2	Arrestin2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-
	dihydrochlorid
Dm	Drosophila melanogaster
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E3	Ubiquitin-Proteinligase
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ePKC	augenspezifische ProteinkinaseC
EtOH	Ethanol
ERG	Elektroretinogramm
F ₁ -Generation	Erste Filialgeneration
Fa.	Firma
F-Actin	filamentöses Actin
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
G-Protein	Guanosinnukleitid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gq	visuelles G-Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase

GTP	Guanosintriphosphat
IC	Immuncytochemie
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IgG	Immunglobulin G
InaC	inactivation no afterpotantial C
InaD	inactivation no afterpotential D
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Μ	aktives Metarhodopsin
mRNA	messenger ribonucleinacid
MVB	Multi vesicular body
PUFS	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
NaCl	Natriumchlorid
ninaC	neither inactivation nor afterpotential C
ninaE	neither inactivation nor afterpotential E
NorpA	no receptor potential A
Р	inaktives Rhodopsin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PFA	Paraformaldehyd
РКС	Proteinkinase C
ΡLCβ	Phospholipase Cβ
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R1 – R6	Photorezeptorzellen 1 bis 6 des Drosophila Komplexauges
R1 – R8	Photorezeptorzellen 1 bis 8 des Drosophila Komplexauges
R7	Photorezeptorzelle 7 des Drosophila Komplexauges
R8	Photorezeptorzelle 8 des Drosophila Komplexauges
Rab	Ras-related in brain
Rh1	Rhodopsin1
RLV	Rh1-containing large vesicles
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Shi	Shibire
SNARE	soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor
	accessory-protein receptor

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween
TfR	Transferrinrezeptor
TRITC	Tetramethylrhodamin
TRP	transient receptor potential
TRPC	klassische TRPs
TRPL	transient receptor potential-like
TRPL-eGFP	TRPL fusioniert an eGFP
TRPM	TRP-ähnliche Proteine, benannt nach Melastatin
TRPML	TRP-ähnliche Proteine, benannt nachMucolipidin
TRPN	TRP-ähnliche Proteine, benannt nach NOMPC-Kanälen
TRPP	TRP-ähnliche Proteine, benannt nach PKD2
TRPV	TRP-ähnliche Proteine, benannt nach VR1
ΤRΡγ	transient receptor potential γ
Tyr	Tyrosin
VR1	Vanilloid Rezeptor 1
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Armin Huber für die Vergabe des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Anette Preiss für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Fachgebiets Biosensorik und des Life Science Centers für ein überaus angenehmes und hilfsbereites Arbeitsklima.

Speziell meinen Kollegen Dr. Olaf Voolstra, Dr. Jens Pfannstiel, Dr. Alexander Cerny, Dr. Tina Oberacker, Oliver Simon, Jonas Bartels, Beate Hillers und Stefan Kaltenbach für eine freundschaftliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre, welche zugleich die Basis für allerhand Aktivitäten außerhalb des Labors bildete...

Herrn Prof. Dr. Uwe Wolfrum an dessen Institut ich die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. Baruch Minke für die Bereitstellung der Gqa-Mutante.

Frank Schertzinger für Tipps und Tricks im Laboralltag

Berit Würtz für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Familie für ihre großartige Unterstützung.

Johannes

11 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit "Charakterisierung der lichtinduzierten Internalisierung des Ionenkanals TRPL aus *Drosophila melanogaster*" von mir selbstständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stuttgart-Hohenheim, den 11. Oktober 2012

Claudia Obergelsbacher