

Biochemische und biophysikalische Analyse der strukturellen Integrität von Channelrhodopsin 2 und dessen Mutanten



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von:

Sybille Ullrich

aus Gamburg

Würzburg 2013

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Nagel

2. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Koepsell

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	1
1.2 Rhodopsine.....	2
1.3 Bakteriorhodopsin.....	5
1.4 Channelrhodopsin 2	7
1.4.1 Grundlagen	7
1.4.2 ChR2-Mutanten	9
1.4.2.1 H134R.....	9
1.4.2.2 C128 / D156	10
1.4.2.3 ChETA	11
1.4.2.4 T159C	11
1.4.2.5 CatCh.....	12
1.4.3 Struktur	13
1.4.4 Photozyklus.....	14
1.5 Retinoide	16
1.6 Stabilität von Rhodopsinen / ERAD-System	18
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Kultur von Bakterien	22
2.2 Plasmidisolierung	22
2.3 Gelelektrophorese.....	23
2.4 Gezielte <i>in-vitro</i> Mutagenese	24
2.5 Gewinnung von cRNA durch <i>in-vitro</i> Transkription (IVT).....	25
2.5.1 Linearisierung des Vektors	26
2.5.2 Gewinnung der Matrix durch PCR	27
2.6 Injektion von cRNA	28
2.7 Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	29
2.8 Operative Entnahme der Oozyten	30
2.9 Präparation von Plasmamembran aus Oozyten	30

Inhaltsverzeichnis

2.10 SDS-PAGE.....	31
2.11 Blotting und Antikörperinkubation	33
2.12 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)	34
2.13 Elektrophysiologie	36
2.13.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC)	36
2.13.2 Elektroden	37
2.13.3 Konventionen	38
2.13.4 Versuchsaufbau der Oozytenmessungen.....	38
2.13.5 Messung der Ströme	40
2.13.5.1 Lichtaktivierte Ströme.....	40
2.13.5.2 Lichtunabhängige Ströme	40
2.13.6 Berechnung des Leitwertes G.....	41
2.14 Lösungen	42
2.14.1 Bakterienkultur	42
2.14.2 Plasmidisolaton	42
2.14.3 Gelelektrophorese	43
2.14.4 Lösungen für Oozyten.....	45
2.14.5 Proteinbiochemie.....	45
2.14.6 Lösungen für die Elektrophysiologie.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Auswahl und Mutation von Aminosäuren	49
3.2 Retinalabhängige Expression von Channelrhodopsin-2 Wildtyp (ChR2-WT::YFP) und dessen Mutanten	50
3.2.1 ChR2-WT::YFP	51
3.2.2. ChR2-Volllänge.....	53
3.2.2 Retinalunabhängige Expression von ChR2-Mutanten.....	54
3.2.2.1 ChR2-T159Y::YFP	54
3.2.2.2 ChR2-T159W::YFP	57
3.2.2.3 ChR2-T159F::YFP	60
3.2.2.4 ChR2-T159C::YFP.....	63
3.2.2.5 ChR2-K257R::YFP	65

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.6 ChR2-K257R/T159Y::YFP	65
3.2.3 Protein-Immunoblotting.....	66
3.3 Putative Ubiquitinierungsstellen.....	68
3.3.1 Einzelmutanten.....	69
3.3.2 Mehrfachmutanten	70
3.3.3. Verkürztes ChR2 (ChR2-282)	72
3.4 pH-abhängige Guanidinium-dunkelleitfähigkeit	73
3.4.1 ChR2-T159Y.....	74
3.4.1.1 Einfluss des pH-Wertes	74
3.4.1.2 Einfluss der Guanidiniumkonzentration	76
3.4.1.3 Inhibition der Ströme.....	78
3.4.1.4 Retinalunabhängiger Guanidinium-Dunkelstrom.....	80
3.4.2 ChR2-T159W	82
3.4.3. Die Ausnahme: ChR2-T159F	84
3.4.4. ChR-T159Y / K257R	86
3.5 pH-Sensoren	88
3.5.1 H114 / R115	90
3.5.2 R120	91
2.5.3 H249.....	92
4. Diskussion	94
4.1 Retinalabhängige Stabilität	94
4.1.1 ChR2-WT	94
4.1.2 ChR2-Volllänge.....	97
4.1.3 T159C	98
4.2 Retinalunabhängige Stabilität von ChR2-Mutanten	98
4.3 Retinalbindeaffinität	100
4.4 Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation.....	102
4.5 Proteinimmunoblot.....	103
4.6 Proteindegradation durch das ERAD-System.....	104
4.7 Guanidinium-Dunkelleitfähigkeit	106
4.7.1 Überprüfung der Hypothesen	109

Inhaltsverzeichnis

4.7.1.1 Putative pH-Sensoren	109
4.7.1.2 Deprotonierung der Schiff' Base	110
4.7.2 T159Y/F/W und der Einfluss von Retinal.....	112
5. Zusammenfassung	114
5.1 Retinalabhängigkeit.....	114
5.2 Guanidiniumleitfähigkeit.....	116
6. Summary	118
6.1 Retinaldependence	118
6.2 Guanidine conductance	120
Referenzen	I
Abbildungsverzeichnis	XVII
Tabellenverzeichnis.....	XXI
Abkürzungsverzeichnis	XXII
Nukleotidsequenzen	XXV
Primersequenzen	XXVII
Vektorkarten	XXVIII
Lebenslauf.....	XXIX
Danksagung.....	XXXI

1. Einleitung

1.1 *Chlamydomonas Reinhardtii*

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein Hüllenflagellat mit 2 Geißeln, die der Fortbewegung dienen. Der Einzeller ist weltweit im Süßwasser, vor allem in nährstoffreichen Kleingewässern, zu finden. *C. reinhardtii* enthält, bei einer Größe von etwa 15 µm Länge, einen Chloroplasten mit einem großen Pyrenoid. Im Augenfleck (Stigma) sind als Photorezeptoren rhodopsinhaltige Proteine, die Channelrhodopsine 1 und 2 (ChR1 und ChR2), eingelagert, die der Phototaxis dienen (Streble and Krauter 1988).

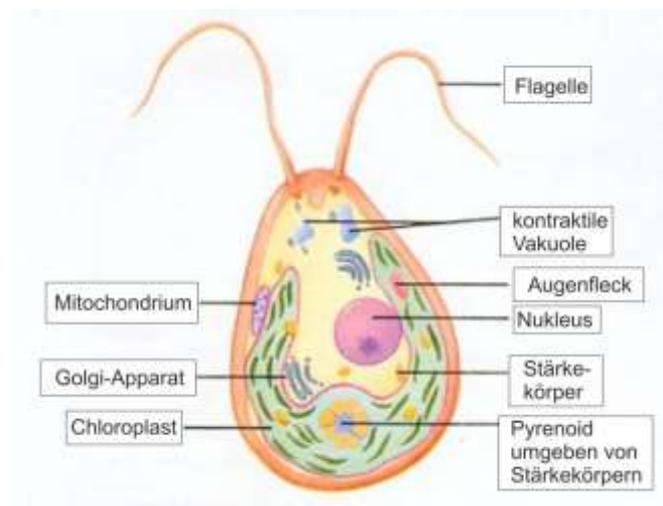


Abb. 1: Schematische Darstellung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Modifiziert nach Stern und Witman (2008)

Abhängig von den Lichtverhältnissen werden bei *C. reinhardtii* sowohl phototaktische als auch photophobische Reaktionen hervorgerufen. Sineshechekov et al. (2002) zeigten, dass ausschließlich ChR2-enhaltende Zellen, nicht auf hohe Lichtintensitäten reagieren. Analog dazu führten Experimente mit Zellen von *C. reinhardtii*, die ausschließlich ChR1 enthalten zu einer verminderten Reaktion bei niedrigen Lichtverhältnissen. Daraus schloss man, dass ChR2 die Phototaxis, ChR1 photophobische Reaktionen steuert. Diese

Annahme ist jedoch kontrovers und weiterhin Gegenstand der Diskussion (Govorunova, Jung et al. 2004, Kateriya, Nagel et al. 2004, Hegemann 2008).

Die Grünalge ist ein wertvoller Modellorganismus. Da sie fakultativ heterotroph ist, wirken sich Mutationen den Photosyntheseapparat betreffend nicht letal aus wenn eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (Spreitzer and Mets 1981). Der Nachweis eines eigenen Chloroplastengenomes fand mit Hilfe von *Chlamydomonas* statt (Sager 1960), ebenso die erst Transformation eines Chloroplasten- und mitochondrialen Genoms (Boynton, Gillham et al. 1988, Randolph-Anderson, Boynton et al. 1993).

1.2 Rhodopsine

Rhodopsinmoleküle sind photochemisch aktive Membranproteine, die das Vorhandensein von sieben, die Membran durchspannende, Helices gemeinsam haben. Das als Schiff' Base gebundene Chromophor Retinal ist an ein Lysinrest der siebten Transmembranhelix (TM) gebunden und erfährt bei Belichtung eine Isomerisierung. Generell werden Rhodopsine in zwei Gruppen klassifiziert. Typ 1-Rhodopsine stellen die Gruppe der mikrobiellen Rhodopsine dar und sind sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vorhanden (Sharma, Spudich et al. 2006, Sudo, Ihara et al. 2011).

Typ 2-Rhodopsine befinden sich in den Photorezeptorzellen von Vertebraten und Invertebraten. Es sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die als Chromophor 11-*cis*-Retinal gebunden haben. Bei Belichtung wird der Kofaktor zu all-*trans*-Retinal isomerisiert, die Schiff' Base gespalten und eine Signalkaskade in Gang gesetzt an deren Ende die Hyperpolarisation der Zelle steht (Spudich, Yang et al. 2000, Terakita 2005).

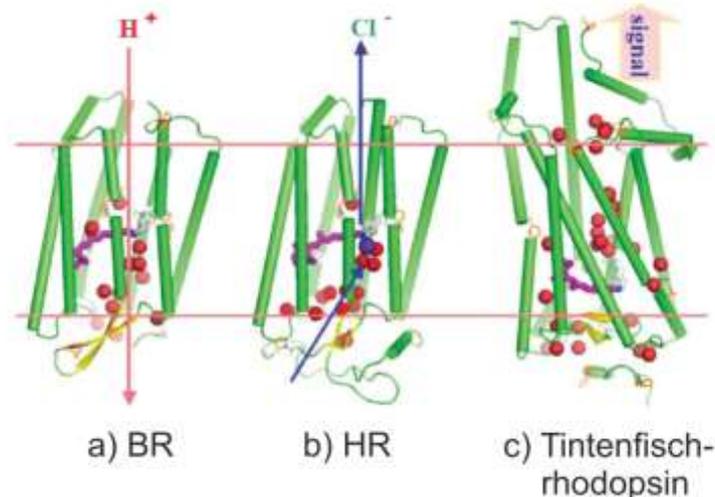


Abb. 2: Schematische Abbildung von Rhodopsinen

a) Protonenpumpe Bakteriorhodopsin; b) Chloridpumpe Halorhodopsin; c) Tintenfischrhodopsin
a) und b) entsprechen Typ 1-Rhodopsinen (mikrobielle Rhodopsine), c) entspricht Typ 2-Rhodopsin, die Signalweiterleitung wird über einen Transducer vermittelt; Modifiziert nach Kouyama und Murakami (2010)

Typ 1-Rhodopsine binden als lichtsensitiven Kofaktor *all-trans*-Retinal. Die Bindung bleibt bei Belichtung erhalten und die Lichtenergie wird genutzt um Ionen zu transportieren. Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) kann dies auch gegen einen elektrochemischen Gradienten bewerkstelligen. Auf diese Weise wird ein elektrochemisches Potential über der Membran aufgebaut aus dem Energie in Form von ATP gewonnen wird (Racker and Stoeckenius 1974, Sudo, Ihara et al. 2011). BR aus *Halobacterium salinarum* war das erste mikrobielle Rhodopsin das in den frühen 70er Jahren gefunden und charakterisiert wurde (Oesterhelt and Stoeckenius 1971, Oesterhelt and Stoeckenius 1973). Schon bald wurden weitere mikrobielle Rhodopsine entdeckt; unter anderem die Chloridpumpe Halorhodopsin (HR), die in der Familie der Halobacteriaceae, aus der Gruppe der extrem halophilen (salzliebenden) Archaea, z.B. in *Natronomonas pharaonis*, vorkommt. Das optimale Wachstum von extremen Halophilen findet bei einer Salzkonzentration von etwa 4M NaCl statt. Im Falle von *Natronomonas pharaonis* zusätzlich bei einem pH-Wert von 8.5. Chlorid (Cl^-) wird mit Hilfe von HR aktiv in die Zelle gepumpt um eine negatives Membranpotential aufrecht zu erhalten, das notwendig ist um z.B. das Zellvolumen bei Wachstum und Zellteilung zu vergrößern, aber auch zur ATP-Synthese (Schobert and Lanyi 1982, Bamberg, Hegemann et al. 1984, Muller and Oren 2003, Seki, Miyauchi et al. 2007).

Einleitung

Des Weiteren konnten licht-sensitive sensorische Rhodopsine identifiziert werden. Sensory Rhodopsin I und II (SR I und II) aus Haloarchaea binden per Transducer (Htr I und II) an eine Histidin-Kinase (Che A), die wiederum die Phosphorylierung des Flagellenmotors moduliert. Hierbei wird eine phototaktische oder photophobische Schwimmreaktion hervorgerufen (Spudich, Yang et al. 2000, Sudo, Ihara et al. 2011).

Die Ionenkanäle ChR1 und ChR2 dienen ebenfalls der Phototaxis und wurden zuerst in der Grünalge *C. reinhardtii* beschrieben. ChR1 wurde als Protonenkanal identifiziert (Nagel, Ollig et al. 2002), der bei etwa 500nm maximale Aktivität aufweist. Aktuellere Studien belegen jedoch, dass ChR1 neben Protonen (H⁺) auch Leitfähigkeiten für mono- und divalente Kationen besitzt (Berthold, Tsunoda et al. 2008, Tsunoda and Hegemann 2009). ChR2 wurde als kationenselektiver und lichtsensitiver Ionenkanal identifiziert, der sowohl für mono- als auch divalente Kationen permeabel ist. Das Absorptionsmaximum liegt bei 470nm, d.h. relativ zu ChR1 in den blauwelligen Bereich verschoben (Nagel, Szellas et al. 2003). Inzwischen wurden weitere Channelrhodopsine in anderen Arten der Gattung *Chlamydomonas* (Abb. 3) beschrieben, die sich hinsichtlich des Absorptionsmaximums, der Kinetik oder der Lichtsensitivität unterscheiden (Hou, Govorunova et al. 2012).

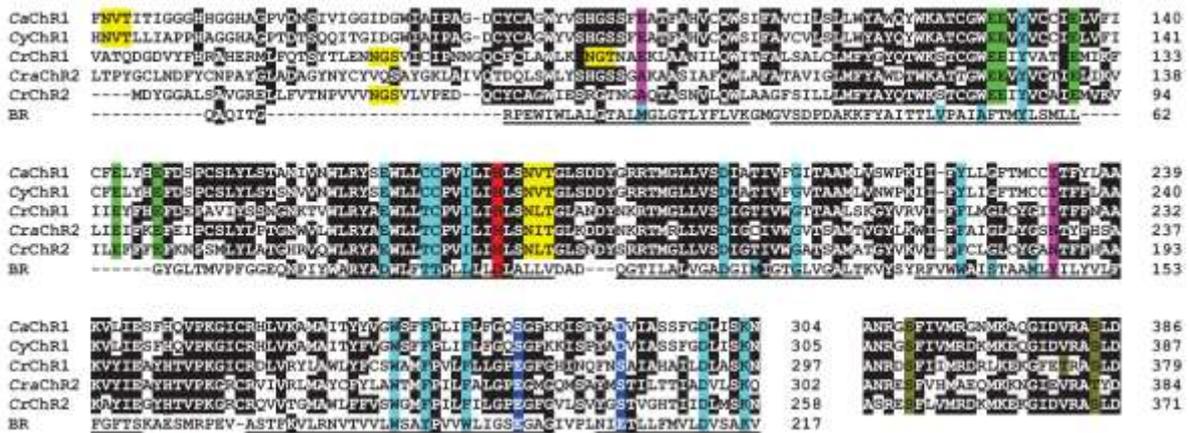


Abb. 3: Partielles Alignment der Aminosäuresequenz von ChRs aus *Chlamydomonas* und BR

Cr = *C. reinhardtii*; Cy = *C. yellowstonensis*; Ca = *C. augustae*; Cra = *C. raudensis*;

Konservierte, identische Reste; Reste, die die Retinalbindetasche in BR formen; konservierte Glutaminsäuren (Glu, E), die vermutlich die zweite Helix bilden; Reste, die zu molekularen Unterschieden zwischen CrChR1/VcChR1 und CrChR2/VcChR2 führen; Protonendonor in BR; Glu194 und Glu204 in BR; vermutliche Glykosylierungsstellen; konservierte Reste, die in CrChR1 oder CrChR2 phosphoryliert sind; Bereiche der Transmembranhelices; Verändert nach Hou, Govorunova et al. (2012)

1.3 Bakteriorhodopsin

Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) wurde im Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* entdeckt. BR gehört, wie auch Halorhodopsin (HR) und die Channelrhodopsine (ChR2 und ChR1), zu den mikrobiellen Rhodopsinen. Die Bindung von all-*trans*-Retinal an Lysin 216 (K216) (Bayley, Huang et al. 1981) erfolgt kovalent durch eine Schiff' Base, welche im Grundzustand, d.h. bei Dunkelheit protoniert vorliegt (Luecke, Schobert et al. 1999). Bei Absorption eines Photons der Wellenlänge 568nm isomerisiert das Chromophor zu 13-*cis*-Retinal und hat damit die Deprotonierung der Schiff' Base zur Folge. Das Proton wird nun an die Aminosäure (AS) D85 weitergegeben und anschließend in den extrazellulären Bereich entlassen. Zur Reprotonierung wird ein Proton aus dem zytoplasmatischen Bereich über die AS D96 aufgenommen und an K216 weitergegeben (Butt, Fendler et al. 1989, Gerwert, Hess et al. 1989). Das Chromophor 13-*cis*-Retinal erfährt eine Reisomerisierung und liegt wieder im Grundzustand vor. Die Weitergabe des Protons wird begleitet von spektralen Intermediaten, die durch distinkte Absorptionsmaxima charakterisiert sind (Lanyi 2006, Lanyi 2007). Die kovalente Bindung zwischen Kofaktor und Protein ist nicht notwendig um Protonen zu pumpen; BR, das an K216 alaninsubstituiert wurde, konnte weiterhin, wenn auch vermindert, Protonen pumpen, indem Retinylidenethylamin zugegeben wurde (Schweiger, Tittor et al. 1994).

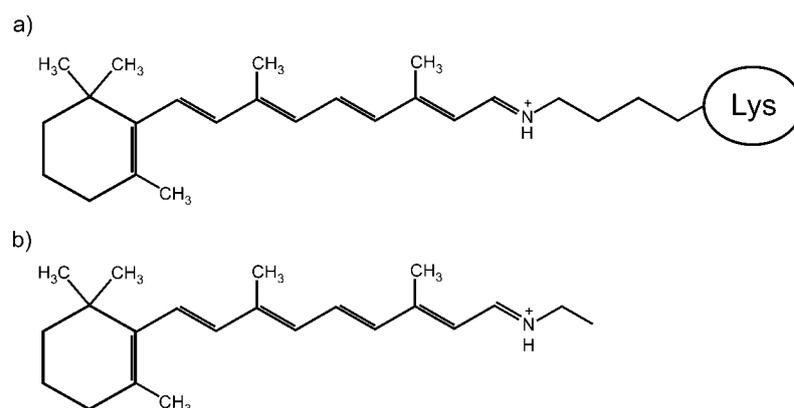


Abb. 4: Schematische Darstellung von
a) Schiff' Base und b) Retinylidenethylamin

Einleitung

Die bereits vorhandene Schiff' Base (Abb. 4b) kann De- und Reprotoniert werden und somit H^+ weitergeben (Schweiger, Tittor et al. 1994). Dass sich Retinalisomere in die Bindetasche von BR einlagern können wurde schon 1977 gezeigt. Diese Einlagerung muss keine kovalente Bindung zur Folge haben, eine Voraussetzung dafür ist eine planare Konformation des Isomers (Schreckenbach, Walckhoff et al. 1977, Schreckenbach, Walckhoff et al. 1978).

1999 (Luecke, Schobert et al.) konnte die Struktur von Bakterioopsin (Protein ohne Kofaktor) mittels Röntgenkristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von 1.55 Å aufgeklärt werden. BR bildet ein Trimer, das durch Helix-Helix-Kontakte stabilisiert wird. Das Chromophor Retinal liegt quer verlaufend in einer Aussparung der sieben TM. Interhelikale Wasserstoffbrücken innerhalb des Monomers stabilisieren die Tertiärstruktur, sodass diese nicht vom trimeren Zustand abhängig ist.

In der näheren Umgebung von all-*trans*-Retinal befinden sich 12 AS, von denen sieben hochkonserviert sind oder einen homologen Charakter besitzen (Luecke, Schobert et al. 1999). Unter diesen befindet sich auch M118, das Suzuki et al. (2003) in einem Proteinalignment T159 aus ChR2 zuordnen konnten. Viele Aminosäuren, die Kontaktstellen zum Kofaktor aufweisen resultieren bei gezielter *in-vitro* Mutagenese in schwerwiegenden Veränderungen der Proteineigenschaften, wie verschobene Absorptionsmaxima oder Kinetiken (Marti, Otto et al. 1991, Sonar, Krebs et al. 1993, Ihara, Amemiya et al. 1994).

Bei Untersuchung der thermodynamischen Stabilität von BR durch Paul Curnow und Paula J. Booth, wurde, bei Entfaltung des Apoproteins (Protein ohne gebundenen Kofaktor), die frei werdende Energie (ΔG) mit etwa 6kcal mol^{-1} bestimmt (Curnow and Booth 2010). Dieser Wert erhöht sich auf ca. 23kcal mol^{-1} bei Entfaltung des Holoproteins, d.h. bei gebundenem Chromophor. Durch die Bindung des Kofaktors all-*trans*-Retinal wurde also eine Erhöhung der thermodynamischen Stabilität von 17kcal mol^{-1} nachgewiesen. Des Weiteren stellten Curnow und Booth fest, dass die Entfaltungsgeschwindigkeit bei gebundenem Retinal abnahm. Aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität kann BR *in vitro* spontan vom denaturierten Zustand in eine native Sekundärstruktur übergehen, unabhängig von der Verfügbarkeit von Retinal. Dies deutet darauf hin, dass das Chromophor nicht die Proteinfaltung initiiert. Die

Regeneration zum voll funktionsfähigen BR findet anschließend in zwei Schritten statt. Zunächst erfolgt die nichtkovalente Bindung von Retinal in der Bindetasche, im zweiten Schritt die Bildung der Schiff´ Base (Booth, Farooq et al. 1996).

Weiterhin trägt der C-Terminus von BR entscheidend zur Stabilität des Proteins bei. Der extramembranär und intrazellulär gelegene C-Terminus (AS 227 - AS 248) enthält mehrere Carboxygruppen, die vermutlich in die Protonrekutierung involviert sind. Bei Verkürzung des Proteins auf 237 AS konnten keine Auswirkungen auf die Pumpaktivität, jedoch eine erhöhte Denaturierungsrate festgestellt werden. Bei Deletion des gesamten C-Terminus (auf 228 AS) wurde die Pumpaktivität von BR stark vermindert, im gleichen Maße stieg die Denaturierungsrate (Turner, Chittiboyina et al. 2009).

Im Gegensatz dazu beschrieben Liao und Khorana (1984), dass das Verkürzen des C-Terminus´ durch Papain, Pronase oder Carboxypeptidase A keine Beeinträchtigung der Pumpaktivität zur Folge hat. Die thermodynamische Stabilität wurde bei dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Es ist anzunehmen, dass nicht ausschließlich das gebundene Chromophor *all-trans*-Retinal sondern auch das Vorhandensein des intakten C-Terminus für die Stabilität von BR essentiell ist.

1.4 Channelrhodopsin 2

1.4.1 Grundlagen

Funktionelles Channelrhodopsin 2 besteht aus einem Proteinanteil (Chop2) und einem Chromophor als Kofaktor (*all-trans*-Retinal), das im Grundzustand als protonierte Schiff´ Base an ein Lysinrest der siebten Helix gebunden ist (Hegemann, Gartner et al. 1991, Lawson, Zacks et al. 1991, Nagel, Szellas et al. 2003). Der N-terminale Bereich von ChR2 liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Der gesamte Kanal besitzt eine Länge von 737 Aminosäuren, in der Erstbeschreibung und Charakterisierung von ChR2 konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Verkürzung des C-Terminus´ auf 315 AS zu keinerlei

Beeinträchtigung der Funktion führt (Nagel, Szellas et al. 2003). Während BR bei 570nm maximal absorbiert, kann ChR2 blaues Licht bei einer Wellenlänge von 460 - 470nm nutzen (Sineshchekov, Jung et al. 2002, Nagel, Szellas et al. 2003). Bei Dauerbelichtung kann ein Peakstrom (I_p) beobachtet werden, gefolgt von einem kleineren Stromplateau (stationärer Strom I_s), aufgrund einer Desensibilisierung des Kanals. Bei Belichtungsende schließt der Kanal sehr schnell, mit einer Zeitkonstante (τ_{off}) von ca. 10ms, die jedoch vom internen pH-Wert abhängig ist (Nagel, Szellas et al. 2003). Das Applizieren eines zweiten Lichtpulses nach einer kurzen Dunkelphase führt zu einer verminderten Stromantwort des Peakstroms, bei unveränderter Größe des stationären Stroms. Die Wiederherstellung des anfänglichen Peakstroms beträgt ca. 5 Sekunden und ist abhängig vom angelegten Membranpotential und externen und internen pH-Wert (Nagel, Szellas et al. 2003, Bamann, Gueta et al. 2010, Berndt, Schoenenberger et al. 2011).

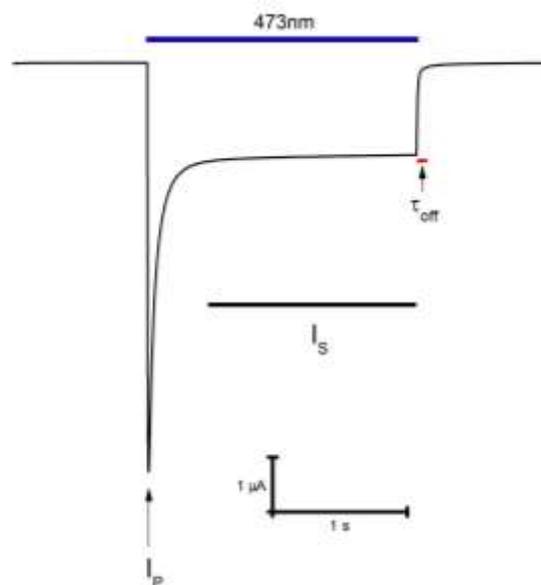


Abb. 5: Stromverlauf von ChR2 bei Belichtung von $\lambda=473\text{nm}$.

Der anfängliche Dunkelstrom wird bei Beginn der Belichtung stark negativ (I_p), und geht dann in den stationären Strom (I_s) über. Die Größe des Stromes ist dabei von der Lichtintensität abhängig. Bei Beendigung der Belichtung schließt der Kanal mit einer Zeitkonstante (τ_{off}) von ca. 10ms.

Vergleichbar mit BR kommt es bei Belichtung zu einer Isomerisierung des Chromophors zu 13-*cis*-Retinal und zur Deprotonierung der Schiff Base. Durch die folgende Konformationsänderung des Kanals wird dieser sowohl für monovalente Kationen wie

Einleitung

Na⁺, K⁺ und Guanidinium (Gua⁺), als auch für divalente Kationen permeabel. Der Photozyklus wird von einer Reihe von spektralen Zuständen begleitet und ist bis dato Gegenstand intensiver Forschung.

1.4.2 ChR2-Mutanten

ChR2 wird zumeist im neurobiologischen Bereich angewendet. Der Kanal kann sehr gut genutzt werden, um Neuronen zu aktivieren, indem ChR2 in ihrer Plasmamembran exprimiert wird. Durch die Gabe von Lichtpulsen und das darauffolgende Einströmen von Kationen können artifiziell Aktionspotentiale (AP) ausgelöst werden um z.B. eine Verhaltensänderung eines Versuchstieres hervorzurufen, was bisher erfolgreich bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dessen Larven (Schroll, Riemensperger et al. 2006) oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* angewandt wurde (Nagel, Brauner et al. 2005). Eine definierte Frequenz von Aktionspotentialen ruft eine definierte Reaktion des Versuchstieres oder molekulare Antwort der Zelle hervor. Um ein AP auszulösen ist es notwendig die Zellen, von einem Ruhepotential von ca. -70mV ausgehend, auf den Schwellenwert von ca. -50mV zu depolarisieren. Für das Auslösen von hochfrequenten Pulsen sind niedrige Lichtbedingungen erforderlich um die Integrität der Zelle zu erhalten. Um ChR2 für neurobiologische Anwendung zu optimieren, wurden kritische Aminosäuren zielgerichtet verändert.

1.4.2.1 H134R

H134 in ChR2 entspricht D96 in BR. Dort ist dieser Rest für das Pumpen der Protonen unerlässlich, da D96 als Protonendonator zur Reprotonierung der Schiff´ Base fungiert (Butt, Fendler et al. 1989, Gerwert, Hess et al. 1989). Um erhöhte Photoströme zu erhalten wurde Histidin zu Arginin verändert, wobei die Kinetiken des Kanals weitgehend unverändert blieben ($\tau_{\text{off}} \sim 20\text{ms}$). Im Jahr 2005 wurde das veränderte ChR2 als die Erste von vielen Mutanten in Muskelzellen und mechanosensorischen Neuronen von *C. elegans* exprimiert. Bei Expression des Kanals in Muskelzellen konnten durch

Belichtung des Nematoden Muskelkontraktionen hervorgerufen werden. Durch mechanosensorische Neuronen wird Berührung weitergeleitet, sodass der Nematode bei Expression von ChR2-H134R in diesen Zellen durch Belichtung die gleiche Reaktion wie durch Berührung zeigt (Nagel, Brauner et al. 2005).

1.4.2.2 C128 / D156

Das prominenteste Beispiel ist sicherlich die von Berndt (Berndt, Yizhar et al. 2009) erstmals beschriebenen Mutanten C128T/A/S. Diese Mutanten weisen einen stark verlangsamten Photozyklus auf, d.h. dass das Schließen nach Beendigung der Belichtung extrem verlangsamt abläuft. Während ChR2-WT Schließzeiten von 10-15 ms aufweist, geschieht der Schließvorgang bei C128-Mutanten mit Zeitkonstanten von 2 Sekunden (C128T), 52 Sekunden (C128A) und 106 Sekunden (C128S) (Berndt, Yizhar et al. 2009). Durch den extrem verlangsamten Photozyklus verbleibt der Kanal im leitenden Zustand P520. Das Photointermediat P520 ist bei ChR2-WT sehr kurzlebig, durch den Austausch der AS Cystein wird die Lebensdauer dieses Intermediates verlängert. Dadurch wurde es möglich die spektralen Eigenschaften von ChR2 im Detail zu untersuchen (Bamann, Gueta et al. 2010). Ferner kann der Kanal durch Belichtung bei einer Wellenlänge von 520nm wieder in den nichtleitenden Zustand (D470) versetzt werden. Folgendermaßen ist auch die Lichtsensitivität drastisch erhöht; die Lichtsättigung konnte mit einer geringeren Anzahl an Photonen erreicht werden als ChR2-WT. Diese Mutanten finden hohen Anklang in der Neurobiologie. Neuronale, C128S/A-exprimierende Zellen können mit Hilfe von wenigen ms dauernden Pulsen blauen Lichtes depolarisiert werden, was zur Ausbildung von Aktionspotentialen führt. Bei Belichtung der Zellen mit grünem Licht wird der Kanal aktiv geschlossen, die Depolarisation beendet und somit das Auslösen weiterer Aktionspotentiale verhindert (Berndt, Yizhar et al. 2009).

In der vierten Transmembranhelix wurde die Aminosäure D156 identifiziert, die möglicherweise eine Wasserstoffbrücke mit C128 in TM 3 eingeht. Aufgrund der eingefügten Veränderung zu Alanin kann diese Wasserstoffbrücke nicht mehr ausgebildet werden wodurch D156A phänotypische Ähnlichkeiten zu C128X (X = T/S/A) aufweist. Die Schließzeit von >100 Sekunden kann durch Lichtpulse von grünem (532nm)

oder violetterem (405nm) Licht verkürzt werden; Infolgedessen ist die Lichtsensitivität, analog zu C128X Mutanten, um ein vielfaches erhöht (Bamann, Gueta et al. 2010). Die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen C128 und D156 konnte jedoch bei Aufklärung der Kristallstruktur von Kato et al. nicht bestätigt werden; Hinsichtlich der Thiolgruppe von C128 wurde eine Assoziation mit dem π -Elektronensystem des Retinals postuliert (Kato, Zhang et al. 2012).

1.4.2.3 ChETA

Um Aktionspotentiale in einer Nervenzelle mit hoher Präzision auszulösen, sind Mutanten erforderlich, die bei geringer Belichtungsintensität große Ströme erzeugen und dabei keinen verlangsamten Photozyklus besitzen.

Bei der Verwendung von vielen ChR2-Mutanten können APs in Nervenzellen nur bis zu einer Frequenz von 40 Hz ausgelöst werden (Boyden, Zhang et al. 2005, Lin, Lin et al. 2009). Bei höheren Stimulationsfrequenzen zeigte sich, dass APs ausblieben oder ohne zusätzlichen Lichtpuls hervorgerufen wurden. Da die Frequenz der APs einen informativen Gehalt für das Nervensystem besitzt ist es notwendig APs in möglichst vielen verschiedenen Frequenzen auslösen zu können. Die Mutante E123T zeigt die erforderlichen Eigenschaften von schnelleren Schließzeiten ($\tau_{\text{off}} \sim 5\text{ms}$) und einem rotverschobenen Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} \sim 500\text{nm}$. Da die hervorgerufenen Stromgrößen nicht zufriedenstellend waren, wurde in weiteren Versuchen E123T mit der schon beschriebenen Mutante H134R kombiniert und „ChR2-E123T accelerated“, kurz ChETA, genannt. Der Begriff „ChETA“ beinhaltet mutante ChR2-Proteine mit schneller Kinetik, die die Substitution von E123 beinhalten. Die Kombination beider Mutationen vereint die positiven Eigenschaften der jeweiligen Einzelmutanten und kann somit optimal für die Manipulation von Nervenzellen bis zu einer Frequenz von 200 Hz verwendet werden (Gunaydin, Yizhar et al. 2010).

1.4.2.4 T159C

Threonin 159 (T159) liegt wie auch D156 in der vierten Transmembranhelix. Aufgrund der Nähe zum Chromophor war davon auszugehen, dass ein Austausch dieser

Aminosäure zu ausgeprägten Veränderungen der Kanaleigenschaften führt. Bei Expression von T159C in *X. laevis* Oozyten wurde eine, um etwa das Zehnfache, erhöhte Stromantwort, verglichen mit ChR2-WT injizierten Oozyten festgestellt. Die Schließzeit war von ca. 10ms bei WT-injizierten Zellen auf ca. 20ms bei T159C-injizierten Zellen erhöht, das Absorptionsmaximum verblieb bei ca. 470nm. Eine Kombination mit E123T (ChETA) resultierte in einer, um etwa das Dreifache, erhöhten Stromantwort, in verringerten Schließzeiten, die ChR2-WT entsprechen und der Rotverschiebung des Anregungsmaximums auf 505 nm. Sowohl Einzelmutante als auch die Kombination mit E123T konnte in Hippokampuszellen von Ratten exprimiert und Aktionspotentiale ausgelöst werden ohne eine Beschädigung oder Beeinträchtigung der Zellen hervorzurufen (Berndt, Schoenenberger et al. 2011).

1.4.2.5 CatCh

Veränderungen in der dritten Transmembranhelix führen häufig zu starken Modifikationen der Kanalkinetiken (siehe C128). Die Modifikation des Leucins 132 zu Cystein, führte zu einer deutlichen (um das 6fache) Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit (CatCh = Calcium translocating Channelrhodopsin). Des Weiteren konnte eine gesteigerte Lichtsensitivität, und ein, um nur wenige Nanometer, rotverschobenes Absorptionsspektrum festgestellt werden. Die Schließzeit war, verglichen mit ChR2-WT, mit ca. 16ms leicht verzögert. Bei Belichtung wird die Zelle durch das Einfließen von Na^+ und Ca^{2+} depolarisiert. Ferner wird die Depolarisation durch die gesteigerte Lichtsensitivität verstärkt. Bei Erreichen des Schwellenwertes werden spannungsabhängige Na^+ -Kanäle geöffnet und ein Aktionspotential ausgebildet. Aufgrund der erhöhten Ca^{2+} -Leitfähigkeit können CatCh-exprimierende Neuronen auch bei negativeren Membranpotentialen ein Aktionspotential ausbilden (Kleinlogel, Feldbauer et al. 2011).

1.4.3 Struktur

Die Kristallstruktur wurde 2012 von Kato et al. aufgeklärt. Hierzu wurde eine Chimäre (C1C2) bestehend aus dem N-Terminus und Helices 1 bis 5 von ChR1, und den Helices 6 und 7, sowie des modifizierten C-Terminus von ChR2 (Kato, Zhang et al. 2012) verwendet. C1C2 liegt als Dimer vor, wobei zwischen den beiden Protomeren Lipide und Wassermoleküle gefunden wurden.

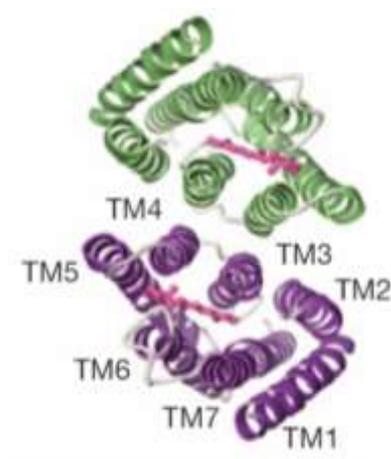


Abb. 6: Struktur der Chimäre C1C2 als Dimer

C1C1, von der extrazellulären Seite betrachtet, besteht aus 7 Transmembranhelices (TM 1 - TM 7), die durch extrazelluläre und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind. Die beiden Protomere sind violett bzw. grün, der Kofaktor all-*trans*-Retinal als pinke Struktur dargestellt. Modifiziert nach Kato, Zhang et al. (2012).

Die beiden Protomere bilden Disulfidbrückenbindungen aus, die in Kombination mit dem N-Terminus das Dimer stabilisieren (Muller, Bamann et al. 2011, Kato, Zhang et al. 2012). Die Rolle des C-Terminus ist noch weitgehend ungeklärt; möglicherweise ist er in der subzellulären Lokalisation und Membranverankerung in *C. reinhardtii* involviert (Mittelmeier, Boyd et al. 2011, Kato, Zhang et al. 2012).

Von Untersuchungen an BR und HR aus *Halobacterium salinarum* ist bekannt, dass diese in der Membran Trimere (Luecke, Schobert et al. 1999), bzw. Tetramere (Havelka, Henderson et al. 1993) bilden, wobei die funktionelle Einheit der beiden Pumpen das Protomer darstellt (Dencher and Heyn 1979, Bamberg, Tittor et al. 1993, Muller, Bamann et al. 2011).

Die Pore von C1C2 wird von den Helices 1, 2, 3 und 7 geformt und ist mit 5 negativ geladenen AS ausgekleidet (Eisenhauer, Kuhne et al. 2012, Kato, Zhang et al. 2012, Watanabe, Welke et al. 2012). Da ein Großteil dieser AS in TM 2 lokalisiert sind, wird angenommen, dass die Ionenselektivität und Leitfähigkeit in der Chimäre von TM2 bestimmt wird. Außerdem wurden 7 weitere polare Reste gefunden, die eine hydrophile und stark elektronegative Oberfläche schaffen (Kato, Zhang et al. 2012). Dadurch können von der intra- und extrazellulären Seite Wassermoleküle einwandern und so eine Brücke für hydratisierte Ionen bilden (Eisenhauer, Kuhne et al. 2012). Aufgrund der passierenden Kationen wird angenommen, dass die Pore einen Durchmesser von ca. 6Å besitzt (Muller, Bamann et al. 2011, Eisenhauer, Kuhne et al. 2012).

Bisher wurde postuliert, dass C128 und D156 eine Wasserstoffbrücke ausbilden, die unter anderem beim Öffnen des Kanals eine essentielle Rolle spielt (Nack, Radu et al. 2010). Dies konnte bei Untersuchung der Kristallstruktur nicht bestätigt werden. Kato et al. zeigten, dass C128 eine Assoziation mit dem π -Elektronensystem des Retinals aufweist und so einen Teil der Retinalbindetasche darstellt. Die Polyenkette und der β -Ionon-Ring des Retinals sind umgeben von 5 aromatischen AS, die eine hydrophobe Bindetasche bilden. Drei weitere Aminosäuren, darunter C128 und T159, formen eine weniger hydrophobe Tasche, die vermutlich bei Modifikation zu einem veränderten Absorptionsspektrum führen. (Kato, Zhang et al. 2012).

1.4.4 Photozyklus

Bei Belichtung durchläuft ChR2 einen Photozyklus, der charakterisiert ist durch das zeitlich versetzte Auftreten von Photointermediaten. Die Intermediate kennzeichnen sowohl die Isomerisierung des Retinals, De- und Reprotonierung der Schiff' Base, als auch Konformationsänderungen des Proteins.

Durch Blaulicht geht das Protein vom Grundzustand (P_0 480) in kurzlebige Intermediate (P_1 400/520) über, die die Isomerisierung von all-*trans*-Retinal zu 13-*cis*-Retinal und die De- und Reprotonierung der Schiff' Base kennzeichnen. Bisher wurde postuliert, dass H^+ hierbei auf E123 als primären Protonenakzeptor übergeht (Bamann, Kirsch et al. 2008),

aufgrund der kürzlich aufgeklärten Kristallstruktur von C1C2 wird angenommen, dass H^+ auf D253 übergeht (Kato, Zhang et al. 2012). Mit Reprotonierung der Schiff' Base durch H134 (Butt, Fendler et al. 1989, Bamann, Kirsch et al. 2008) geht ChR2 in das Intermediat P_2^{520} über. Das damit korrelierte Öffnen des Kanals bleibt auch bei Intermediat P_3^{520} bestehen. Durch Belichtung des Proteins mit einem zweiten Photon der Wellenlänge $\lambda=540\text{nm}$ kann der Photozyklus sozusagen kurzgeschlossen werden; es ist möglich den Kanal direkt in den Grundzustand P_0^{480} zurückzusetzen. Ohne Absorption eines weiteren Photons geht der Kanal in den inaktiven Zustand, gekennzeichnet durch P_4^{480} , über. Der Grundzustand wird durch Isomerisierung des Retinal und den ursprünglichen Protonierungsstatus erreicht (Bamann, Kirsch et al. 2008).

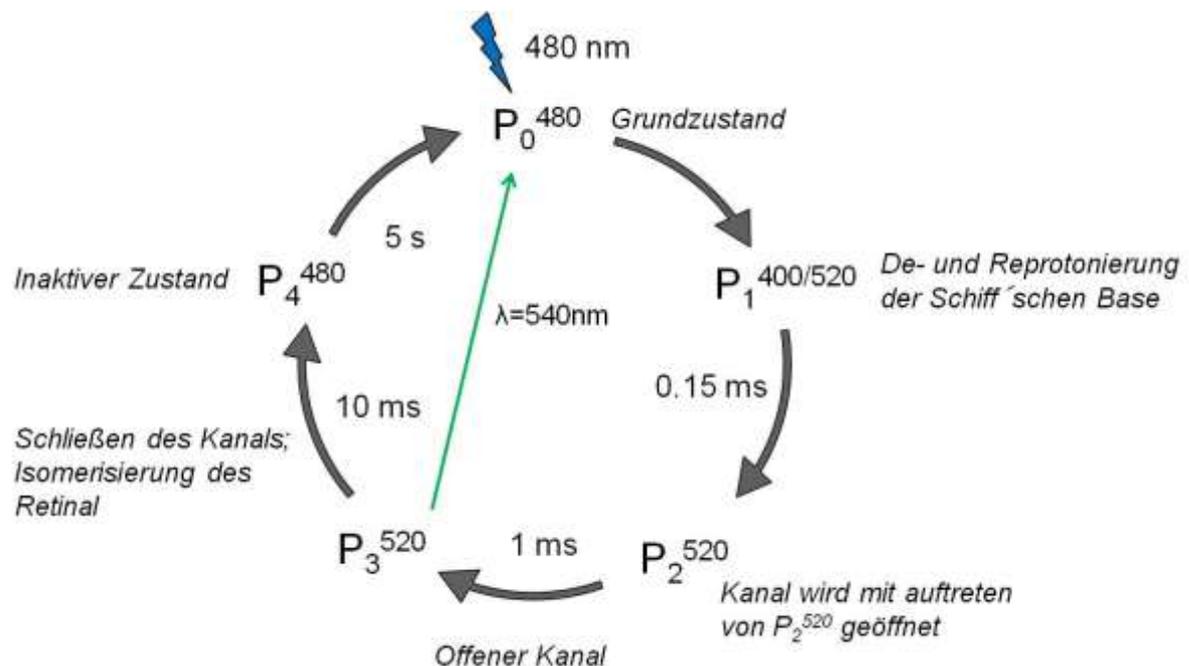


Abb. 7: Schematischer Photozyklus von ChR2

Modifiziert nach Bamann, Kirsch et al. (2008); Der grüne Pfeil zeigt die Verkürzung des Photozyklus durch Absorption eines zweiten Photons von 540nm und die daraus resultierende Rückkehr in den Grundzustand

Die zeitlichen Übergänge der Intermediate sind von der extra- und intrazellulären Protonenkonzentration, sowie von Polarisationszuständen der Zelle abhängig (Nagel, Szellas et al. 2003, Bamann, Kirsch et al. 2008).

Der Photozyklus von ChR2 ist weiterhin Gegenstand umfassender Forschung; Die differierenden Interpretation der erhaltenen Daten führen zu variablen Modellen des

ChR2-Zyklus' (Ritter, Stehfest et al. 2008, Bamann, Gueta et al. 2010, Stehfest and Hegemann 2010, Stehfest, Ritter et al. 2010).

1.5 Retinoide

In Vertebraten werden verschiedene chemische Substanzen wie z.B. Retinal, Retinol (=Vitamin A), Retinsäuren, Retinylpalmitat und 3-Dehydroretinol/-al zu den Retinoiden gezählt. Sie sind in viele Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose oder Immunantwort involviert (Kastner, Mark et al. 1995, Morriss-Kay and Ward 1999). Die konjugierten Doppelbindungen tragen maßgeblich zur chemischen Reaktivität und den lichtabsorbierenden Eigenschaften bei, da in diesem System π -Elektronen über die gesamte Länge der Polyenkette verteilt sind (Britton 1995).

Die durch die Nahrung aufgenommenen Carotinoide werden im Darm durch sogenannte Klasse-B scavenger Proteine (z.B. SR-B1) und durch passive Diffusion in die Epithelzellen des Darms (Enterozyten) aufgenommen (Hollander and Ruble 1978, van Bennekum, Werder et al. 2005). Durch das zytoplasmatische Protein BCMO1 (β -Carotin-15,15'-Monooxygenase) wird ein Molekül β -Carotin in zwei Moleküle all-*trans*-Retinal gespalten (von Lintig and Vogt 2000, Wyss, Wirtz et al. 2000) und von Retinalreduktasen zu all-*trans*-Retinol reduziert (Kakkad and Ong 1988, Crosas, Hyndman et al. 2003). Der zytosolische Transport dieser lipophilen Moleküle von der apikalen zur basalen Seite der Enterozyten erfolgt durch die Bindung an CRBP II (zytosolisches Retinol-bindendes Protein II)(Ong 1984). Retinylpalmitat oder Retinylstearat - durch LRAT und ARAT verestert (Helgerud, Petersen et al. 1982, MacDonald and Ong 1988) - stellen die Transportform des Retinols dar, die in Chylomikronen gepackt, über den Blutkreislauf in die Leber gelangen, die als Hauptspeicherort dient (Goodman, Huang et al. 1965).

Bei Bedarf wird Retinol-RBP in das Blut abgegeben und gelangt über Rezeptoren in die Zellen unterschiedlicher Organe (Goodman, Huang et al. 1965). Durch die dort vorhandenen Enzyme kann Retinol zu Vitamin A-Aldehyd (z.B all-*trans*-Retinal) oxidiert

gespalten (Wahli, Dawid et al. 1981). Die in den Oozyten enthaltenen all-*trans*-Retinal und 3-Dehydroretinal sind über eine Schiff' Base an Lipovitellin 1 gebunden (Irie, Azuma et al. 1991, Azuma, Irie et al. 1993). Ob all-*trans*-Retinal und 3-Dehydroretinal schon in der Leber an Vitellogenin gebunden werden, oder Retinol-RBP in die Oozyte gelangt und dort zu Aldehyd oxidiert wird ist bisher noch nicht geklärt (Lubzens, Lissauer et al. 2003).

1.6 Stabilität von Rhodopsinen / ERAD-System

Retinitis Pigmentosa (RP) ist eine Degeneration der Netzhaut, die Erblindung zur Folge hat. Sie kommt mit einer Häufigkeit von etwa 1/4000 vor und wird sowohl autosomal dominant, als auch autosomal rezessiv und x-chromosomal rezessiv vererbt (<http://ihg.gsf.de/ihg/patinfo/diagnostik/rp.html>). Hinsichtlich der Mutation werden zwei Arten unterschieden; Mutationen des C-Terminus, die ein fehlerhaftes Targeting zur Folge haben (Klasse I) und Mutationen der transmembranären, interdiskalen oder cytoplasmatischen Domänen, die, aufgrund der geringen thermodynamischen Stabilität, in einem falsch gefalteten Protein resultieren (Klasse II) (Sung, Schneider et al. 1991, Sung, Davenport et al. 1993). Diese sammeln sich im ER an und werden schließlich über den ERAD-Weg (ER-associated degradation) abgebaut (Saliba, Munro et al. 2002).

Versuche an Mäusen mit Klasse II Mutationen zeigten, dass die erhöhte Verfügbarkeit von Retinal eine Stabilisierung des Proteins bewirkt. Ferner wurde die Steigerung der thermodynamischen Stabilität bei Bindung des Chromophors 11-*cis*-Retinal im wildtypischen Rhodopsin von Rindern gezeigt (Hubbard 1958). Bei Klasse I Mutationen ist dies nicht der Fall. Sie können *in vitro* hinsichtlich der subzellulären Lokalisation und der Retinalbindung nicht vom WT-Protein unterschieden werden. *In vivo* wird das Protein durch einen aberanten Transport nicht in das Aussensegment der Photorezeptorzelle eingelagert, vermutlich verursacht durch eine defekte Signalsequenz (Sung, Makino et al. 1994, Li, Snyder et al. 1996, Li, Sandberg et al. 1998). Man vermutet, dass das Absterben der Photorezeptorzellen durch eine übermäßige Ansammlung von

falsch gefaltetem Rhodopsin im ER zu Stress in der Zelle führt und dadurch Apoptose eingeleitet wird (Schroder and Kaufman 2005).

Die korrekte Faltung von Proteinen findet kotranslational im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Die Proteinkonzentrationen können 2mM erreichen, demnach benötigen ungefaltete Proteine „Schutzmaßnahmen“, die eine Interaktion unter den Proteinen verhindert (Stevens and Argon 1999). Hierfür sind im ER eine Vielzahl von Chaperonen und Enzymen vorhanden, die vor einer falschen Faltung schützen oder die korrekte Faltung unterstützen. Die große Anzahl an Oxidoreduktasen im ER ist verantwortlich für die Regulierung und Katalyse der Disulfidbrückenbildung, die für die präzise Faltung extrem wichtig ist (Sitia and Braakman 2003, Schroder and Kaufman 2005). Wenn dies misslingt, werden diese Proteine unter anderem mit Hilfe des Proteasoms abgebaut. Strukturelle Veränderungen, die eine inkorrekte Faltung des Proteins zur Folge haben, werden unter anderem durch den Austausch von Aminosäuren, die Verkürzung der Polypeptidkette oder durch nicht-native Disulfidbrücken verursacht (Claessen, Kundrat et al. 2012).

Durch das Anheften von Ubiquitinmolekülen (Ub) werden die entsprechenden Proteine für den Abbau im 26S-Proteasom gekennzeichnet. Ubiquitin ist ein stark konserviertes Protein das 76AS beinhaltet. Dies geschieht meist an zugänglichen Lysinen (K), die Übertragung kann aber auch an Cysteine, Serine, Threonine oder den N-Terminus stattfinden (Ciechanover and Ben-Saadon 2004, Cadwell and Coscoy 2005).

Im ersten Schritt der Ubiquitinierung wird Ubiquitin (Ub) in einer ATP-abhängigen Reaktion durch E1 (ubiquitinaktivierendes Enzym) aktiviert und gebunden. Im zweiten Schritt wird Ub an E2 (ubiquitinkonjugierendes Enzym) übertragen. Der letzte Schritt besteht aus der Übertragung von Ub an das Zielpeptid durch E3, der Ubiquitin-Ligase. Damit eine inkorrekte Faltung von der Zelle erkannt werden kann, müssen mindesten 4 Ub-Moleküle übertragen worden sein (Thrower, Hoffman et al. 2000, Deshaies and Joazeiro 2009, Claessen, Kundrat et al. 2012). Dies kann durch die Übertragung von Einzelnen Ub-Molekülen an verschiedene Lysine geschehen (Mult ubiquitinierung) oder durch Anheftung weiterer Ub an ein bereits vorhandenes Ub am Substrat, wodurch eine

Kette entsteht (Polyubiquitinierung) (Haglund, Di Fiore et al. 2003, Pickart and Fushman 2004).

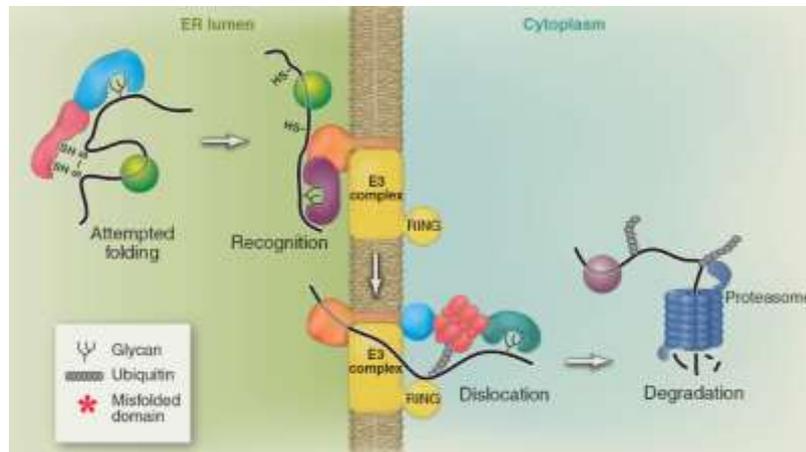


Abb. 9 Schematische Übersicht des ERAD-Systems
Modifiziert nach Smith, Ploegh et al. (2011).

Das markierte Protein wird durch einen bisher unbekanntem Kanal aus dem Lumen des ER gebracht und mit Hilfe des 26S-Proteasom degradiert, das aus zwei Subkomplexen besteht. Die Kernregion (20S „core“ Partikel) stellt die proteolytische Einheit dar und besteht aus 28 Untereinheiten. Die Bindung der, aus 17 Untereinheiten bestehenden, regulatorischen Einheit (19S „regulatory“ Partikel) führt zur Öffnung des Proteasoms, Steigerung dessen Aktivität, Entfaltung und Translokation des ubiquitinierten Substrats und zu dessen Deubiquitinierung (Sorokin, Kim et al. 2009). Die abgespaltenen Ub-Moleküle werden wiederverwendet und das falsch gefaltete Protein in kurze Peptidsequenzen gespalten.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Anwendung von Channelrhodopsin 2 zur Manipulation von Neuronen findet immer größeren Anklang, was die stetig steigende Zahl von Veröffentlichungen verdeutlicht. Der Einsatz von wildtypischem ChR2 wird hierbei immer geringer, da künstlich erzeugte Varianten Eigenschaften wie erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit, verschobene

Absorptionsmaxima oder veränderte Öffnungs- und Schließzeiten, mit sich bringen, die die Anwendung erleichtern. Am konkreten Beispiel der Anwendung im Nematoden *C. elegans* wurde die Variante ChR2-H134R eingesetzt, die, Verglichen mit wildtypischem ChR2, eine erhöhte Stromamplitude aufweist (Nagel, Brauner et al. 2005).

Da *C. elegans* nicht über endogen vorhandenes all-trans-Retinal verfügt, muss dieses dem Nährmedium zugefügt werden. Die Reaktion mit Luftsauerstoff, sowie dessen Sensitivität gegenüber Licht führen zu seiner Instabilität und somit zur verminderten Verfügbarkeit für den Nematoden. Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die thermodynamische Stabilität von Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* von der Bindung des Kofaktors und dem Vorhandensein des C-Terminus abhängt. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der retinalabhängigen Stabilität von Chop2-WT und der Erzeugung von Chop2-Varianten, die ohne gebundenen Kofaktor eine hohe Stabilität aufweisen. Die gewonnenen Erkenntnisse stellen somit einen wichtigen Aspekt für die Anwendung in retinalfreien Systemen dar.

Ein weiteres Ziel stellt die Veränderung der Ionenselektivität und -leitfähigkeit durch gezielte Mutagenese dar, um Anwendungen in tierischen Systemen zu optimieren. Obgleich die veröffentlichte Kristallstruktur (Kato, Zhang et al. 2012) wichtige Informationen liefern konnte, darf nicht ausser Acht gelassen werden, dass lediglich zwei der sieben Transmembranhelices von ChR2 stammen und die Möglichkeit von funktionellen Unterschieden zwischen ChR1 und ChR2 in Betracht gezogen werden müssen. Infolgedessen können aus den gewonnenen Daten der ChR2-Varianten Rückschlüsse auf funktionelle Mechanismen gezogen werden, die die gezielte Veränderung von ChR2 in Zukunft erleichtern und Einblicke in die Funktion und Relevanz von Aminosäuren auf die Funktionalität des Proteins geben

2. Material und Methoden

2.1 Kultur von Bakterien

Bakterien, die zur Vermehrung von Plasmiden verwendet wurden, waren ausschließlich *Escherichia coli* Bakterien des Stamms XL1 Blue MRF'.

Chemisch kompetente Bakterien wurden in 50µl-Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 5µl wässriger Lösung zu den Bakterien zugegeben und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden um die Bakteriensuspension danach wieder für 3 Minuten auf Eis zu stellen. Nach der Zugabe von 250µl SOC Medium (Tab. 2.14.1) wurden die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Transformation strich man die Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit einem entsprechenden Antibiotikum (LB-Medium + 1.5% Agar) aus und inkubierte sie über Nacht in einem Wärmeschrank (BE600; Memmert) bei 37°C.

Um die gewünschten Klone zu vermehren wurde ca. 5ml flüssiges LB-Medium (siehe Tab. 2.14.1) in ein Falcon-Röhrchen gegeben und bei 37°C über Nacht geschüttelt (G25 Incubator Shaker; New Brunswick Scientific). Dieses Flüssigmedium enthielt ebenfalls das entsprechende Antibiotikum. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit dem Vektor pGEM-HE gearbeitet wurde, der das β-Lactamasegen enthält, wurde sowohl bei den Flüssigkulturen als auch bei LB-Agarplatten Ampicillin zugegeben (50µg/ml).

2.2 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde die sogenannte „Ten Minute Plasmid Mini Prep“ verwendet. Diese beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). 1.5ml der Bakterien-Flüssigkultur wurden in ein 1.5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 30 Sekunden bei 13000g zentrifugiert und die Bakterien somit pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 50µl verworfen und das Pellet darin resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 300µl

TENS-Puffer (Tab. 2.14.2) und anschließendes Mischen. Hierdurch wurde die bakterielle DNA freigesetzt. Mit 150µl 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) wurde das Lysat neutralisiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 13000g (5min) befanden sich die genomische DNA, Lipide, Zellwandbestandteile und Proteine größtenteils im Pellet, während sich die Plasmid-DNA weiterhin in Lösung, d.h. im Überstand befand. Der Überstand wurde nun in ein frisches 1.5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600µl 2-Propanol konnte die Plasmid-DNA gefällt und durch anschließende Zentrifugation bei 13000g (5min) pelletiert werden. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C im Heizblock getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 30 - 50µl DEPC-Wasser (Diethylprocarbonat) gelöst.

2.3 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuremoleküle aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Infolge ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats können DNA und RNA im elektrischen Feld bewegt werden. Das Gel dient hierbei als Siebstruktur, durch die sich kleinere Moleküle schneller bewegen können als große. In dieser Arbeit wurden ausschließlich 1%ige Gele verwendet. Dazu wurden 1g Agarose in 100ml TAE-Puffer (Tab. 2.14.3) bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 60°C wurde GelGreen™ (1:10000) zugegeben. Dieser ungiftige Farbstoff interkaliert mit der DNA und macht sie so unter UV-Licht sichtbar. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel muss zunächst DNA-Probenpuffer zugesetzt werden. Dieser enthält unter anderem Glycerin, Bromphenolblau und Xylencyanol. Dank dieser Reagenzien sinkt die Probe in die Geltasche bzw. die Lauffront der Proben wird sichtbar gemacht. Als Marker wurde ausschließlich λ-Pst-Marker verwendet.

Material und Methoden

Für die Elektrophorese von RNA wurden ebenfalls 1%ige Gele verwendet. Dazu wurden 0.25g Agarose in 20.5 ml 1x MEN-Puffer (Tab. 2.14.3) durch Kochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 4.5ml Formaldehyd und GelRed™ (1:10000) zugegeben. Vor dem Auftragen der Probe auf das Gel wurde dieselbe mit Glyoxal-Reaktions-Lösung behandelt (Tab. 1). Hierbei wird die Probe mit der Glyoxal-Reaktions-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 55°C erhitzt. Im Anschluss wurde die Probe auf Eis gestellt und mit RNA-Probenpuffer versetzt.

Tab. 1: Ansatz einer Glyoxal Reaktion

RNA-Probe	1/3
Glyoxal-Reaktions- Lösung	2/3

2.4 Gezielte *in-vitro* Mutagenese

Um einzelne Aminosäuren in einer Sequenz auszutauschen, wurde eine gerichtete *in-vitro* Mutagenese durchgeführt. Dazu benötigt man ein Plasmid, das die kodierende Sequenz von Channelrhodopsin-2 enthält. Die benötigten Oligonukleotide (=Primer) wurden so gewählt, dass die zu mutierenden Basen möglichst mittig der Oligonukleotidsequenz lagen. Wie in Tab. 2 beschrieben wurden alle Komponenten in einem passenden Reaktionsgefäß gemischt und in einen Thermocycler gegeben. Im Anschluss wurden 10µl der Reaktion mit 1.5µl DpnI versetzt und 1.5 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch dieses Restriktionsenzym wird die ursprünglich eingesetzte, unveränderte DNA zerstört. Die verbliebene DNA kann nun in Bakterien gebracht werden (siehe 2.1), diese wiederum werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und nach Isolation des enthaltenen Plasmids (siehe 2.2) kann die Plasmid-DNA durch Sequenzierung auf das Enthalten der Mutation untersucht werden.

Tab. 2: Ansatz einer Mutagenese-Reaktion

DNA	~ 500ng
5x Phusion HF-Puffer	10µl
Primer forward (10µM)	1.25µl
Primer reverse (10µM)	1.25µl
dNTP (10mM)	1µl
Phusion Polymerase	0.5µl
<i>ddH₂O</i> ad 50 µl	

Tab. 3: Verwendetes PCR-Programm. Die Annealingtemperatur ist abhängig von den eingesetzten Oligonukleotiden.

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98°C	2'30''
20 - 35	98°C	30''
	50-65°C	30''
	72°C	15''-30''/kb
1	72°C	2'30''

2.5 Gewinnung von cRNA durch *in-vitro* Transkription (IVT)

Um Proteine in Oozyten zu exprimieren musste zunächst cRNA gewonnen werden, die dann durch Mikroinjektion in Oocyten eingebracht und dort translatiert werden konnte. Die verwendeten Vektoren mussten über virale Promotoren wie T7 oder Sp6 verfügen, die dann von RNA-Polymerasen erkannt werden konnten. Außerdem muss ein sogenannter Poly-(A)-Schwanz enthalten sein, der ausschließlich aus Adenosinen besteht und - vergleichbar mit einer mRNA - die Degradation des Produktes hemmt. Der verwendete Vektor (pGEM-HE) ist so aufgebaut, dass er in 5'→ 3'-Richtung des codierenden Strangs folgende Elemente enthält:

- 1) T7-Promotor
- 2) kodierende Sequenz des gewünschten Proteins (CDS)
- 3) Poly-(A)-Schwanz
- 4) Restriktionsschnittstelle

Um eine Matrize für diese Reaktion zu erhalten wurden zwei Vorgehensweisen angewandt, die im Folgenden näher beschrieben werden:

2.5.1 Linearisierung des Vektors

Die aus *E.coli* gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert. Bei der Wahl des entsprechenden Enzyms musste sichergestellt werden, dass dieses Enzym im gesamten Vektor nur ein einziges Mal schneidet und sich die Restriktionsschnittstelle nach der poly-(A)-Sequenz befindet. Die Erkennungssequenzen der Nukleasen sind 4, 6 oder 8 Basenpaare lang und bestehen meist aus palindromischen Sequenzen. Die Phosphodiesterbindungen der beiden DNA-Stränge werden durch eine hydrolytische Spaltung getrennt, die durch die Endonukleasen katalysiert wird. Der Ansatz wird wie in Tab. 4 beschrieben gemischt und für 1,5h bei 37°C inkubiert. Um die Vollständigkeit der Restriktion zu überprüfen trug man 5µl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel auf. Im Anschluss wurde der Ansatz über den „MinElute PCR Purification Kit“ (Quiagen) aufgetrennt, d.h. die linearisierte DNA wurde von enthaltenen Salzen und Enzymen bereinigt.

Tab. 4: Ansatz einer Restriktion

DNA	10µg
10x Puffer	5µl
Restriktionsenzym	15U
ddH ₂ O ad 50µl	

Material und Methoden

2.5.2 Gewinnung der Matrix durch PCR

Mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR; engl.: Polymerase Chain Reaction) können DNA-Fragmente mit Hilfe spezifischer Primer *in vitro* vervielfältigt werden (Mullis, Faloona et al. 1986). Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt dass sie 5' vor dem T7 Promotor und 3' nach der Poly-(A)-Sequenz liegen. Als Grundlage hierfür diente eine Standard PCR-Reaktion:

Tab. 5: Ansatz einer Standard PCR-Reaktion

DNA	5 - 50ng
5x Phusion HF-Puffer	10µl
Primer forward (10µM)	2.5µl
Primer reverse (10µM)	2.5µl
dNTP (10mM)	1µl
Phusion Polymerase	0.5µl
<i>ddH₂O</i> ad 50 µl	

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98°C	2'30''
20 - 35	98°C	30''
	50-65°C	30''
	72°C	15''-30''/kb
1	72°C	2'30''

Als Polymerase wurde die Phusion® High Fidelity DNA Polymerase gewählt, da sie fähig ist eine große Anzahl von Basen zu verknüpfen und dabei eine sogenannte Korrekturleseaktivität (engl.: proof-reading) besitzt, was die Anzahl der wahrscheinlichen Fehler der Synthese deutlich senkt.

Material und Methoden

Das Produkt der PCR wurde im Anschluss auf ein Kontrollgel aufgetragen und bei positivem Ergebnis durch das Cleanup Kit (Quiagen) aufgereinigt. Das Eluat konnte nun direkt zur Synthese von cRNA eingesetzt werden.

Die gewonnene Matrize wurde wie in Tab. 6 beschrieben in einem 1.5ml Reaktionsgefäß gemischt und für 1.5 - 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit 20µl 3M NH₄OAc versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Des Weiteren wurde die RNA bei 4°C und 20800g für 1 Stunde zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 500µl 70% EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Zur Bestimmung der Qualität und Quantität wurde sowohl 1µl der RNA auf ein Agarosegel (siehe 2.3) aufgetragen als auch die Konzentration per Photometer bestimmt.

Tab. 6: Ansatz einer in-vitro-Transkriptionsreaktion (abgewandelt von Epicentre)

Reagenz	eingesetzte Menge
lineare DNA	5.5µl
10x Transcription Buffer	2µl
Cap/NTP PreMix	8µl
DTT (100mM)	2µl
RiboGuard RNase Inhibitor	0.5µl
AmpliCap-Max T7 Enzyme Solution	2µl

2.6 Injektion von cRNA

Zur Injektion der cRNA wurde ein Nanoliter-Injektor (Nanoject™; Drummond Scientific Company) verwendet. Die Injektionskapillaren aus Borosilikatglas (Ø Aussen = 1.14mm; Ø Innen = 0.53mm; Drummond Scientific Company) wurden in einem vertikalen Puller

(PC-10; Narishige) in zwei Zügen (Tab. 7) ausgezogen und die Spitze unter dem Mikroskop auf 25 - 30µm abgebrochen. Die Injektionskapillare wurde anschließend mit gefärbten (Sudanrot), leichten Mineralöl luftblasenfrei gefüllt. Im Anschluss wurden 1 - 1.5µl RNA in die Kapillare aufgezogen und jeweils 50nl (bei 400ng/µl = 20ng) pro Oozyte injiziert.

Tab. 7: Erläuterung der Heizleistung zum Ziehen von Injektionskapillaren

	Heizleistung
Zug 1	80.1
Zug 2	58.1
Heizleistung 100 = 2.5V	

2.7 Oozyten von *Xenopus laevis*

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* kommt in der Natur südlich der Sahara vor. Er gehört zu der Familie der Pipidae, der zungenlosen Frösche. Da diese Tiere sehr widerstands- und anpassungsfähig sind, findet man sie sehr häufig als Versuchstiere in Laboren. Krallenfroschweibchen wurden ursprünglich zum Nachweis der Schwangerschaft in Apotheken gehalten. Injizierte man dem Krallenfrosch eine geringe Menge Urin einer schwangeren Frau, so kam es nach einigen Tagen zur Eiablage.

Oozyten, die zu elektrophysiologischen Messungen verwendet werden, sind unreif, d.h. die Eireifung ist arretiert im Diplotän der Prophase der ersten meiotischen Teilung. In diesem Stadium (Stadium VI nach Dumont 1972 (Dumont 1972)) besitzen die Zellen einen Durchmesser von 1200 - 1300µm und den charakteristischen unpigmentierten äquatorialen Gürtel der den pigmentierten animal Pol vom wenig pigmentierten vegetativen Pol trennt.

2.8 Operative Entnahme der Oozyten

Die Frösche wurden zur Entnahme der Oozyten zunächst betäubt. Dies geschah durch die Zugabe von 1.25g Tricaine (Ethyl 3-Aminobenzoessäureethylester) in 1.5l Wasser in das der Frosch anschließend für 30 Minuten gelegt wurde. Nach 15 Minuten wurde zusätzlich noch Eis zugegeben. Am Bauch wurde ein ca. 1cm langer Schnitt durch Haut und Muskelgewebe gesetzt und die Oozyten, möglichst als vollständige Ovarlappen, entnommen und zunächst in Ca^{2+} -haltiger ND96-Lösung (Tab. 2.14.4) zwischengelagert. Im Anschluss wurde sowohl Muskelgewebe als auch Haut vernäht und der Frosch zum Aufwachen in ein separates Becken gelegt. Nach etwa einem halben Jahr kann der gleiche Frosch wieder zur operativen Entnahme von Oozyten verwendet werden.

Unter einem Binokular wurden die entnommenen Ovarlappen werden zunächst mit Uhrmacherpinzetten manuell in kleinere Stücke von ca. 20-30 Oozyten zerteilt. Im Anschluss wurden diese Stücke mit Ca^{2+} -freier ND96 (Tab. 2.14.4) mehrfach gewaschen, mit ~2mg Kollagenase/ml versetzt und 1.5 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt um sie von Bindegewebe und Follikelzellen zu befreien. Danach mussten die nun vereinzelt Oozyten mehrmals mit Ca^{2+} -freier ND96 gewaschen werden; hierbei wurden auch unreife und zu kleine Oozyten weggespült. Im letzten Schritt spülte man die Oozyten noch einmal mit Ca^{2+} -haltiger ND96 in welcher sie dann auch weiterhin bei 16-18°C gelagert wurden.

2.9 Präparation von Plasmamembran aus Oozyten

Um den Proteingehalt von Channelrhodopsin-2 in Oozyten abseits der Fluoreszenz zu bestimmen wurde die komplette Membranfraktion aus 5-10 Oozyten isoliert wie bei Leduc-Nadeau (Leduc-Nadeau, Lahjouji et al. 2007) beschrieben. Dazu bestimmte man zunächst die Fluoreszenz der Oozyten, um sicher zu gehen, dass das gewünschte Protein exprimiert wurde. 5-10 dieser Oozyten wurden anschließend gesammelt, kurz in ND96 gewaschen und schließlich in 1ml ND96 durch auf und ab pipettieren homogenisiert. Die Homogenisierungslösung enthielt Protease-Inhibitor (Set III, EDTA-Free; Calbiochem,

Merck) um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Das Homogenisat zentrifugierte man nun für 10 Minuten bei 250g und 4°C. Der Überstand, der die Membranfraktion enthält wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 20 Minuten bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2µl ND96/Oozyte aufgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.10 SDS-PAGE

SDS (sodium dodecyl sulfate) ist ein Detergens das von Proteinen gebunden wird. Durch die Zugabe von SDS im Überschuss werden die Wasserstoffbrücken der Proteine unterbrochen und so die Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört. Zusätzlich können Disulfidbrücken zerstört werden, indem dem Probenpuffer reduzierende Agenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol zugesetzt werden. Durch die Eigenladung von SDS überdeckt es die Ladung des Proteins und bildet einen Protein-SDS-Komplex mit einem konstanten Ladungs- zu-Masse Verhältnis. Aufgrund dieser einheitlichen negativen Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld zum Pluspol und können ausschließlich infolge ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgeles (PAGE = polyacrylamid gel electrophoresis; dt.: Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Das Gel aus vernetztem Acrylamid wirkt hierbei wie ein Sieb, das die Proteine nach ihrer Größe auftrennt. Die Zusammensetzung des Sammel- bzw. Trenngels ist in Tab. 8 zu finden. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Reaktion der Verkettung eingeleitet und mit TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) katalysiert.

Tab. 8: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels

	Sammelgel (3.2 %)	Trenngel (10%)
4x Upper Tris	2,5ml	--
4x Lower Tris	--	2,5ml
H ₂ O	6.6ml	4.9ml
40% Acrylamid	0.8ml	2.5ml
10% APS	100µl	50µl
TEMED	10µl	5µl

Die Proben versetzte man zuvor mit 6x Probenpuffer (Tab. 2.14.5) und kochte sie 10 min bei 98°C im Heizblock. Anschließend wurden sie für weitere 5 min in ein Ultraschallbad gegeben. Bis zum Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel lagerte man die Proben auf Eis.

Tab. 9 Zusammensetzung der Probe zum Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel

Probe	2µl
6x SDS-Probenpuffer	1µl
<i>ddH₂O ad 6µl</i>	

Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde zusätzlich ein Protein-Marker aufgetragen, der Proteinfragmente in definierten Größen enthält. In dieser Arbeit wurde der Marker „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Das Auftragen von 4µl Marker ergab eine Auftrennung wie folgt:

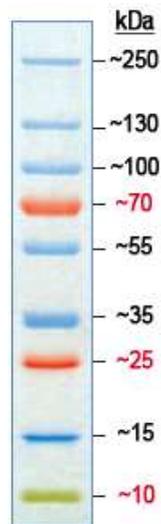


Abb. 10: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

Die Elektrophorese wurde bei 120V für ca. 1.5 Stunden durchgeführt, bis das Auslaufen der Lauffront in die Gelkammer zu erkennen war.

2.11 Blotting und Antikörperinkubation

Um die aufgetrennten Protein aus der SDS-PAGE weiterhin zu untersuchen wurde ein sogenannter Western Blot angeschlossen. Hierbei wurden die aufgetrennten Protein auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran mittels Elektrophorese übertragen.

Eine PVDF-Membran wurde in der entsprechenden Größe zugeschnitten und zunächst in 100% Methanol aktiviert. Hierbei wurde die hydrophobe Membran für wässrige Lösungen zugänglich gemacht. Im weiteren Verlauf gab man sowohl die Membran als auch das Polyacrylamidgel in den Blotting-Puffer, der auch im Anschluß verwendet wurde. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden nun mit Hilfe eines Wet-Blot-Systems (Rotiphorese® PROclamp MINI Tank-Blotting-System) auf die Membran übertragen (1 Stunde, 90V), die dann auf dieser aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften blieben und für weitere Untersuchungen zugänglich waren.

Das Abblocken der weiterhin freien Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte durch eine Block-Lösung (Tab. 2.14.5) aus Magermilchpulver und BSA (Bovines Serum Albumin). Eine Lösung aus TBS-T und Magermilchpulver wurde auch weiterhin zu Inkubation des primären Antikörpers (anti-GFP Antikörper, ab6556; Firma abcam) bei einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Daraufhin wurde der Blot 3 mal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Das Inkubieren des sekundären Antikörpers (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [F(ab')₂], Peroxidase Conjugated; Pierce, Thermo scientific: 31461) wurde bei einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T vorgenommen. Nach Inkubation des sekundären Antikörpers wusch man den Blot erneut 3 mal 10 Minuten mit TBS-T und im Anschluss 5 Minuten mit PBS. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase (HRP = engl. Horseradish peroxidase) gekoppelt, die die Oxidationsreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid (Pierce ECL western blotting substrate) katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht Chemilumineszenz, die auf einem Röntgenfilm (SuperRX Fuji Savelight glass) sichtbar gemacht werden kann. Die Lichtmenge ist hierbei proportional zur gebundenen Menge an Antikörper.

Die Inkubation der Block-Lösung, des primären und sekundären Antikörpers können sowohl über Nacht bei 4°C oder 1.5 Stunden bei Raumtemperatur vorgenommen werden.

2.12 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Bei der konfokalen Mikroskopie werden, im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, Strukturen ausserhalb der gewünschten Fokusebene unterdrückt indem Blenden im Strahlengang eingebracht werden. Das Ergebnis ist eine verbesserte Auflösung im Vergleich zum konventionellen Mikroskop. Im Falle der CLSM wird die Probe mit Hilfe eines Lasers definierter Wellenlänge abgerastert. Dies geschieht in zwei Raumrichtungen (x und y) und kann bei Bedarf auch über mehrere Ebenen erfolgen (z-Richtung).

Aufgrund der Filterung durch die Blende (Pinhole) kann die resultierende Fluoreszenz ausserhalb der Fokusebene unterdrückt werden, sodass ausschließlich Photonen einer

begrenzten Brennebene detektiert werden. Mit Hilfe des Pinhole konnte die Dicke des optischen Schnitts individuell eingestellt werden. Das Emissionslicht wurde so gefiltert, dass Wellenlängen von 505 - 550nm auf den Detektor auftrafen und schließlich als gelber Kanal sichtbar gemacht wurden. Als Objektiv der Oozytenaufnahmen wurde das Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.5 verwendet (siehe Abb. 11).

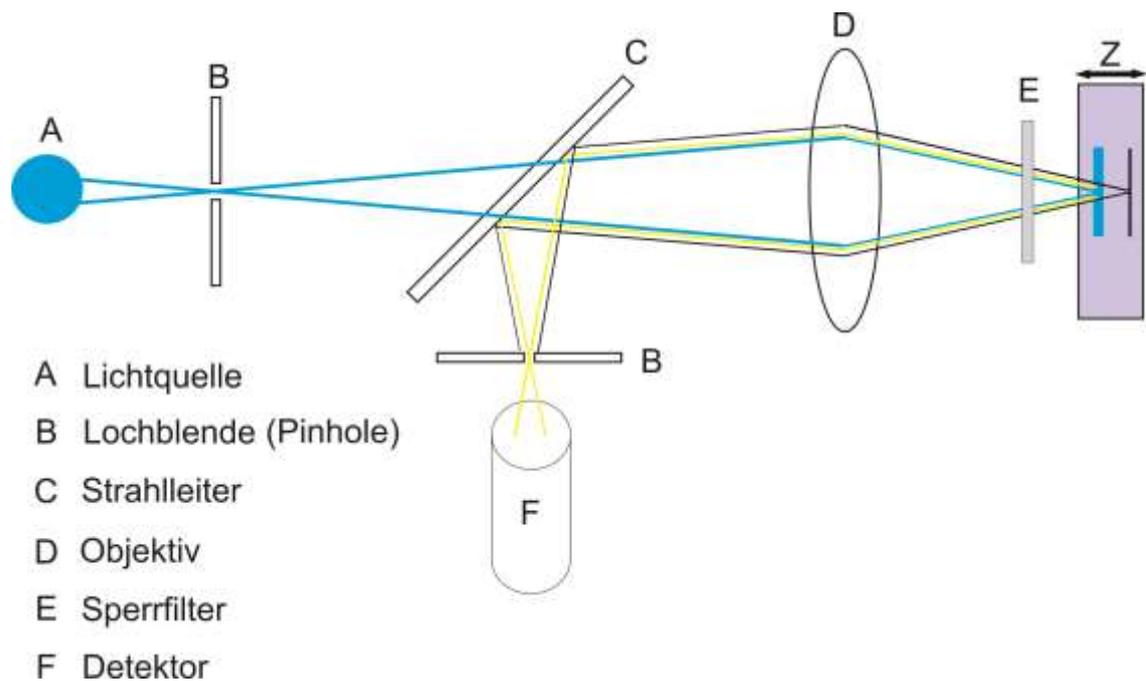


Abb. 11: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskopes

Das verwendete Mikroskop LSM 5 Pascal von Zeiss war mit einem 25 mW Argon-Laser (Lasos RMC 7812Z) ausgestattet. Um Fluorophore anzuregen emittierte der Laser Photonen definierter Wellenlänge. Zur Anregung des Yellow fluorescent protein (YFP), das ausschließlich in dieser Arbeit benutzt wurde, wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm gearbeitet.

2.13 Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie ist „ein Teilgebiet der Physiologie, das sich mit den von Lebewesen erzeugten elektrischen Strömen befasst.“ (Duden)

2.13.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC)

Die Grundsteine der TEVC-Technik wurden in der Mitte des letzten Jahrhunderts gelegt. Schon 1939 konnten Cole und Curtis bei Untersuchungen der Riesenaxone von Tintenfischen feststellen, dass mit jedem ablaufenden Aktionspotential die Permeabilität der Membran um das 40fache ansteigt (Cole and Curtis 1939). Ende der 40er und Anfang der 50er Jahren konnte dann mit der von Marmont, Cole, Hodgkin, Huxley und Katz entwickelten voltage-clamp-Methode (Cole 1949, Hodgkin, Huxley et al. 1949, Marmont 1949, Hodgkin, Huxley et al. 1952) (Spannungsklemmtechnik) nachgewiesen werden, dass die Potentialänderungen der Zelle durch einwärts fließende Na^+ -Ionen verursacht wird (Hodgkin and Katz 1949). Die Technik wurde weiterentwickelt und in den 70er Jahren etablierten Neher und Sakmann die Patch-clamp-Technik, für die sie 1991 den Nobelpreis für Medizin erhielten (Neher and Sakmann 1976, Hamill, Marty et al. 1981). Mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC) ist es möglich, elektrische Ströme über eine gesamte Zelle bei definiertem Membranpotential zu messen. Nach der Methode von Finkel und Redman (1985) werden zwei Mikroelektroden in eine Oozyte eingestochen; eine Stromelektrode (C_{el}) und eine Potentialelektrode (P_{el}). Das Membranpotential (U_m) ist definiert als die Differenz zwischen dem Badpotential und dem Potential im Zellinneren und wird über die Spannungselektrode (P_{el}) und über die Badelektrode I (B_{el} I) gemessen. Das gemessene Potential wird über einen Vorverstärker (V_v) an den Differenzverstärker (D_v) weitergegeben. Das Sollpotential (U_{com}) der Zelle kann über einen Messverstärker eingestellt werden. Wenn die Sollspannung (U_{com}) und tatsächliche Membranspannung (U_m) voneinander abweichen wird dies vom Differenzverstärker registriert. An der Stromelektrode wird daraufhin eine proportionale Spannung angelegt, die in einem Strom resultiert und somit die Sollspannung wieder

einstellt. Dieser Strom fließt über die Oozytenmembran zur zweiten Badelektrode (B_{el} II) und zurück zum Verstärker.

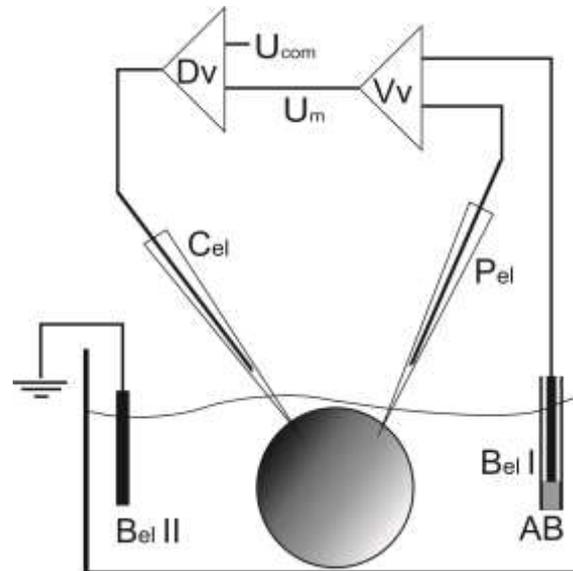


Abb. 12: Schematische Darstellung der TEVC-Technik

Am dargestellten Differenzverstärker (Dv) wird die Sollspannung (U_{com}) und die tatsächliche Membranspannung (U_m) miteinander verglichen.

Außerdem sind Vorverstärker (Vv), Stromelektrode (C_{el}), Potentialelektrode (P_{el}) und die beiden Badeelektroden B_{el} I und B_{el} II dargestellt, wobei B_{el} I über eine Agarbrücke (AB) mit dem, die Oozyte umgebenden, Medium verbunden ist.

2.13.2 Elektroden

Sowohl die Spannungs- als auch die Stromelektrode wurden bei der TEVC in die Zelle eingestochen, während sich die beiden Badeelektroden (B_{el} I und II) im umgebenden Bad ausserhalb der Oozyte befanden. Als metallischer Leiter aller Elektroden wurde ein elektrolytisch chlorierter Silberdraht gewählt. Die Referenzelektrode zur Spannungselektrode (Badelektrode I) befand sich in einem mit 3M KCl gefüllten Schlauch, der außerdem mit einem Pfropfen aus 2% Agarose in 3M KCl verschlossen wurde um einen direkten Kontakt zwischen Elektrode und Badlösung zu verhindern. Dies ist notwendig um eine Veränderung des Grenzflächenpotentials an der Badelektrode bei

Material und Methoden

Schwankungen der Cl⁻-Konzentration zu vermeiden. Die Referenzelektrode zur Stromelektrode (Badelektrode II) wurde direkt in die Badlösung gegeben.

Die verwendeten Kapillaren aus Borosilikatglas ($\varnothing_{\text{ausßen}} = 1.5\text{mm}$; Wandstärke: 0.188mm; Hilgenberg) für die Einstichelektroden wurden an einem vertikalen Puller in zwei Zügen ausgezogen (Tab. 10). Um die elektrische Leitfähigkeit zu gewährleisten wurden die ausgezogenen Kapillaren mit 0.1% Agarose in 3M KCl-Lösung befüllt. Ihr elektrischer Widerstand lag zwischen 0.3M Ω und 1.5M Ω .

Tab. 10: Erläuterung der Heizleistung zum Ziehen von Kapillaren

	Heizleistung
Zug 1	80.1
Zug 2	58.1
Heizleistung 100 = 2.5V	

2.13.3 Konventionen

Das Membranpotential ergibt sich aus der Differenz des Potentials des extrazellulären Bereichs und dem Potential des Zellinneren, wobei das Potential des extrazellulären Bereichs per Definition Null ist. Sowohl der Ausstrom von negativen Ladungen aus der Zelle als auch der Einstrom von positiven Ladungen in die Zellen wird als negativer Strom dargestellt. Infolgedessen wird der Fluss von positiven Ladungen aus der Zelle und negativen Ladungen in die Zelle als positiver Strom definiert.

2.13.4 Versuchsaufbau der Oozytenmessungen

Die Messapparatur, bzw. deren mechanooptischer Teil, wurde auf einem Tisch unter einem Faraday'schen Käfig platziert. Die Oozyte wurde mittels zweier halbiertes

Schlauchstücke, die auf den Boden der Badkammer geklebt wurden (Abb. 13), an Ort und Stelle gehalten. Durch die Unterbrechung des Schlauchstückes wurde eine optimale Perfusion gewährleistet.



Abb. 13: Darstellung der halbierten Schlauchstücke in der Badkammer.

Die Pfeile markieren den Weg der perfundierenden Lösung.

Als Reservoir des Perfusionssystems dienten 50ml-Spritzen, in die die benötigten Messlösungen eingefüllt wurden. Das Absaugen der Flüssigkeit aus dem nachgeschalteten Reservoir der Badkammer erfolgte durch eine Vakuumpumpe. Die Geschwindigkeit der perfundierenden Lösung wurde durch die Schwerkraft bedingt und lief mit etwa 2ml/min durch die Badkammer. Die benötigten Strom- und Spannungselektroden wurden mittels Mikromanipulatoren (MM33, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG) arretiert. Um Störungen der Messungen zu vermeiden wurden alle leitenden Bestandteile der Messapparatur geerdet. Stromantworten von in der Oozytenmembran eingebetteten ChR2-Kanälen wurden über den Vorverstärker in den Messverstärker (Turbo TEC-10CX, npi electronic GmbH, Tamm) geleitet. Um die analogen Signale des Messverstärkers für den Messrechner nutzbar zu machen wurden sie durch einen AD/DA-Wandler (INT-20X Breakout Box, npi electronic GmbH, Tamm) digitalisiert. Die Spannungspuls-Protokolle wurden mit der Software Cellworks (NPI electronic GmbH, Tamm) erstellt und mit OriginPro (OriginLab Corporation) ausgewertet.

2.13.5 Messung der Ströme

2.13.5.1 Lichtaktivierte Ströme

Um die Ganzzellströme der Oozyten zu messen wurden variable Protokolle angewandt. Die resultierenden lichtaktivierten Ströme von Chr2 wurden bei Ablaufen des Protokolls aufgezeichnet, dargestellt in Abb. 14. Bei Beginn und Ende der Messung beträgt die Haltespannung der Zelle -40mV. Diese wurde für insgesamt 12 Sekunden auf -100mV verringert. In dieser Zeit wurden zwei Lichtpulse von je 2 Sekunden ausgelöst, unterbrochen von einem 8-Sekunden-Zeitintervall. Die Lichtintensität betrug 6.8 mW/mm²

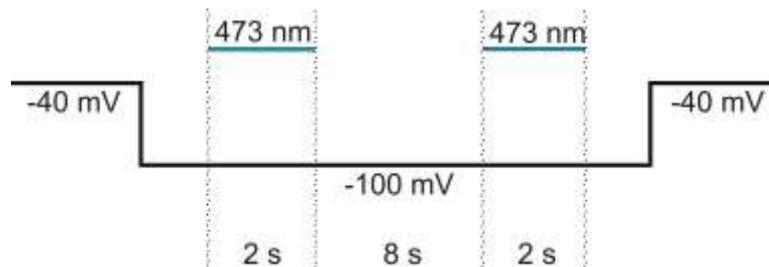


Abb. 14: Protokoll zur Aufzeichnung von lichtaktivierten Strömen von Chr2

1. und 3. Haltespannung: -40mV
2. Haltespannung: -100mV; Blaue Balken kennzeichnen die Belichtung der Zelle mit $\lambda=473\text{nm}$ (6.8mW/mm²)

Die verwendeten Lösungen für dieses und das folgende Protokoll sind in Tabelle 2.14.6 zusammengefasst.

2.13.5.2 Lichtunabhängige Ströme

Zur Messung der Dunkelströme bei unterschiedlichen Lösungen wurde die Membranspannung zunächst auf -50mV eingestellt. Währenddessen perfundierte man die Zelle mit Lösung 1. Sobald sich ein stabiler Strom eingestellt hatte wurde manuell ein Lichtpuls von 473nm ausgelöst. Im Anschluss wurde ein sogenannter IV durchgeführt -

ein Strom-Spannungsprotokoll, bei dem abhängig von der angelegten Membranspannung die resultierenden Ströme aufgezeichnet wurden. Der erste und letzte Schritt des Strom-Spannungsprotokolls bestand aus einer konstanten Spannung von -40mV. Die angelegte Spannung wurde dann auf +30mV erhöht und erniedrigte sich anschließend in neun Schritten auf -130mV. Bei jedem Schritt wurde die Membranspannung um 20mV verringert. Anschließend wechselte man auf Lösung 2 wiederum bei einer Membranspannung von -50mV und gab nach Einpendeln des resultierenden Stromes einen Lichtpuls. Nach dem wiederum folgenden Strom-Spannungsprotokoll wechselte man erneut die Lösung:

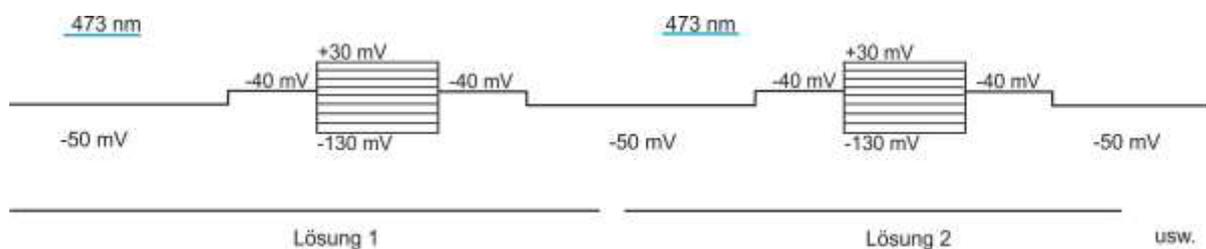


Abb. 15: Protokoll zur Aufzeichnung der lichtunabhängigen Dunkelströme von Chr2

Während der 1. Haltespannung von -50mV wird die Zelle mit Lösung 1 perfundiert. Das Erhöhen der Haltespannung auf -40mV kennzeichnet den Beginn des Strom-Spannungsdiagrammes (IV), mit dem die Zelle zunächst auf +30mV geklemmt wird. Die Spannung wird in jedem Durchlauf um 20mV erniedrigt bis -130mV erreicht sind. Nach Änderung der Haltespannung auf erneut -50mV wird die Zelle mit Lösung 2 perfundiert. Die blauen Balken kennzeichnen die Belichtung der Zelle bei $\lambda = 473\text{nm}$ ($6.8\text{mW}/\text{mm}^2$).

2.13.6 Berechnung des Leitwertes G

Bei Änderung der angelegten Spannung (ΔU) an der Oozytenmembran erfolgt eine Änderung des resultierenden Stromes (ΔI). Aus den Quotienten kann der elektrische Leitwert (=Leitfähigkeit) berechnet werden. Die Leitfähigkeit G ist definiert als der Kehrwert des Widerstandes R und wird in der Einheit Siemens angegeben. Somit folgt:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{\Delta U}$$

2.14 Lösungen

2.14.1 Bakterienkultur

Reagens	LB-Medium	SOC-Medium
Trypton	10g/L	20g/L
Hefeextrakt	5g/L	5g/L
NaCl	10g/L	0.5g/L
MgSO ₄	--	5g/L
in ddH ₂ O		

2.14.2 Plasmidisolierung

TE Puffer	
Tris-HCl pH 7.5	10mM
Na-EDTA	1mM
in ddH ₂ O	

TENS Puffer	
TE Puffer	9.4ml
10% SDS	500µl
NaOH, 10M	100µl
RNase	200µg/ml

Material und Methoden

2.14.3 Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer (5x)	
EDTA	100mM
Glycerin	50%
Xylencyanol	0.25%
Bromphenolblau	0.25%
in <i>ddH</i> ₂ O	

TAE (25x)	
Tris	121 g
Essigsäure (96%)	28.5ml
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	18.6 g
<i>ddH</i> ₂ O ad 1000ml	

Glyoxal-Reaktions-Lösung	
DMSO 100%	750µl
Glyoxal-Stock 40%; 8.8M	170µl
TMAP 0.2M; pH 7	75µl

Material und Methoden

RNA-Probenpuffer (2x)	
Formamid	95%
SDS	0.025%
Bromphenolbalau	0.025%
Xylencyanol FF	0.025%
EDTA	0.5mM
<i>ddH₂O</i> ad 100%	

MEN (10x)	
MOPS	200mM
Na-Acetat	50mM
EDTA	5mM
pH 7.0 mit NaOH; lichtgeschützt aufbewahren	

Material und Methoden

2.14.4 Lösungen für Oozyten

	ND 96 + Ca ²⁺	ND 96 - Ca ²⁺
NaCl	96mM	96mM
KCl	2mM	2mM
MgCl ₂	1mM	1mM
CaCl ₂	1mM	---
HEPES	10mM	10mM
Gentamycin	50µg/ml	---
in ddH ₂ O; pH 7.4		
220mosm/kg mit D-Sorbitol einstellen		

2.14.5 Proteinbiochemie

Reagens	Upper Tris (4x)	Lower Tris (4x)
Tris-HCl	1.5M pH 8.8	0.5M pH 6.8
SDS	0.4%	0.4%

SDS-Probenpuffer (6x)	
Tris	250mM
SDS	8%v/v
Bromphenolblau	0.008%v/v
β-Mercaptoethanol	20% v/v
pH 6.8 mit HCl	

Material und Methoden

Laufpuffer SDS-PAGE (10x)	
Tris	250mM
Glycin	192mM
SDS	0,1%

Blot-Puffer	
Tris	25mM
Glycin	130mM
Methanol	20%

TBS-T	
Tris	50mM
NaCl	150mM
Tween 20	0.05%v/v
pH7.5 mit HCl	

PBS-Puffer (1x)	
NaCl	144mM
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	10mM
KCL	2.7mM
KH ₂ PO ₄	1.8mM
pH 7.3 - 7.4	

Material und Methoden

Block Lösung	
Magermilchpulver	5%
BSA	3%
in TBS-T	

2.14.6 Lösungen für die Elektrophysiologie

Angaben in mM

	ORI pH 7.6	Gua ⁺ pH 10	Gua ⁺ pH 8	NMG pH 10	Na pH 10
KCl	5	--	--	--	--
NaCl	110	--	--	--	115
BaCl ₂	2	2	2	2	2
MgCl ₂	1	1	1	1	1
NMG	--	s.u.	s.u.	115	
Gua	--	115	115	--	--
HEPES	5	--	--	--	--
Tris	--	--	5	--	--
CAPS	--	10	--	5	5
CaCl ₂	--	--	--	--	--
pH eingestellt mit	HCl	NMG	NMG	HCl	NaOH

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl und Mutation von Aminosäuren

Aus bereits veröffentlichten Arbeiten ist bekannt, dass der Austausch einer Aminosäure (AS) in der Sequenz von Channelrhodopsin 2 (ChR2) zu erheblichen Veränderungen des Kanals führen kann. Die gravierendsten Modifikation erbrachte die Mutation eines Cysteins (C) an Position 128 und die einer Asparaginsäure (D) an Position 156 (Berndt, Yizhar et al. 2009, Bamann, Gueta et al. 2010, Nack, Radu et al. 2010). Auf Grundlage der Arbeit von Suzuki 2003 (Suzuki, Yamasaki et al. 2003) stehen beide AS in Kontakt mit dem Chromophor *all-trans*-Retinal. Die große phänotypische Veränderung des Kanals lässt darauf schließen, dass die Kontaktpunkte mit dem Kofaktor kritische Stellen des Proteins darstellen. Infolge dieser Grundlage wurden entsprechende AS in der Sequenz von Chop-2 ausgewählt und zielgerichtet verändert.

Die Aminosäure Threonin (T) an Position 159 befindet sich in Transmembranhelix 4. Bezüglich des Aminosäuresequenzvergleichs von Suzuki et al. steht Threonin in Kontakt mit dem β -Ionon-Ringsystem des *all-trans*-Retinals. Es ist möglich, dass der aromatische Charakter von Tyrosin (Y), Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) zu schwerwiegenden Veränderungen wie z.B. der elektrischen Leitfähigkeit, der Ionenselektivität oder des Schließverhaltens im Holoprotein (= Protein + Kofaktor) führen kann.

Die AS Threonin 159 wurde mit Hilfe der gezielten *in-vitro* Mutagenese zu den oben genannten aromatischen Aminosäuren modifiziert. Des Weiteren wurde die nichtaromatische AS Cystein (C) eingefügt. Ziel war es die Diskrepanz des Phänotyps zwischen aromatischer und nichtaromatischer AS zu untersuchen und zu charakterisieren. Als Grundlage der gezielten *in-vitro* Mutagenese diente ein auf 310 AS verkürztes und mit YFP fusioniertes Protein von ChR2 (ChR2-WT::YFP). Dieses diente als Kontrolle bei den durchgeführten Messungen.

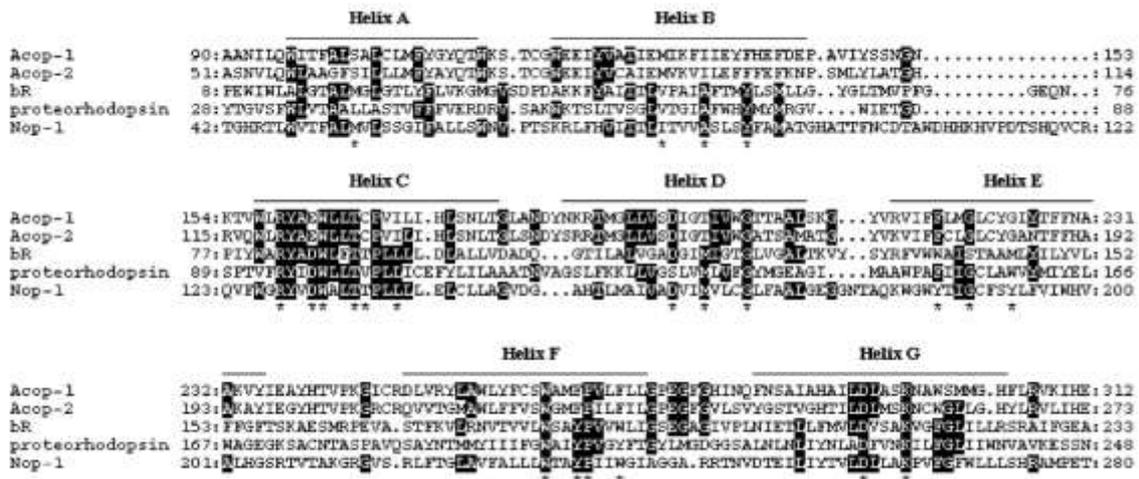


Abb. 16: Proteinalignment von Chr1 (=Acop1), Chr2 (=Acop2), BR, Proteorhodopsin und Nop-1
 Transmembranhelices sind durch die horizontale Linien markiert, Aminosäuren, die mit dem Chromophor all-*trans*-Retinal in Kontakt stehen, sind durch * markiert. Aminosäuren, die in mindestens drei der Sequenzen konserviert sind, sind schwarz unterlegt. Modifiziert nach Suzuki et al. 2003

3.2 Retinalabhängige Expression von Channelrhodopsin-2 Wildtyp (Chr2-WT::YFP) und dessen Mutanten

Nach durchgeführter *in-vitro* Mutagenese wurde die DNA auf das Vorhandensein der Mutation durch Sequenzierung überprüft (Firma: GATC). Nach Injektion der mRNA wurde der Hälfte der injizierten Oozyten Retinal in das Inkubationsmedium zugesetzt. Da Oozyten von *Xenopus laevis* bereits Retinal enthalten, war eine vollkommen retinalfreie Inkubation nicht gegeben. Im weiteren Verlauf konnten die exprimierenden Oozyten durch elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Methoden untersucht werden. Da Chr2 auch für Ca^{2+} permeabel ist, wurden die eingesetzten Lösungen ausschließlich ohne CaCl_2 angesetzt und durch BaCl_2 ersetzt. Durch das Einströmen von Ca^{2+} werden oozyteninterne Ca^{2+} -aktivierte Cl-Kanäle aktiviert, die die elektrophysiologischen Messungen verfälschen würden.

3.2.1 ChR2-WT::YFP

ChR2-WT exprimierende Oozyten zeigten bei elektrophysiologischen Messungen sowohl mit als auch ohne zugesetztes Retinal einen lichtaktivierten Kationenstrom. Zellen, die nach Injektion in retinalfreiem Medium inkubiert wurden, wiesen eine Stromamplitude von ca. 250nA auf. Zellen deren Medium 10 μ M all-*trans*-Retinal beigemischt wurde zeigten einen lichtaktivierten Strom von ca. 2 μ A auf (Abb. 17). Durch das ausschließlich endogen vorhandene Retinal kann nur ein kleiner Bruchteil der gebildeten Proteine das Chromophor binden und so einen funktionsfähigen Kanal ausbilden, was sich in den lichtinduzierten Strömen widerspiegelte (Abb. 17).

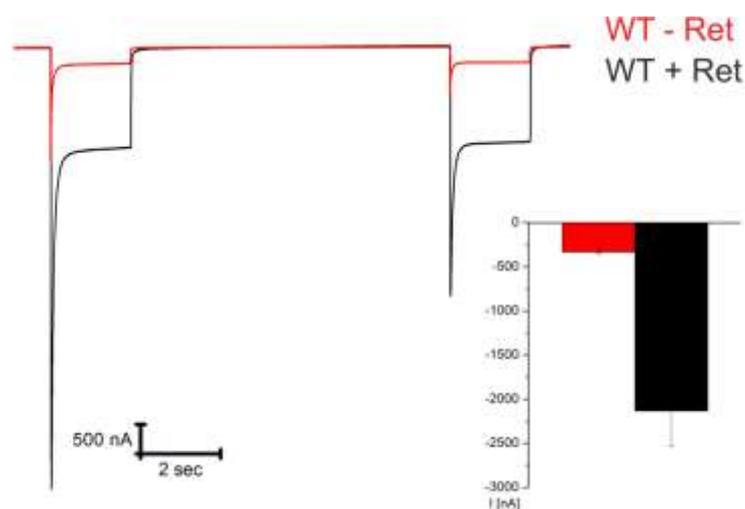


Abb. 17: Lichtaktivierte Ströme von ChR2-WT-injizierten Oozyten

Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6.

Da das Gelb-fluoreszierende Protein (Yellow-fluorescent-protein = YFP) direkt mit ChR2 fusioniert ist und nicht als separates Protein in den Zellen gebildet wird, war eine direkt proportionale Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Expressionsstärke anzunehmen.



Abb. 18: Fluoreszenzen von Chr2-WT::YFP-injizierten Oozyten

WT-ChR2::YFP injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Oozyten inkubiert in retinalhaltiger Lösung zeigen eine stark erhöhte Fluoreszenz. Der schwarze Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

Die geringen Fluoreszenzintensitäten von Chr2-WT::YFP - Retinal deuteten darauf hin, dass Chr2 ohne gebundenes Retinal nicht synthetisiert, oder das neu gebildete Protein nach der Synthese wieder abgebaut wurde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Zellen, denen nach der Injektion kein Retinal zugesetzt wurde, über Nacht in Gegenwart von Retinal inkubiert. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten nach ca. 15 Stunden Inkubation (Abb. 19).

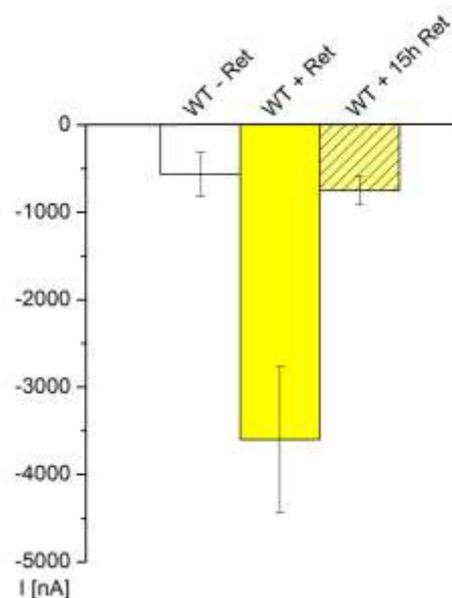


Abb. 19: Lichtaktivierte Ströme bei Chr2-WT-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation

Mit 20ng WT-mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert und bei einer Haltespannung von -100mV geklemmt.

„WT-Ret“: Oozyten wurden ohne zusätzliches Retinal inkubiert.

„WT+Ret“: Der Inkubationslösung wurde Retinal bei einer Endkonzentration von 10µM zugesetzt.

„WT+15h Ret“: Injizierte Oozyten wurden zunächst ohne zusätzliches Retinal inkubiert. Nach drei Tagen inkubation wurde dem Inkubationsmedium dieser Zellen über Nacht 10µM Retinal zugesetzt und am folgenden Morgen gemessen.

Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert bei -100mV; \pm SD; $n \geq 3$

Ergebnisse

Nach der Inkubation über Nacht konnte zwar eine geringe Zunahme des lichtaktivierten Stromes beobachtet werden; diese war auf *de-novo*-Proteinsynthese zurückzuführen. Dennoch wurde die Stromgröße der Zellen mit direkt nach der Injektion zugesetztem Retinal nicht erreicht.

3.2.2. ChR2-Volllänge

Turner et al. (Turner, Chittiboyina et al. 2009) untersuchten die Rolle des C-Terminus' von BR. Hierfür wurde das Protein von 248 AS auf 237 AS (TGA I) bzw. 228 AS (TGA II) verkürzt und die Membranfraktion aus *Halobacterium salinarum* isoliert. Es konnte festgestellt werden, dass in beiden Fällen die Stabilität von BR signifikant reduziert war; Im Besonderen wies TGA II eine erhöhte Denaturierungsrate auf.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein trunkiertes ChR2 eingesetzt, das mit 310 AS um 427 AS kürzer ist als ChR2-Volllänge mit 737 AS. Die Fluoreszenzintensitäten fielen ohne Retinalsupplementation des Inkubationsmediums geringer aus, unabhängig von der Länge des C-Terminus' (Abb. 20).

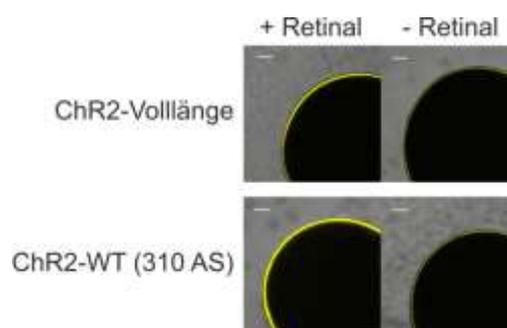


Abb. 20: Fluoreszenzen von ChR2-Volllänge::YFP- und ChR2-WT::YFP-injizierten Oozyten

ChR2-Volllänge::YFP- und ChR2-WT::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Oozyten inkubiert in retinalhaltiger Lösung zeigen eine stark erhöhte Fluoreszenz. Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

Ergebnisse

Ebenso konnte keine Zunahme des Stromes bei Retinalinkubation über Nacht festgestellt werden (Abb. 21).

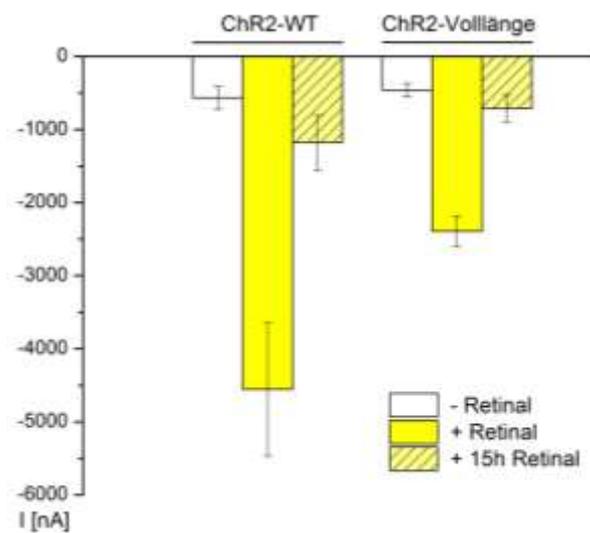


Abb. 21: Balkendiagramm der lichtinduzierten Ströme von ChR2-WT und ChR2-Volllänge

Mit 20ng mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert, bei einer Spannung von -100mV. Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm SD; $n \geq 3$.

3.2.2 Retinalunabhängige Expression von ChR2-Mutanten

3.2.2.1 ChR2-T159Y::YFP

ChR2-T159Y-injizierten Zellen wurden zur Hälfte mit zusätzlichem Retinal inkubiert und deren Expression anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie und TEVC untersucht.

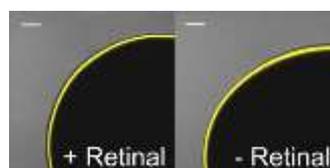


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159Y::YFP

ChR2-T159Y::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100 μ m.

Abb. 22 macht deutlich, dass, im Gegensatz zu ChR2-WT-injizierten Zellen, äquivalent starke Fluoreszenzintensitäten unabhängig vom Inkubationsmedium vorliegen. Im

Gegensatz dazu zeigten elektrophysiologischen Untersuchungen eine starke Diskrepanz in den Stromamplituden, abhängig vom Inkubationsmedium (Abb. 23).

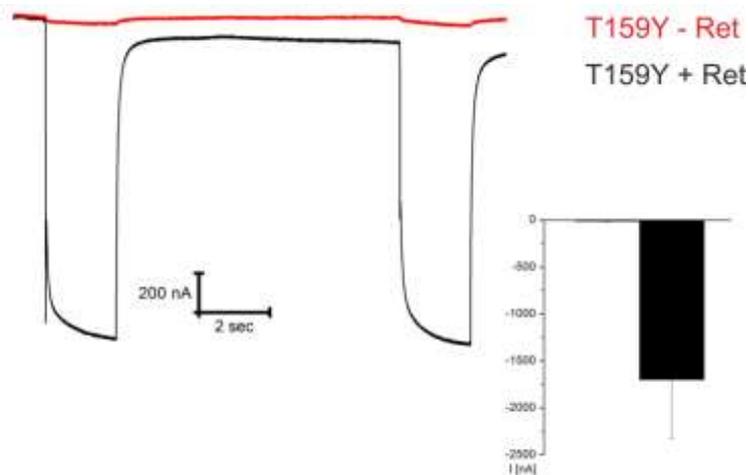


Abb. 23: Lichtaktivierte Ströme von Chr2-T159Y::YFP

- Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6.
- Arithmetisches Mittel der vorgenommenen Messungen; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; $n \geq 3$.

Bei Inkubation in retinalsupplementierter Lösung (Abb 23a, schwarze Spur) war der deutlich veränderte Stromverlauf mit, de facto, nicht vorhandenem Peakstom auffällig. Der wildtypische Peakstrom ist etwa 4 mal größer als das anschließende stationäre Stromplateau. Dies ist bei T159Y nicht zu beobachten; Peak- und stationärer Strom weisen in etwa die gleiche Größe auf.

Ebenfalls in Abbildung 23a ist der deutliche Unterschied hinsichtlich der Größe der lichtinduzierten Ströme zwischen den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (+Retinal / -Retinal) zu erkennen. Unter retinalfreien Inkubationsbedingungen betrug der lichtinduzierte Strom $-31 \pm 8.94\text{nA}$, bei Zugabe von $10\mu\text{M}$ all-*trans*-Retinal erhöhte sich dieser um das 40 - 50fache auf ca. -1400nA . Bei WT-injizierten Zellen betrug die Zunahme um das ca. 5-10fache.

Ergebnisse

Analog zu ChR2-WT::YFP wurde Retinal zu bisher retinalfrei inkubierten Zellen gegeben und am folgenden Tag die Stromamplituden ermittelt (Abb. 24).

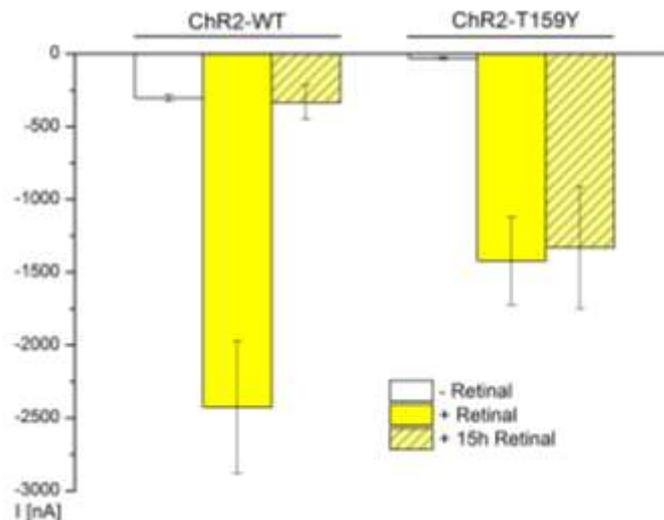


Abb. 24: Lichtaktivierte Ströme bei ChR2-T159Y-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation

Mit 20ng mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert und bei einer Spannung von -100mV geklemmt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert bei -100mV; $n \geq 3 \pm SD$

Im Gegensatz zu ChR2-WT::YFP- injizierten Zellen war die Erhöhung der Stromamplitude bei ChR2-T159Y::YFP injizierten Zellen deutlich. Sowohl Fluoreszenzintensitäten als auch die Inkubation über Nacht weisen auf ein korrekt in der Membran gefaltetes, funktionsloses Protein hin.

Des Weiteren wurden injizierte Zellen, die zuvor ohne zusätzliches Retinal inkubiert wurden 15 Minuten lang mit einer retinalhaltigen Lösung perfundiert. Während der Aufzeichnung gab man Lichtpulse bei einer Frequenz von einem Lichtpuls pro Minute.

Abb. 25a zeigt den lichtaktivierten Strom bei -100mV vor (oben) und nach (unten) Retinalperfusion. Die Standard-Lösung enthielt Retinal in einer Endkonzentration von 100 μ M. Die absolute Zunahme des lichtaktivierten Stroms wurde gemittelt und prozentual ausgedrückt (Abb. 25b). Bei T159Y-injizierten Oozyten betrug die Zunahme ca. 400%, bei WT-injizierten Oozyten konnte eine marginale Veränderung festgestellt

werden. Die Stromzunahme der T159Y-injizierten Oozyten ist ein weiteres Indiz für die Stabilisierung des Apoproteins aufgrund der eingefügten Mutation

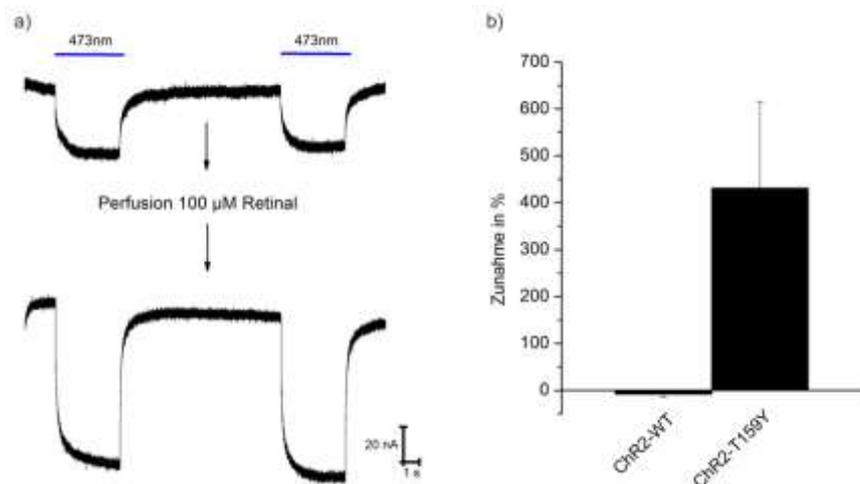


Abb. 25: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159Y

X. laevis injizierte Oozyten wurden mit Ori pH 7.6 perfundiert. Bei einer Spannung von -100mV wurden zwei Lichtpulse von 473nm gegeben. Die anschließende Spannung betrug -50mV bei Perfusion mit retinalhaltiger Ori pH 7.6 (100µM Retinal). Während der 15minütigen Perfusion wurden je Minute ein Lichtpuls gegeben und die lichtaktivierten Ströme anschließend erneut bei -100mV aufgezeichnet.

a) Exemplarische Darstellung einer Messung.

b) Arithmetischer Mittelwert der Stromzunahme von ChR2-WT und ChR2-T159Y in Prozent. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, $n \geq 3$.

3.2.2.2 ChR2-T159W::YFP

Die injizierten Oozyten wurden wie schon beschrieben mit und ohne Zugabe von 10µM all-*trans*-Retinal nach der Injektion inkubiert und durch elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Methoden untersucht.

Die lichtaktivierten Ströme bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal sind mit -5.8 ± 1.92 nA extrem vermindert, was, analog zu T159Y, auf eine verminderte Affinität zu Retinal hindeutet (Abb. 26a). Bei Inkubationsbedingungen mit zugesetztem Retinal konnten Stromamplituden von 40-50facher Größe festgestellt werden.

Ergebnisse

Die der Belichtung folgende Stromantwort bei retinalhaltigen Inkubationsbedingungen, wies einen für diese Mutante charakteristischen Verlauf auf, der sich von dem der WT-injizierten Zellen hinsichtlich der Stromgröße, des Verhältnisses $I_{\text{Peak}}/I_{\text{stationär}}$ und des Schließverhaltens kontrastierte.

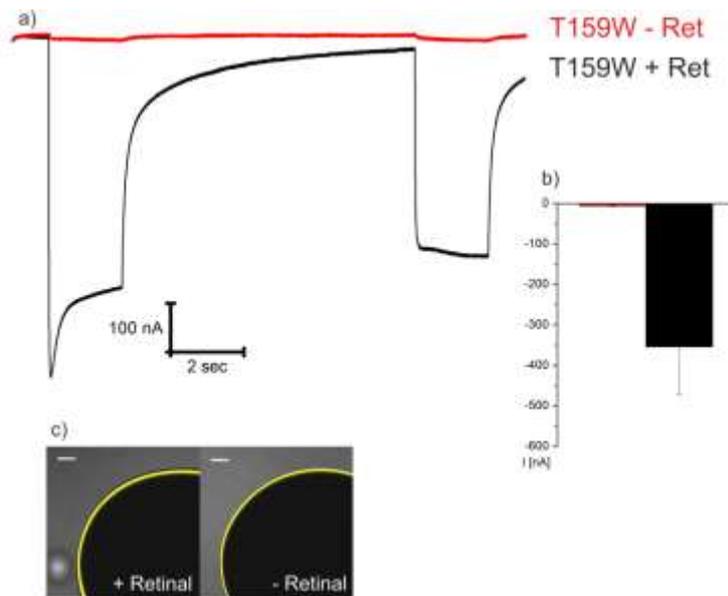


Abb. 26: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159W::YFP

a) Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6.

b) Arithmetisches Mittel der vorgenommenen Messungen; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; $n \geq 3$.

c) ChR2-T159W::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100 μm

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war, analog zu ChR2-T159Y::YFP, kein klarer Unterschied zwischen den Inkubationsbedingungen erkennbar. In beiden Fällen konnte ein starkes Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abb. 26), wohingegen das Signal in ChR2-WT::YFP injizierten Zellen stark voneinander abwich.

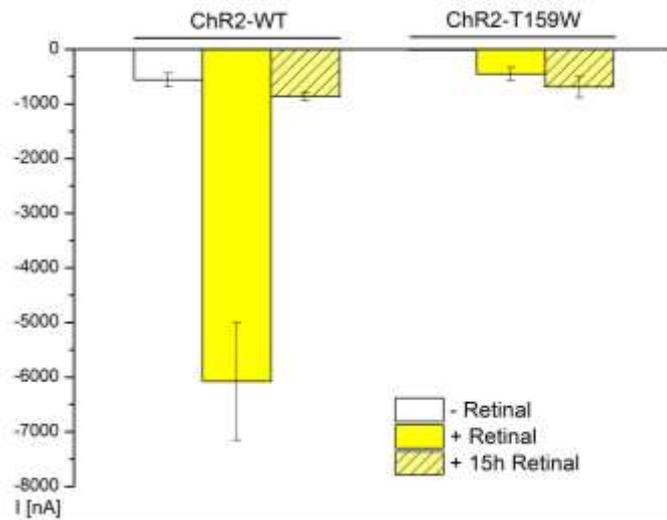


Abb. 27: Lichtaktivierte Ströme bei ChR2-T159W-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation

Mit 20ng mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert, bei einer Spannung von -100mV. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert bei -100mV; $n \geq 3 \pm SD$

Die Zugabe von Retinal und dessen Inkubation über Nacht erbrachte eine enorme Steigerung des lichtaktivierten Stromes, die auch schon in Abschnitt 3.2.2.1 beobachtet werden konnte (Abb. 27). Die, über diesen Wert hinausgehende Zunahme konnte bei sämtlichen Injektionen gemessen werden, eine Signifikanz konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Auch bei dieser Mutante wurde eine Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation durchgeführt: die Inkubation von retinalfreien Oozyten innerhalb von 15 Minuten und der zeitliche Verlauf dieser Messung

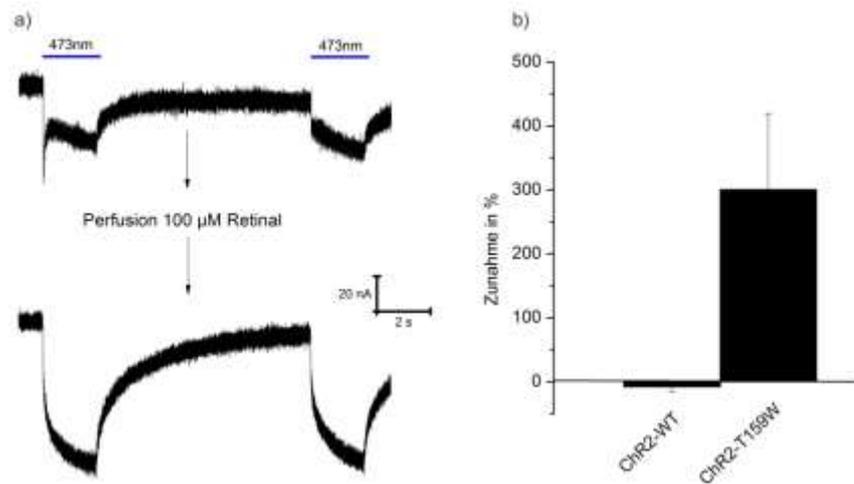


Abb. 28: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159W

X. laevis injizierte Oozyten wurden mit Ori pH 7.6 perfundiert. Bei einer Spannung von -100mV wurden zwei Lichtpulse von 473nm gegeben. Die anschließende Spannung betrug -50mV bei Perfusion mit retinalhaltiger Ori pH 7.6 (100μM Retinal). Während der 15minütigen Perfusion wurden je Minute ein Lichtpuls gegeben und die lichtaktivierten Ströme anschließend erneut bei -100mV aufgezeichnet.

a) Exemplarische Darstellung einer Messung.

b) Arithmetischer Mittelwert der Stromzunahme von ChR2-WT und ChR2-T159W in Prozent. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, $n \geq 3$.

Wie schon im vorherigen Abschnitt verdeutlicht, erkennt man im unteren Teil der Abbildung, d.h. nach Retinalperfusion, eine Zunahme der Stromantwort (Abb. 28a). Diese wurde ebenfalls im prozentualen Verhältnis zum Ausgangsstrom ausgewertet und zeigte eine Steigerung um ca. 300% (Abb. 28b)

3.2.2.3 ChR2-T159F::YFP

Im Gegensatz zu T159W und T159Y konnten nach Injektion von T159F::YFP-mRNA unter retinalfreien Bedingungen etwa -150nA gemessen werden; bei retinalsupplementierter Inkubation war ein erhöhter Strom von -400nA festzustellen.

Die Stromamplituden von ChR2-T159F-injizierten Zellen fielen signifikant geringer aus, verglichen zu ChR2-WT-injizierten Oozyten (Abb. 29, Abb. 30). Außerdem unterschieden sich die Ströme hinsichtlich des Verhältnisses $I_{\text{Peak}}/I_{\text{stationär}}$. Die Fluoreszenzintensitäten

Ergebnisse

von ChR2-T159F wichen, unabhängig vom Inkubationsmedium, kaum voneinander ab (Abb. 29).

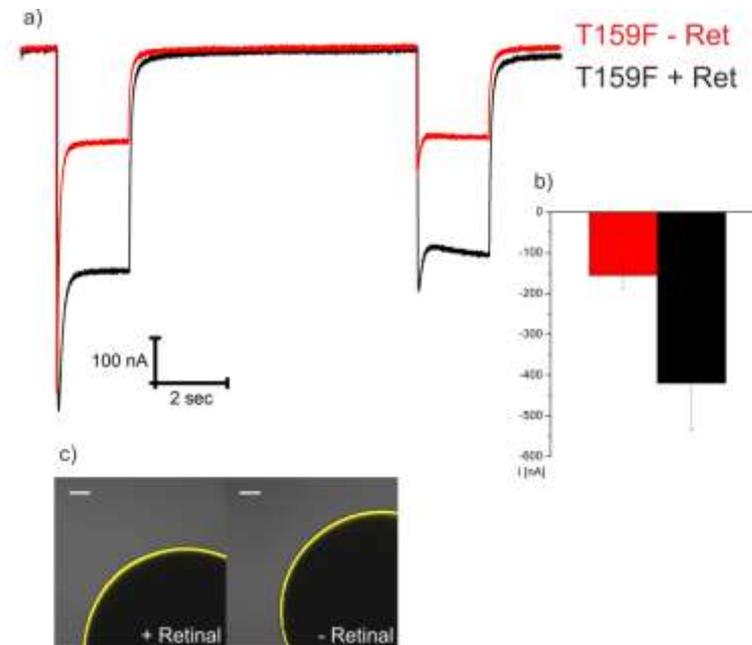


Abb. 29: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159F::YFP

a) Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung $\text{pH}7.6$.

b) Arithmetisches Mittel der vorgenommenen Messungen; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; $n \geq 3$.

c) ChR2-T159F::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von $100\mu\text{m}$.

Analog zu den beiden vorherigen Abschnitten wurde auch hier eine deutliche Stromzunahme nach einer Inkubationszeit von ca. 15 Stunden festgestellt (Abb. 30).

Ergebnisse

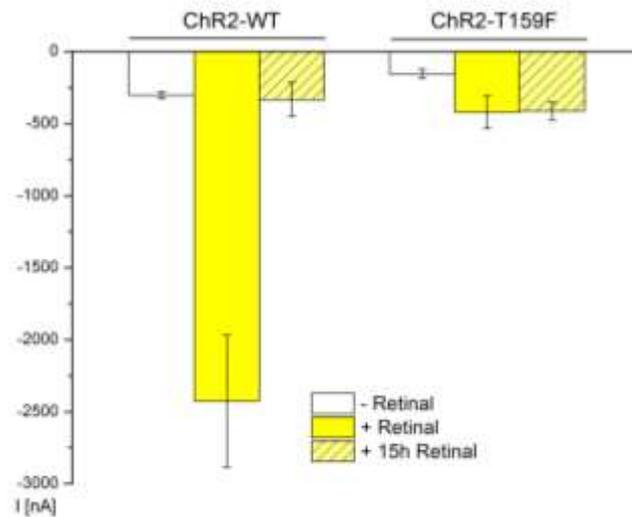


Abb. 30: Lichtaktivierte Ströme bei T159F-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation

Mit 20ng mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert, bei einer Spannung von -100mV. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert bei -100mV; $n \geq 3 \pm SD$.

Nach 15-minütiger Perfusion mit retinalhaltiger Lösung konnte übereinstimmend mit T159Y- und T159W-injizierten Zellen eine Zunahme des lichtabhängigen Stromes festgestellt werden. Prozentual betrachtet ergab diese eine Erhöhung von ca. 100% relativ zur Ausgangsgröße (Abb. 31).

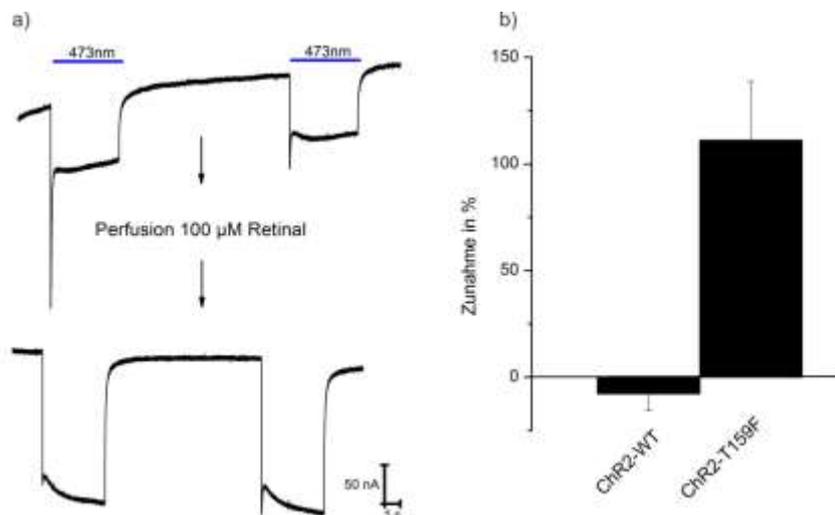


Abb. 31: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159F

X. laevis injizierte Oozyten wurden mit ORi pH 7.6 perfundiert. Bei einer Spannung von -100mV wurden zwei Lichtpulse von 473nm gegeben. Die anschließende Spannung betrug -50mV bei Perfusion mit retinalhaltiger ORi pH 7.6 (100μM Retinal). Während der 15minütigen Perfusion wurden je Minute ein Lichtpuls gegeben und die lichtaktivierten Ströme anschließend erneut bei -100mV aufgezeichnet.

a) Exemplarische Darstellung einer Messung.

b) Arithmetischer Mittelwert der Stromzunahme von ChR2-WT und ChR2-T159F in Prozent. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, $n \geq 3$.

3.2.2.4 ChR2-T159C::YFP

Zur Überprüfung der Hypothese, dass ausschließlich aromatische Aminosäuren an Position 159 eine Stabilität des ChR2-Proteins verursachen, wurde die nichtaromatische Aminosäure Cystein an diese Position eingefügt.

Die Mutante T159C erzeugte lichtaktivierte Ströme, deren Verlauf WT-Strömen ähnelte. Berndt et al (2011) beschrieben die Stromgröße als ca. 10x größer als WT-induzierte Ströme; dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

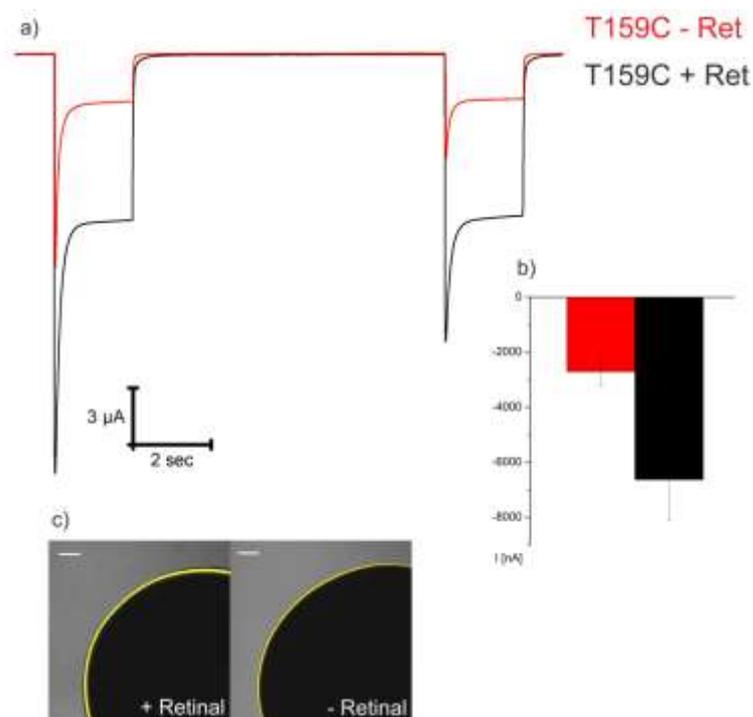


Abb. 32: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159C::YFP

a) Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6.

b) Arithmetisches Mittel der vorgenommenen Messungen; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; $n \geq 3$.

c) ChR2-T159C::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von $100\mu\text{m}$.

Vergleichbar mit dem Austausch durch eine aromatische Aminosäure zeigten die injizierten Oozyten auch ohne den Zusatz von Retinal eine starke Fluoreszenz. Die Inkubation über Nacht resultierte in einer Erhöhung der Stromamplitude, die Stromgröße der direkt nach der Injektion in retinalhaltiger Lösung inkubierten Oozyten konnte nicht erreicht werden (Abb. 33).

Ergebnisse

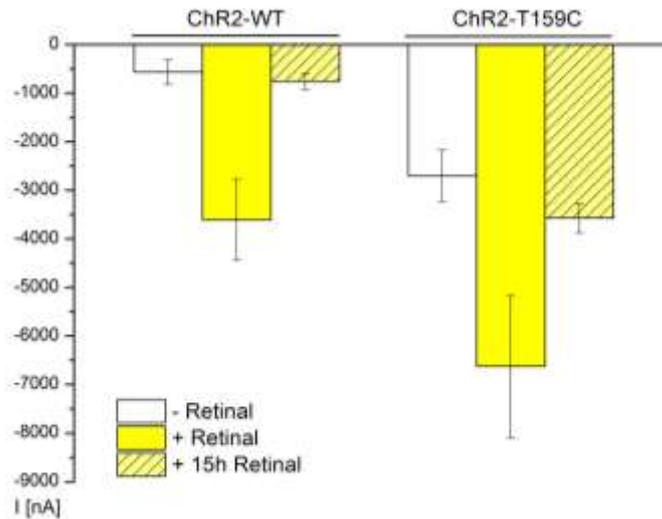


Abb. 33: Lichtaktivierte Ströme bei T159C-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation
 Mit 20ng mRNA-injizierte Oozyten, belichtet bei 473nm. Die Zellen wurden mit Standard-Lösung (ORi) pH 7.6 perfundiert, bei einer Spannung von -100mV. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert bei -100mV; $n \geq 3 \pm SD$.

Da die Inkubation über Nacht keine Zunahme der lichtaktivierten Ströme auf das Niveau der mit Retinal inkubierten Oozyten ergab, konnte gleichermaßen bei 15-minütiger Retinalperfusion nur ein geringer Anstieg beobachtet werden (Abb. 34).

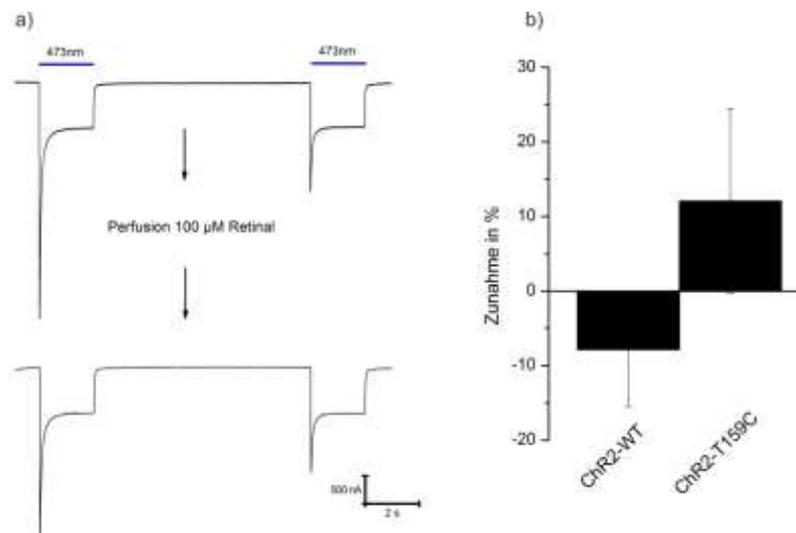


Abb. 34: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159C
X. laevis injizierte Oozyten wurden mit Ori pH 7.6 perfundiert. Bei einer Spannung von -100mV wurden zwei Lichtpulse von 473nm gegeben. Die anschließende Spannung betrug -50mV bei Perfusion mit retinalhaltiger Ori pH 7.6 (100μM Retinal). Während der 15minütigen Perfusion wurden je Minute ein Lichtpuls gegeben und die lichtaktivierten Ströme anschließend erneut bei -100mV aufgezeichnet. a) Exemplarische Darstellung einer Messung. b) Arithmetischer Mittelwert der Stromzunahme von ChR2-WT und ChR2-T159C in Prozent. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, $n \geq 3$.

Ergebnisse

3.2.2.5 ChR2-K257R::YFP

Das Lysin an Position 257 (K257) bildet die Schiff' Base mit dem Chromophor all-*trans*-Retinal. Bei der Mutation von K zu R (Arginin) wird die Bildung dieser kovalenten Bindung verhindert in dessen Folge kein funktionsfähiges Protein gebildet werden kann. In Abb. 35 sind elektrophysiologische Messungen von K257R-injizierten Oozyten dargestellt. Typische ChR2-Ströme konnten, wie erwartet, nicht aufgezeichnet werden. Die marginalen lichtaktivierten Signale sind Artefaktströmen zuzuordnen, die ebenfalls bei nicht-injizierten Kontrollloozyten beobachten werden können.

Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen festgestellt werden. Auch bei Zugabe von 10 μ M Retinal zur Inkubationslösung konnte nur eine minimale Fluoreszenzintensität aufgezeichnet werden (Abb. 35).

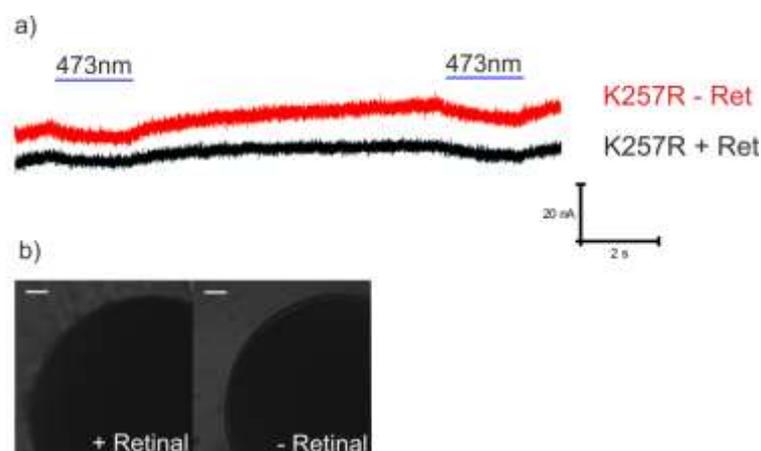


Abb. 35: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-K257R::YFP

a) Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96-Lösung inkubiert. Die Spannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6.

b) ChR2-K257R::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100 μ m.

3.2.2.6 ChR2-K257R/T159Y::YFP

Aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse kam man zu der Annahme, dass die Mutation T159Y das Apoprotein Chop2 stabilisieren kann. Eine Kombination aus einer destabilisierenden Mutation und einer stabilisierenden Mutation sollte zu einem Protein führen, das kein Chromophor binden und folglich keinen Photozyklus durchlaufen kann.

Ergebnisse

Dieses funktionslose Protein sollte dennoch in der Plasmamembran vorliegen und durch das CLSM sichtbar gemacht werden können.

In Abb. 36 ist, wie erwartet, nur eine artefaktähnliche Stromantwort zu erkennen. Wie schon bei K257R beobachtet, konnte durch die Zugabe von Retinal kein lichtaktivierter Strom hervorgerufen werden.

Die erhaltenen Daten der Fluoreszenzmikroskopie belegen, dass, im Gegensatz zu WT-injizierten Zellen, in beiden Fällen YFP detektiert werden konnte (Abb. 36). Dieses Ergebnis erhärtet die These einer Stabilisierung des Proteins durch das Einbringen einer aromatischen Aminosäure an Position 159.

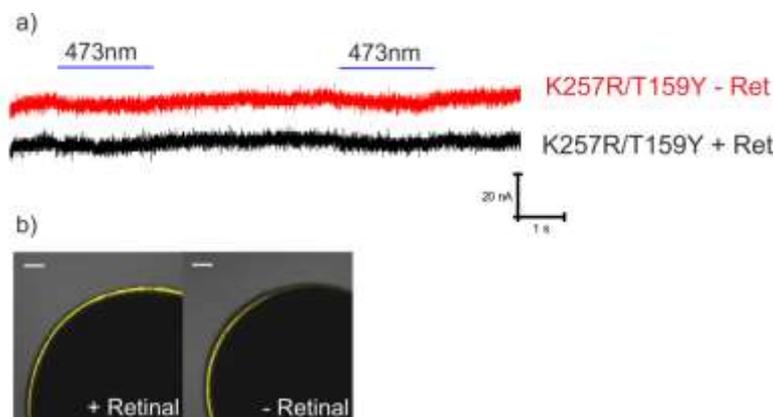


Abb. 36: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-K257R/T159Y::YFP

a) Injizierte Oozyten wurden in retinalfreier (rot) oder in retinalsupplementierter (schwarz) ND96 inkubiert. Die Klemmspannung betrug -100mV bei Perfusion mit ORI-Lösung pH7.6. Die Stromspuren stehen exemplarisch für die durchgeführten Messungen.

b) Exemplarische ChR2-K257R/T159Y::YFP- injizierte Oozyten von *X. laevis*. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

3.2.3 Protein-Immunoblotting

Zur Untermauerung der YFP-Fluoreszenzintensitäten und der damit einhergehenden Expressionsstärke von ChR2-WT und ChR2-Mutanten wurde ein Protein-Immunoblot durchgeführt. Bei der Aufarbeitung der injizierten Oozyten wurde die Gesamtmembranfraktion von den restlichen Bestandteilen isoliert. Die Membranfraktion trennte man mit Hilfe einer SDS-PAGE auf und übertrug diese auf eine

Ergebnisse

Membran (blotting). Die Fusion von Chr2 an YFP erlaubt dessen Detektion durch Antikörper (siehe Abschnitt 2.11). Die Entwicklung des aufgelegten Röntgenfilm ist in Abb. 37 dargestellt.

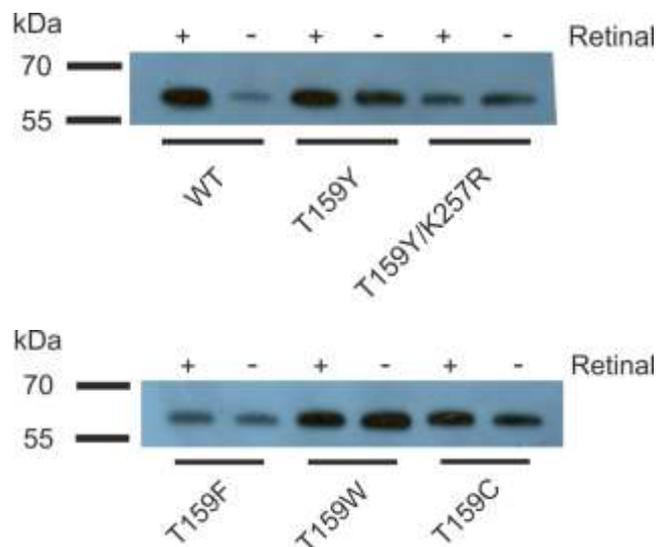


Abb. 37: Protein-Immunoblot von Chop2-WT und Chop2-Mutanten exprimierenden Oozyten

Die Membranfraktion von injizierten Oozyten wurde wie beschrieben präpariert. Der verwendete erste Antikörper detektiert das fluoreszente Protein YFP. An den sekundären Antikörper ist eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Bei der Reaktion mit Luminol wird Licht emittiert, das den Röntgenfilm schwarz färbt. Zur Isolation der Membranfraktion wurden 5 - 10 Oozyten homogenisiert, aufgetragen wurden 2µl, was einer Oozyte entspricht. Belichtungszeit: 20 Sekunden.

Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Bandenstärke der Chr2-WT-injizierten Oozyten, abhängig vom Inkubationsmedium. Das Bandenmuster unterstützt die Ergebnisse von elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Chr2-WT, inkubiert ohne zusätzliches Retinal zeigt eine deutlich schwächere Expression.

Anhand der Bandenstärke der Mutanten, die eine aromatische Aminosäure an Position 159 tragen, kann auf eine deutlich stärkere Proteinexpression (- Retinal) als bei WT-injizierten Zellen geschlossen werden. Dies gilt ebenso für die Doppelmutante K257R/T159Y.

T159C zeigt eine annähernd äquivalente Bandenfärbung, die auf eine retinalunabhängige Proteinexpression hin deutet. Dies kann durch fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, jedoch nicht durch elektrophysiologische Messungen unterstützt werden.

3.3 Putative Ubiquitinierungsstellen

In einer Zelle werden missgefaltete Proteine unter anderem mit Hilfe des Proteasoms abgebaut. Strukturelle Veränderungen, die eine Missfaltung des Proteins zur Folge haben, werden unter anderem durch den Austausch von Aminosäuren, die Verkürzung der Polypeptidkette oder durch nicht-native Disulfidbrücken verursacht (Claessen, Kundrat et al. 2012). Durch das Anheften von Ubiquitinmolekülen hauptsächlich an zugänglichen Lysinen (K) werden die entsprechenden Proteine für den Abbau im Proteasom gekennzeichnet (siehe auch Abschnitt 1.6). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Apoprotein Chop2::YFP die Plasmamembran nicht erreicht, da es nach der Synthese wieder degradiert wird.

Die betreffenden Lysine befinden sich im intrazellulären Bereich zwischen den einzelnen Transmembranhelices (Loops). Diese wurden im Folgenden zu Argininen verändert, sodass eine putative Ubiquitinierung nicht mehr möglich war.

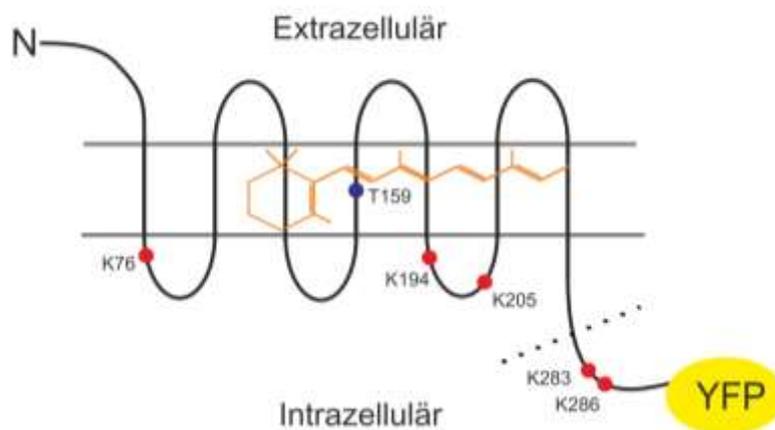


Abb. 38: Skizze von Chr2 bzw. dessen putative Ubiquitinierungsstellen

In den intrazellulären Loops sind Lysine (K) gekennzeichnet (rot), die als mögliche Ubiquitinierungsstellen dienen können. Lysine des C-Terminus (K283 und K286) wurden entfernt, indem Chr2 auf 282 AS verkürzt wurde, hierbei wurde auch YFP entfernt.

In der Aminosäuresequenz von Chop2 konnten drei Lysine in den Loops identifiziert werden. K76 im ersten Loop und K194 und K205 im dritten Loop. Außerdem konnten im C-Terminus K283 und K286 identifiziert werden. Die putativen Ubiquitinierungsstellen sind schematisch in Abb. 38 dargestellt.

Ergebnisse

Die identifizierten Lysine wurden zum einen als Einzelmutanten in Oozyten exprimiert (K76R, K194R und K205R), zum anderen wurden diese als 3-fach-Mutante zusammengefasst. Die Lysine an den Stellen 283 und 286 wurden modifiziert, indem ChR2 auf 282 AS verkürzt wurde. Hierbei wurde YFP aus der Sequenz entfernt sodass von diesen Zellen keine Fluoreszenzaufnahmen entstehen konnten. Schließlich wurden alle Lysine in einer 5-fach-Mutante durch Arginine ersetzt (K76R/ K194R/ K205R/ K283R/, K286R).

3.3.1 Einzelmutanten

Bei Zugabe von all-*trans*-Retinal zum Inkubationsmedium wiesen die Einzelmutanten, vergleichbar mit ChR2-WT::YFP-injizierten Oozyten, eine starke Fluoreszenzintensität auf. Bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal konnten nur sehr geringe Intensitäten festgestellt werden (Abb. 39).

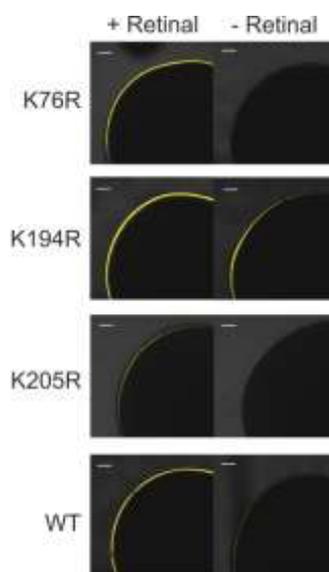


Abb. 39: Fluoreszenzen von ChR2-K76R, -K194R, -K205R und -WT-injizierten Oozyten

Oozyten von *X. laevis* nach Injektion von 20ng Einzelmutanten-mRNA. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

Ergebnisse

Elektrophysiologische Messungen ergaben bei Inkubation über Nacht in retinalsupplementierter Lösung bei allen Einzelmutanten ein Ansteigen des lichtaktivierten Stromes, dessen Wert vergleichbar mit Chr2-WT::YFP-injizierten Zellen ist (Abb. 40).

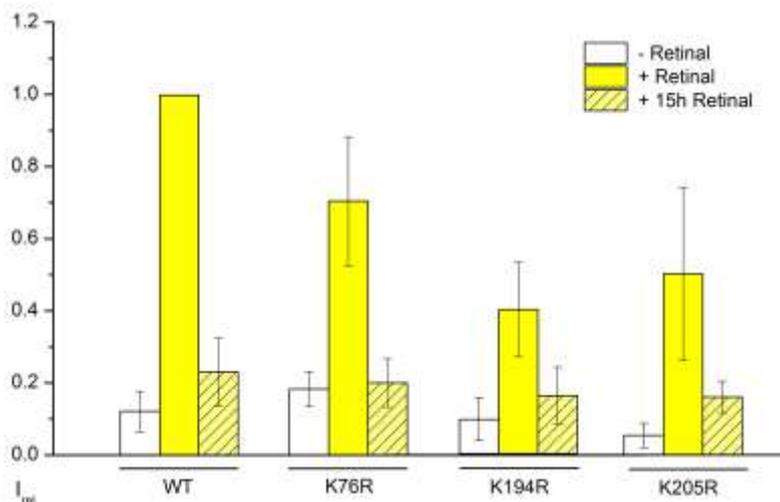


Abb. 40: Normierte lichtaktivierte Ströme der Lysin-Einzelmutanten bei $V_m = -100\text{mV}$

Injizierte Zellen wurden bei einer Spannung von -100mV und bei Perfusion einer Standardlösung (ORi) pH 7.6 bei 473nm belichtet. Die Inkubation der Oozyten erfolgte jeweils unter retinalfreien Bedingungen (-Retinal), oder in retinalsupplementierter Lösung (+Retinal; Endkonzentration $10\mu\text{M}$). Injizierte Zellen unter retinalfreien Bedingungen wurden über Nacht mit Retinal versetzt (+15h Retinal; Endkonzentration $10\mu\text{M}$). Resultierende Ströme wurden normiert (Chr2-WT + Ret = 1). Dargestellt ist das arithmetische Mittel; $n \geq 3 \pm \text{SD}$.

3.3.2 Mehrfachmutanten

Die Modifikationen der beschriebenen Lysine zeigten im Einzelnen keinerlei Auswirkungen auf die Stabilität von Chop2. Die Einzelmutationen wurden in einer Tripel-Mutante zusammengefasst. Des Weiteren wurden ebenfalls die Lysine 283 und 286 in einer 5-fach-Mutanten zugefügt. Die Fluoreszenzintensitäten der Tripel- und der 5-fach-Mutanten sind in Abb. 41 dargestellt.

Ergebnisse

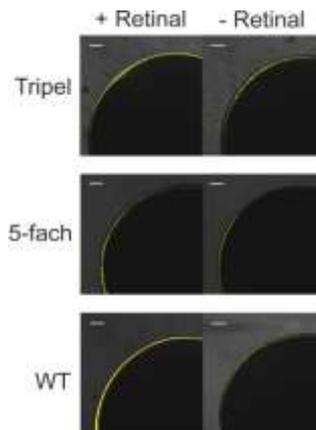


Abb. 41: Fluoreszenzen von ChR2-Tripel, -5fach und -WT-injizierten Oozyten

Oozyten von *X. laevis* nach Injektion von 20ng Mehrfachmutanten-mRNA. Tripelmutation entspricht K76R/K194R/K205R. 5fach-Mutation entspricht K76R/K194R/K205R/K283R/K286R. Inkubation 3 Tage in retinalhaltiger Lösung (+ Retinal) und retinalfreier Lösung (- Retinal). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

Die Unterschiede bezüglich der Fluoreszenzintensitäten sind hinsichtlich der Tripel-Mutante schwächer ausgeprägt als bei WT-injizierten Oozyten, was auf eine Stabilisierung von ChR2 deuten könnte. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei Inkubation über Nacht keine Zunahme der lichtinduzierten Ströme auftrat (Abb. 42).

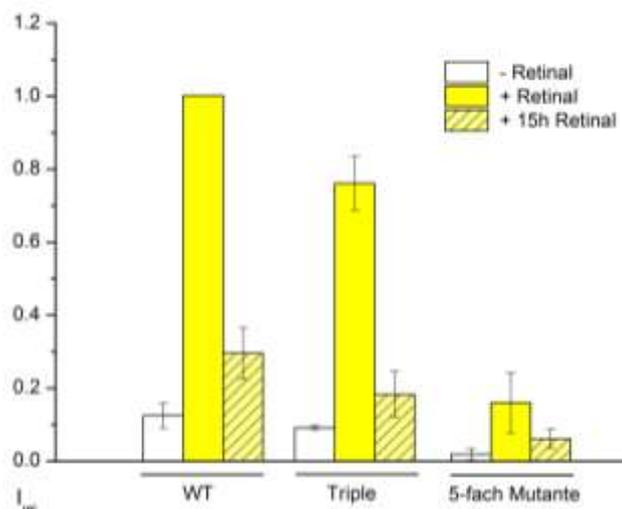


Abb. 42: Normierte lichtaktivierte Ströme von Lysin-Mehrfachmutanten bei $V_m = -100\text{mV}$

Injizierte Zellen wurden bei einer Spannung von -100mV und bei Perfusion einer Standardlösung (ORi) pH 7.6 bei 473nm belichtet. Die Inkubation der Oozyten erfolgte jeweils unter retinalfreien Bedingungen (- Retinal), oder in retinalsupplementierter Lösung (+Retinal; Endkonzentration $10\mu\text{M}$). Injizierte Zellen unter retinalfreien Bedingungen wurden über Nacht mit Retinal versetzt (+15h Retinal; Endkonzentration $10\mu\text{M}$). Resultierende Ströme wurden normiert (ChR2-WT + Ret = 1). Dargestellt ist das arithmetische Mittel; $n \geq 3 \pm \text{SD}$.

3.3.3. Verkürztes ChR2 (ChR2-282)

Durch gezielte *in-vitro* Mutagenese wurde ChR2, das 310 AS enthält, auf 282 AS verkürzt. Durch die damit einhergehende Eliminierung des YFP konnte ausgeschlossen werden, dass zusätzliche putative Ubiquitinierungsstellen des YFP nicht mehr zur Verfügung standen.

In Abb. 43 sind normierte Daten der elektrophysiologischen Messungen dargestellt. Das verkürzte ChR2-282 zeigt relativ zu ChR2-WT einen verringerten lichtinduzierten Strom. Durch Retinalinkubation über Nacht konnte keine erhöhte Stromzunahme festgestellt werden. Aufgrund der Eliminierung von YFP kann keine Aussage hinsichtlich der Expressionsstärke mittels Fluoreszenzintensitäten gemacht werden und die Möglichkeit der verminderten Expression muss in Betracht gezogen werden.

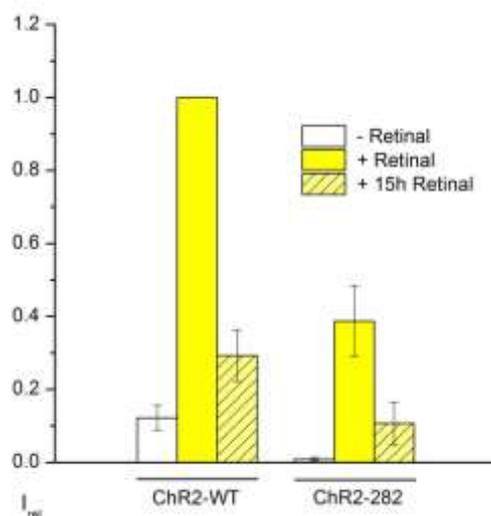


Abb. 43: Normierte lichtinduzierte Ströme von Chop2-282 $V_m = -100mV$

Injizierte Zellen wurden bei einer Spannung von $-100mV$ und bei Perfusion einer Standardlösung (ORi) pH 7.6 bei 473nm belichtet. Die Inkubation der Oozyten erfolgte jeweils unter retinalfreien Bedingungen (-Retinal), oder in retinalsupplementierter Lösung (+Retinal; Endkonzentration $10\mu M$). Injizierte Zellen unter retinalfreien Bedingungen wurden über Nacht mit Retinal versetzt (+15h Retinal; Endkonzentration $10\mu M$). Resultierende Ströme wurden normiert (ChR2-WT + Ret = 1). Dargestellt ist das arithmetische Mittel; $n \geq 3 \pm SD$.

3.4 pH-abhängige Guanidinium-dunkelleitfähigkeit

Im vorangegangenen Abschnitt konnte eine retinalunabhängige Proteinexpression bzw. Stabilisierung des Apoproteins Chop2-T159Y/F/W festgestellt werden. Im Zuge dieser Messungen konnte eine weitere Eigenschaft der aromatisch substituierten Mutanten eruiert werden. Messungen mit guanidiniumchloridhaltigen Lösungen hatten eine pH-abhängige Dunkelleitfähigkeit zur Folge; d.h. es konnte ein starker Einstrom an Guanidiniumionen festgestellt werden, ohne die gleichzeitige Applikation von Licht. Soweit nicht anders beschrieben wurden die injizierten Oozyten in retinalhaltiger Lösung inkubiert.

Guanidinium ist eine starke organische Base mit einem Molekulargewicht von 95.53g/mol, die bei physiologischem pH als Guanidiniumion vorliegt (Abb. 44).

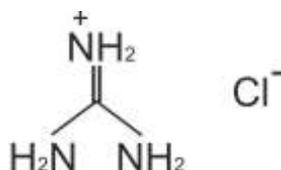


Abb. 44: Dissoziiertes Guanidiniumchlorid

In der Biochemie wird das chaotrope Salz in hohen Konzentrationen zum Denaturieren von Proteinen verwendet (Rudolph and Lilie 1996, Nelson and Cox 2009). Die hier verwendeten Lösungen enthalten Guanidiniumchlorid in einer Endkonzentration von 115mM, sodass der denaturierende Effekt hierbei nicht gegeben ist.

3.4.1 ChR2-T159Y

3.4.1.1 Einfluss des pH-Wertes

Das Ausmaß der pH-induzierten Veränderung der Dunkelleitfähigkeit wurde durch Perfusion mehrerer Guanidiniumlösungen (Gua), deren pH-Werte von pH 7 bis pH 11 anstiegen, ermittelt.

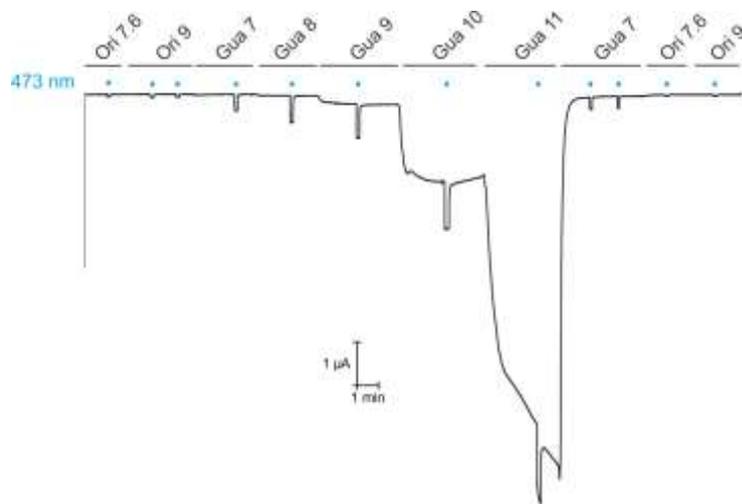


Abb. 45: Lichtunabhängiger Dunkelstrom von ChR2-T159Y.

Bei Perfusion mit verschiedenen Lösungen und einer Spannung von -50mV . Guanidiniumlösungen enthalten 115mM Guanidinium (Gua) bei variierenden pH-Werten (pH7 - pH11). Ori 7.6 und Ori 9 entsprechen Standardlösungen bei pH 7.6 und pH 9 (siehe Material und Methoden). Manuell applizierte Lichtpulse sind durch blaue Balken markiert. Die Zelle wurde nach Injektion in retinalhaltiger Lösung inkubiert.

In Abb. 45 ist eine mit ChR2-T159Y mRNA injizierte Oozyte dargestellt. Die Zelle wurde während der Messung bei einer Spannung von -50mV gehalten und mit den beschriebenen Lösungen perfundiert. Deutlich zu sehen ist, dass mit zunehmendem pH-Wert auch die Dunkelströme größer, also negativer werden. Bei einem pH-Wert von 11 wird die Zelle und damit der resultierende Strom instabil. Da hierbei keinerlei

Ergebnisse

zuverlässige Messung möglich ist, wurde von dieser Lösung abgesehen und stattdessen eine Guanidinium-Lösung bei pH 10 im Folgenden verwendet. Des Weiteren wird deutlich, dass, trotz des starken Dunkelstroms, noch ein zusätzlicher lichtaktivierter Strom zu erzeugen ist.

In Abb. 46 ist der Weg von der Messung bis zum abgebildeten Strom-Spannungsdiagramm schematisch dargestellt.

Teilbereich A) zeigt die während der Messung angelegte Spannung auf. Die Spannung wird in 20mV-Schritten von +30mV auf -130mV verringert.

In Teilbereich B) sind die daraufhin resultierenden elektrischen Ströme über der Zellmembran, während der Perfusion mit guanidiniumhalter Lösung bei pH 10, dargestellt. Im Bereich der roten Linie werden die entsprechenden Daten extrahiert und ein Strom-Spannungsdiagramm C) erstellt.

Die Stromspuren in B), wie auch das Diagramm C) verdeutlichen den Unterschied zwischen den lichtunabhängigen Strömen von WT-injizierten und T159Y-injizierten Zellen. Die Daten zur Berechnung des Leitwertes wurden bei 110mV bzw 130mV entnommen ($\Delta U = -110\text{mV} - -130\text{mV}$). Die Berechnung des Leitwertes ergab $25.5 \pm 6.4\mu\text{S}$ bei ChR2-WT-injizierten und $243 \pm 41\mu\text{S}$ bei ChR2-T159Y injizierten Zellen.

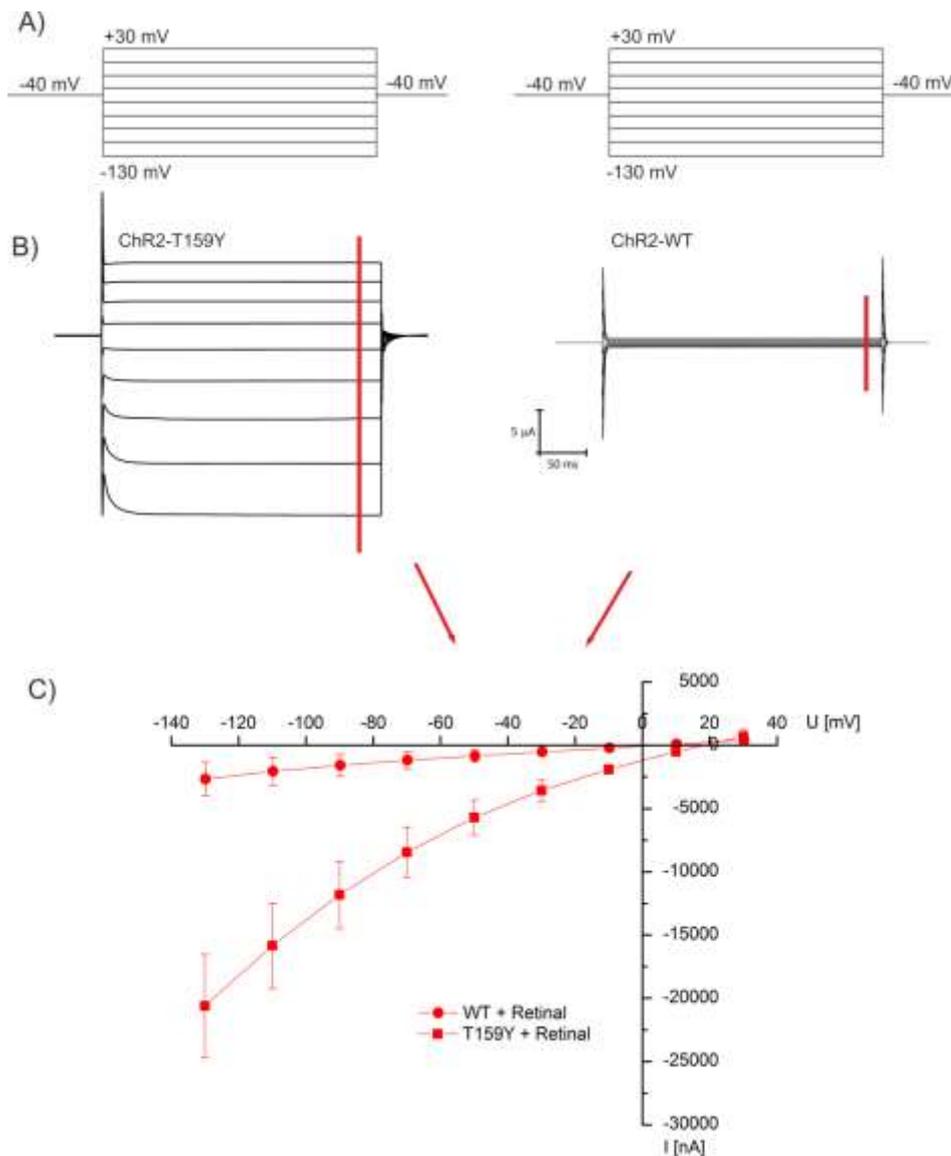


Abb. 46: Von den Rohdaten zum Strom-Spannungsdiagramm

A) Schema der angelegten Spannungen bei Perfusion mit Gua pH 10. Spannungsänderung in 20mV-Schritten.

B) Resultierende Ströme über der Oozytenmembran; die rote Linie markiert den Zeitpunkt der Datenextraktion.

C) Mit Hilfe der extrahierten Daten erstelltes Strom-Spannungsdiagramm für Chr2-WT und Chr2-T159Y. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

3.4.1.2 Einfluss der Guanidiniumkonzentration

Eine mögliche guanidiniuminduzierte Na^+ -Leitfähigkeit von Chr2-T159Y wurde mittels Perfusion von GuaCl/NaCl-Mischungen untersucht. Hierzu wurden Lösungen mit einer Endkonzentration von 115mM Hauption (Na^+ / Gua^+) hergestellt. Die Lösungen enthielten XmM GuaCl und $115 - \text{X}$ mM NaCl (z.B. 60mM GuaCl + 55mM NaCl) bei pH 10.

Ergebnisse

In Abb. 47 ist eine deutliche Reduktion sowohl des lichtaktivierten als auch des lichtunabhängigen Stroms ChR2-T159Y-injizierter Oozyten bei abnehmender Guanidiniumkonzentration zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass der resultierende Strom durch Guanidiniumionen und den veränderten Kanal verursacht wird.

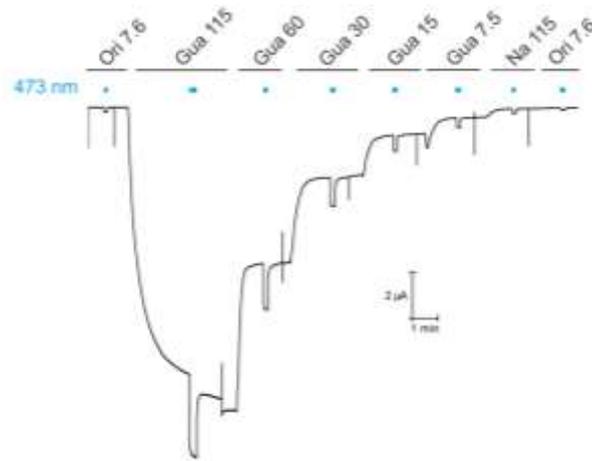


Abb. 47: ChR2-T159Y bei variabler Guanidiniumkonzentration.

Die Guanidiniumkonzentration variiert bei pH10 von 7.5mM bis 115mM, die Gesamtkonzentration von 115mM wurde durch Zugabe von NaCl erreicht. Die Klemmspannung beträgt -50mV; bei Perfusion jeder Lösung wurde manuell ein Lichtpuls von 473nm ausgelöst, angedeutet durch blaue Balken.

Des Weiteren kann kein lichtunabhängiger Strom von Na^+ bei pH 10 festgestellt werden (Abb. 48). Die Annahme, dass durch Guanidinium die Leitfähigkeit anderer Teilchen (z.B. Na^+) ermöglicht oder gesteuert wird (Gating), kann somit ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

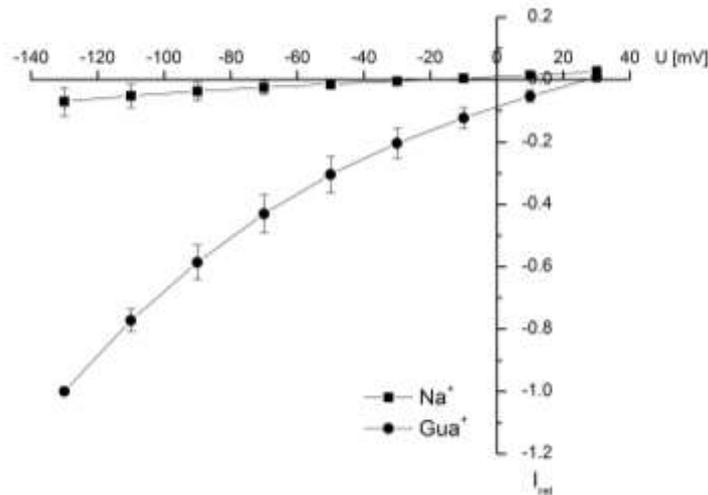


Abb. 48: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-T159Y bei 115mM NaCl bzw. 115mM GuaCl, pH10
Injizierte Oozyten wurden bei Perfusion mit 115mM NaCl bzw. 115mM GuaCl. Beide Lösungen wurden auf pH 10 eingestellt. Unter Verwendung des Strom-Spannungsprotokolls wurden die abgebildeten Daten ermittelt und normiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD; $n \geq 3$.

3.4.1.3 Inhibition der Ströme

Kationenkanäle können unter Verwendung eines Blocker reversibel oder irreversibel verschlossen werden. Lanthan (La^{3+}) ist ein Element mit der Ordnungszahl 57 und gehört zu den Lanthanoiden. In der Literatur ist Lanthan als Kanal-Blocker beschrieben, der spezifisch Ca^{2+} -Ströme inhibiert (Weiss 1974, Boucek and Snyderman 1976).

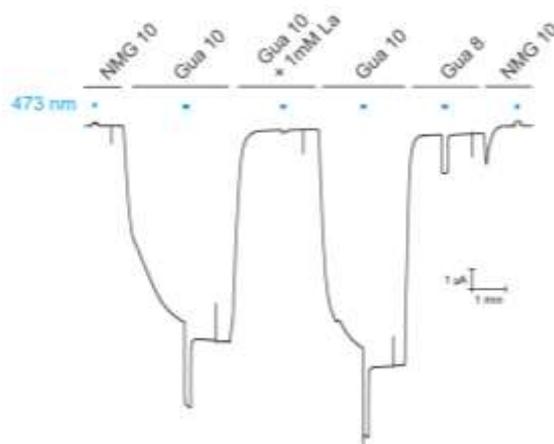


Abb. 49: ChR2-T159Y-Ströme bei Zugabe von La^{3+}
Perfusion einer T159Y-injizierten Oozyte mit NMG pH10, Gua pH10, Gua pH10 + 1mM La^{3+} und Gua pH8 bei einer Spannung von -50mV. Nach Injektion wurde die Zelle in einer retinalhaltigen ND96-Lösung inkubiert. Lichtapplikation wurde manuell gegeben bei 473nm, angedeutet durch die blauen Balken.

Ergebnisse

Sowohl die pH-abhängigen Dunkelströme als auch die lichtaktivierten Ströme konnten durch die Zugabe von 1mM La^{3+} deutlich reduziert werden (Abb. 49), gleichzeitig wurde die Integrität der Zelle nicht beeinträchtigt. Zur detaillierteren Darstellung der Inhibition wurden Strom-Spannungsdiagramme erstellt. Hierbei werden an die Zelle Spannungen von +30mV bis -130mV in 20mV-Schritten angelegt und der resultierende Strom aufgezeichnet.

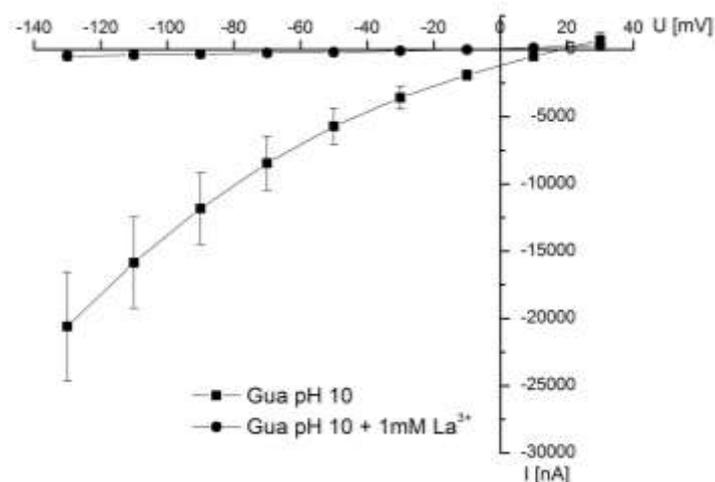


Abb. 50: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-T159Y bei Gua 10 und bei Zugabe von 1mM La^{3+}
Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Die deutliche Reduktion der pH-abhängigen Dunkelströme durch die Zugabe von La^{3+} betrug $97.7 \pm 1.2\%$. Durch den Lösungswechsel zu einer La^{3+} -freien Lösung wurde das Blockieren des Kanals wieder aufgehoben, was durch den wiederauftretenden lichtaktivierten und lichtunabhängigen Strom deutlich wurde. Die Zugabe von 1mM La^{3+} untermauerte die Hypothese, dass die erhöhte Dunkelleitfähigkeit für Guanidinium, hervorgerufen durch einen hohen pH, nicht über die Membran verläuft, sondern dass ChR2 infolge der eingefügten Mutation für Gua^+ durchlässig geworden war.

Laut Literatur blockiert La^{3+} spezifisch reversibel Ca^{2+} -Ströme (Weiss 1974, Boucek and Snyderman 1976), da jedoch in den verwendeten Messlösungen keinerlei Ca^{2+} enthalten war, konnte davon ausgegangen werden, dass ein unspezifisches Blockieren von Kationenströmen mit La^{3+} möglich ist.

Ergebnisse

Zusammengefasst können für ChR2-T159Y folgende Aussagen getroffen werden:

Ohne Lichtapplikation kann eine Stromantwort für Guanidinium beobachtet werden, die

- pH-abhängig ist
- durch die Zugabe von 1mM La^{3+} geblockt werden kann
- kein Artefakt aufgrund des pH-Wertes ist

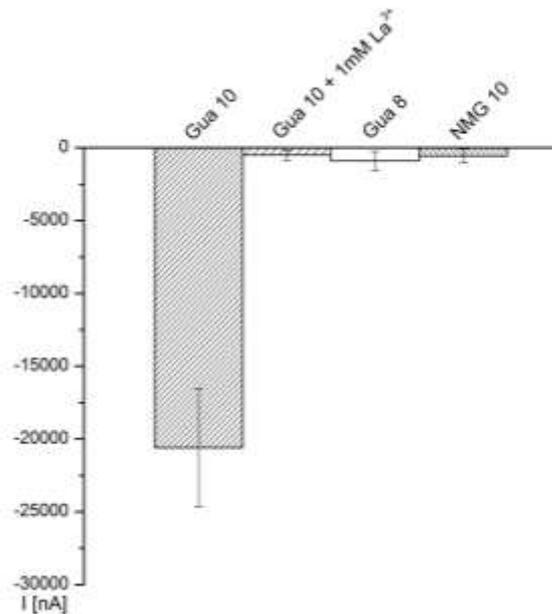


Abb. 51: Zusammenfassung der Dunkelströme in einem Balkendiagramm von ChR2-T159Y

Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die resultierenden Ströme von T159Y bei einer Spannung von -130mV. Die Perfusion erfolgte bei den angegebenen Lösungen (Guanidinium pH10, Guanidinium pH10 + 1mM La^{3+} , Guanidinium pH8, NMG pH10). Die Inkubation nach Injektion erfolgte in einer retinalhaltigen Lösung. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

3.4.1.4 Retinalunabhängiger Guanidinium-Dunkelstrom

In den Absätzen 3.2 bis 3.2.3 wurde geschildert, dass Mutationen zu einer aromatischen AS der Stelle 159 zu einer retinalunabhängigen Expression des Kanals führen. Bei Richtigkeit der Hypothese kann ein lichtunabhängiger Strom bei Perfusion mit Guanidiniumlösung pH 10 erfolgen.

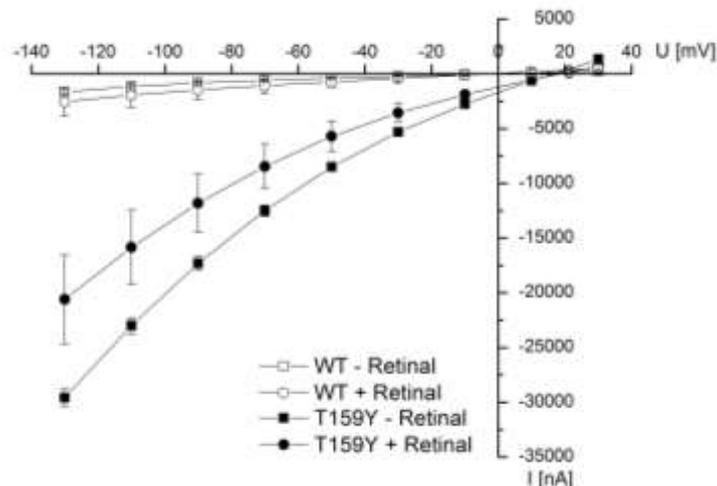


Abb. 52: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT- und ChR2-T159Y injizierten Zellen bei Gua pH10

Sowohl ChR2-WT als auch ChR2-T159Y wurden nach Injektion in retinalsupplementierter ND96-Lösung (+ Retinal) bzw. ohne dessen Zugabe zum Medium (- Retinal) inkubiert. Bei Perfusion mit Gua pH10-Lösung wurde ein Strom-Spannungs-Protokoll durchgeführt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

In Abschnitt 3.2.3 konnte aufgrund der Fluoreszenzintensitäten und der, innerhalb von 15 Minuten ansteigenden lichtaktivierten Ströme, verdeutlicht werden, dass, unabhängig von der Retinalzugabe, die Proteinexpression gleichwertig ist. Bei ChR2-T159Y-injizierten Zellen kann der erhebliche Kationeneinflux sowohl bei retinalfreien Inkubationsbedingungen ($G = 332 \pm 21 \mu S$) als auch bei retinalsupplementierter Inkubationslösung beobachtet werden ($G = 243 \pm 41 \mu S$). Bei WT-injizierten Zellen wurde ein Leitwert von $12.7 \pm 1.2 \mu S$ (- Retinal), bzw. $25.5 \pm 6.4 \mu S$ (+ Retinal) ermittelt. Die Unterschiede der Stromstärken, sowohl zwischen WT- und T159Y-injizierten Zellen, als auch hinsichtlich der Inkubationsbedingungen sind in Abb. 52 dargestellt.

In den Abschnitten 3.2.2.1 und 3.2.3 wurde deutlich, dass T159Y-injizierte Zellen im Gegensatz zu WT-injizierten Zellen, unabhängig von der Retinalzugabe im Inkubationsmedium, eine vergleichbare Proteinexpression aufweisen. Das Vorhandensein von lichtunabhängigen Strömen, sowohl bei Retinalsupplementation als auch bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal, untermauert dieses Ergebnis.

3.4.2 Chr2-T159W

Die Substitution an Position 159 durch Tryptophan (W) bewirkte, vergleichbar mit T159Y, einen großen lichtunabhängigen Guanidiniumstrom, der durch Zugabe von 1mM La^{3+} geblockt werden konnte ($78.6 \pm 5.2\%$). Wie schon bei Chr2-T159Y beobachtet wurde, unterband die Zugabe von La^{3+} nicht nur lichtunabhängige sondern auch lichtabhängige Ströme.

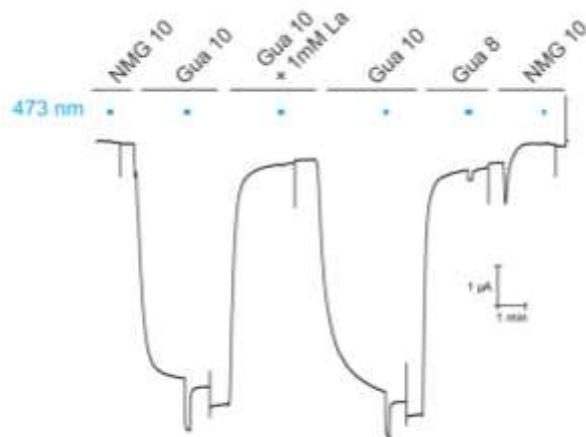


Abb. 53: Chr2-T159W-Ströme bei Zugabe von La^{3+}

Perfusion einer T159W-injizierten Oozyte mit NMG 10, Gua 10, Gua 10 + 1mM La^{3+} und Gua 8 bei einer Spannung von -50mV. Nach Injektion wurde die Zelle in einer retinalhaltigen ND96-Lösung inkubiert. Lichtapplikation wurde manuell gegeben bei 473nm, angedeutet durch die blauen Balken.

In Abb. 53 ist ein exemplarisches Beispiel einer T159W-injizierten Oozyte dargestellt. Bei Erreichen eines stabilen Wertes wurde ein Strom-Spannungsprotokoll durchgeführt und die erhaltenen Werte als Strom-Spannungsdiagramm aufgetragen (Abb. 54). Analog zu Messungen von T159Y-injizierten Zellen konnte eine deutliche Zunahme der Leitfähigkeiten für Gua^+ pH 10 festgestellt werden. Diese lagen bei WT-injizierten Zellen bei $55.5 \pm 6.9\mu\text{S}$, bei T159W-injizierten Zellen bei $213 \pm 25\mu\text{S}$. Des Weiteren konnte die pH-Abhängigkeit aufgrund des fehlenden Dunkelstroms bei pH 8 ermittelt werden.

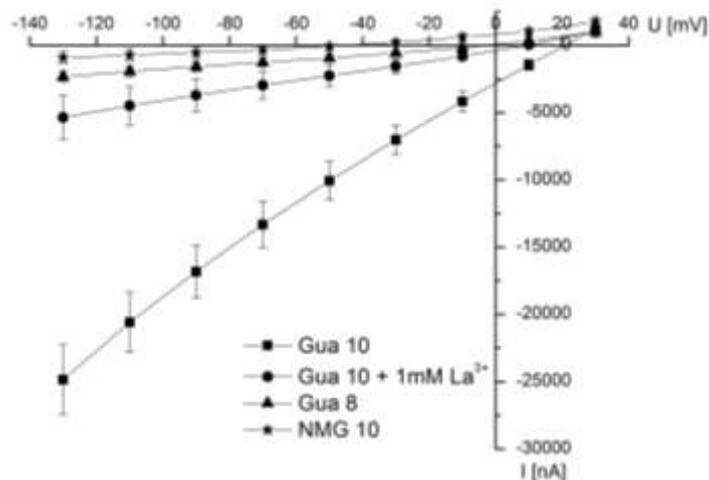


Abb. 54: Strom-Spannungsdiagramm von Chr2-T159W

Chr2-T159W-injizierte Zellen wurden in retinalsupplementierter ND96-Lösung inkubiert. Bei Perfusion der angegebenen Lösungen wurde ein Strom-Spannungsprotokoll durchgeführt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Bei T159W-exprimierenden Oozyten trat, wie schon bei Chr2-T159Y beschrieben, der lichtunabhängige Dunkelstrom bei Gua⁺ pH 10 auf. Auch ohne die Zugabe von externem Retinal ist ein starker lichtunabhängiger Kationeneinstrom zu erkennen (Abb. 55), was die beschriebene retinalunabhängige Expression (siehe Abschnitt 3.2.2.2) untermauerte.

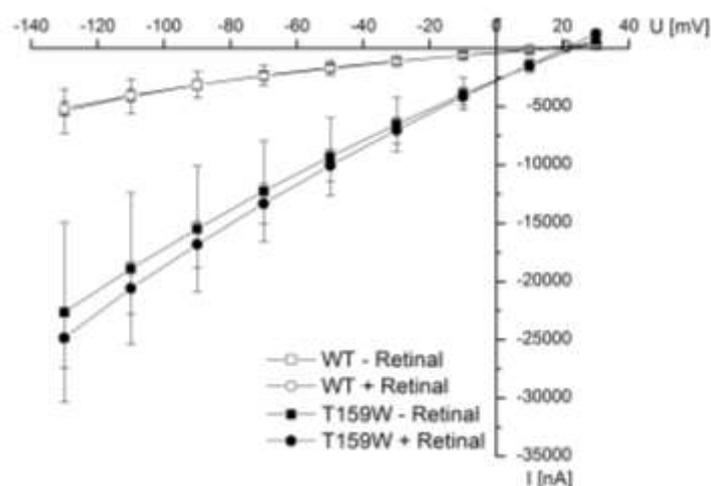


Abb. 55: Strom-Spannungsdiagramm von Chr2-WT- und -T159W injizierten Zellen bei Gua pH10

Sowohl Chr2-WT als auch Chr2-T159W wurden nach Injektion in retinalsupplementierter ND96-Lösung (+ Retinal) bzw. ohne dessen Zugabe zum Medium (- Retinal) inkubiert. Bei Perfusion mit Gua10-Lösung wurde ein Strom-Spannungsprotokoll durchgeführt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

3.4.3. Die Ausnahme: ChR2-T159F

Wie bisher gezeigt, erzeugen die aromatische Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) einen starken lichtunabhängigen Einstrom von Guanidiniumionen bei hohen pH-Werten. Bei Substitution durch die Aminosäure Phenylalanin (F) konnte der Influx von Guanidinium durch die Zugabe von 1mM La^{3+} geblockt werden ($64.45 \pm 6.58 \%$) (Abb. 56), wie auch der erzeugte lichtabhängige Einstrom von Guanidinium.

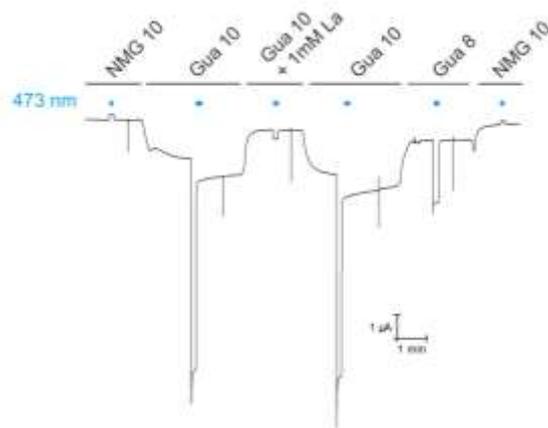


Abb. 56: Perfusion von ChR2-T159F + Retinal

Perfusion einer T159F-injizierten Oozyte mit NMG pH10, Gua pH10, Gua pH10 + 1mM La^{3+} und Gua pH8 bei einer Spannung von -50mV. Nach Injektion wurde die Zelle in einer retinalhaltigen ND96-Lösung inkubiert. Lichtapplikation wurde manuell gegeben bei 473nm, angedeutet durch die blauen Balken.

Bei Vergleich mit WT-injizierten Zellen wies das Strom-Spannungsdiagramm, bei Inkubation in retinalsupplementierter Lösung, keinen erhöhten Einstrom von Gua^+ ohne Lichtapplikation auf. Das Fehlen von externem Retinal in der Inkubationslösung bewirkte jedoch einen starken Anstieg der Leitfähigkeit für Gua^+ im Dunkeln (Abb. 57/Tab. 11).

Ergebnisse

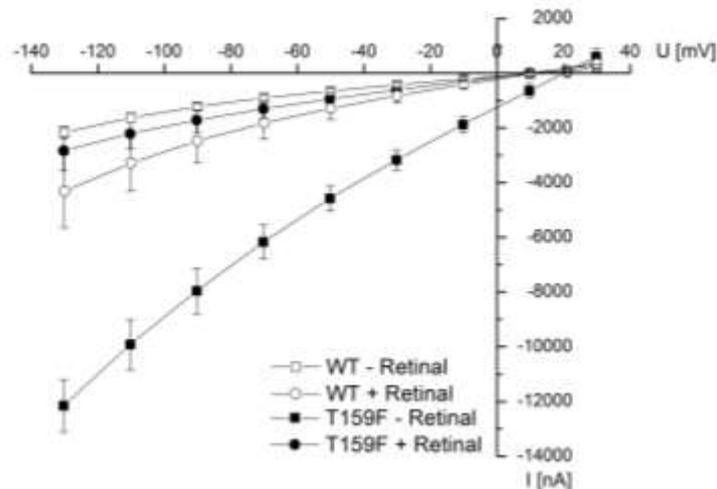


Abb. 57: Strom-Spannungsdiagramm bei Chr2-WT- und -T159F-injizierten Zellen

Chr2-T159F und Chr2-WT-injizierte Zellen wurden in einer retinalsupplementierten (+Retinal) und in einer retinalfreien Lösung (-Retinal) inkubiert. Bei Perfusion mit 115mM Guanidinium pH 10 wurde ein Strom-Spannungsprotokoll von +30mV bis -130mV in 20mV-Schritten durchgeführt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Injektion	Leitfähigkeit
T159F + Retinal	$27.5 \pm 9.4 \mu\text{S}$
T159F - Retinal	$95.4 \pm 32.2 \mu\text{S}$
WT + Retinal	$51.4 \pm 14.9 \mu\text{S}$
WT - Retinal	$25.4 \pm 0.8 \mu\text{S}$

Tab. 11 : Vergleich der berechneten Leitfähigkeiten von Chr2-T159F und Chr2-WT

Die Berechnung erfolgte nach Abschnitt 2.13.6. Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung; $n \geq 3$.

In den Abschnitten 3.2.2.3 und 3.2.3 wurde die retinalunabhängige Expression von T159F bestätigt. Hierbei wurde verdeutlicht, dass Proteinexpression und die damit einhergehenden lichtaktivierten Ströme, insbesondere bei Retinalsupplementation, wesentlich geringer ausfallen als bei WT-injizierten Oozyten. Die Stärke der Proteinexpression war jedoch unabhängig vom Vorhandensein von externen all-*trans*-Retinal und stellte somit keine vollständige Erklärung dieser Diskrepanz dar.

3.4.4. ChR-T159Y / K257R

Die Kombination der Mutation T159Y und K257R erzeugte keinerlei lichtaktivierten Kationenstrom (siehe Abschnitt 3.2.2.6), wengleich das gebildete Protein nicht abgebaut wird, was mittels der Fluoreszenzintensitäten und der Bandenstärke des Immunoblots beobachtet werden konnte. Aufgrund des fehlenden Lysins an Position 257 kann keine Schiff´ Base ausgebildet werden, und hat das Fehlen von lichtaktivierten Kationenströmen zur Folge. Bei Perfusion von T159Y/K257R-injizierten Zellen mit 115mM Gua⁺ pH 10 (Abb. 58 / Abb. 59) konnte ein lichtunabhängiger Strom aufgezeichnet werden. Bezüglich der pH-Abhängigkeit und des möglichen Blocken mittels La³⁺ ($98 \pm 0.3\%$) waren die Messungen vergleichbar mit der bereits beschriebenen Einzelmutation T159Y. Außerdem konnte bei Applikation von 473nm keine resultierenden Ströme erzeugt werden.

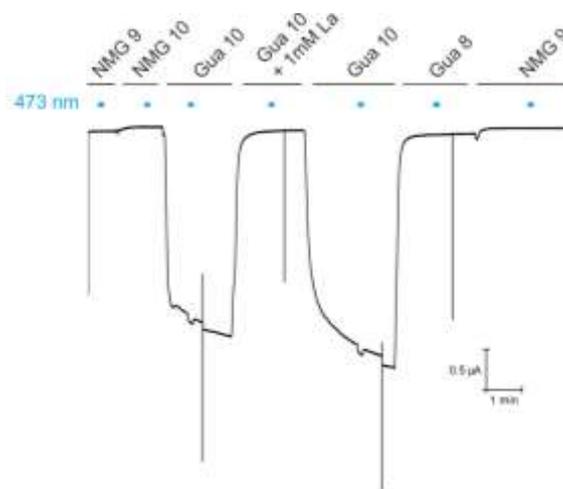


Abb. 58: Perfusion von ChR2-T159Y/K257R bei $V_m = -50mV$

Perfusion einer T159Y/K257R-injizierten Oozyte mit NMG pH10, Gua pH10, Gua pH10 + 1mM La³⁺ und Gua pH8 bei einer Spannung von -50mV. Nach Injektion wurde die Zelle in einer retinalhaltigen ND96-Lösung inkubiert. Lichtapplikation wurde manuell gegeben bei 473nm, angedeutet durch die blauen Balken.

Im Balkendiagramm (Abb. 59) sind die Eigenschaften der eingefügten Mutationen bei Inkubation der Zellen in retinalhaltiger Lösung zusammengefasst.

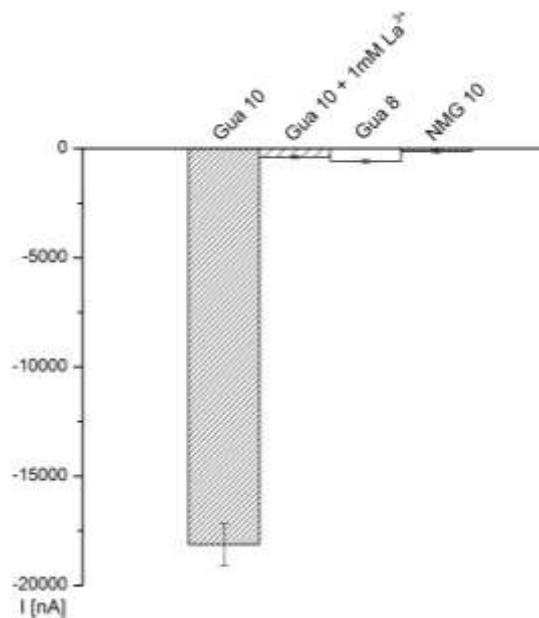


Abb. 59: Zusammenfassung der Dunkelströme in einem Balkendiagramm von ChR2-T159Y/K257R

Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die resultierenden Ströme von T159Y/K257R bei einer Spannung von -130mV. Die Perfusion erfolgte bei den angegebenen Lösungen (Guanidinium pH10, Guanidinium pH10 + 1mM La³⁺, Guanidinium pH8, NMG pH10). Die Inkubation nach Injektion erfolgte in einer retinalhaltigen Lösung. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Der berechnete Leitwert von $237.52 \pm 34.15\mu\text{S}$ war vergleichbar mit T159Y-injizierten Zellen (siehe Abschnitt 3.4.1.4) und in Relation zu WT-injizierten Oozyten (+Retinal) um das 10fache erhöht ($25.49 \pm 6.39\mu\text{S}$).

Die resultierenden Ströme bei Inkubation ohne externes Chromophor bewegten sich mit einem Leitwert von $267.02 \pm 61.60\mu\text{S}$ in der gleichen Größenordnung.

Ergebnisse

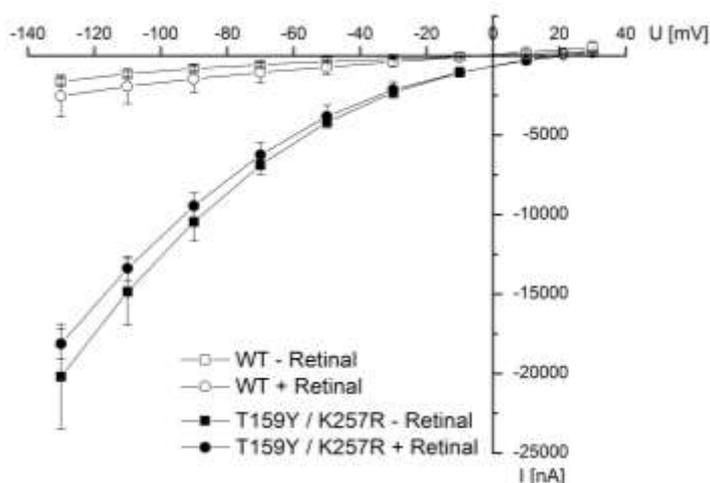


Abb. 60: Strom-Spannungsdiagramm bei ChR2-WT- und -T159Y/K257R-injizierten Zellen

ChR2-T159Y/K257R- und ChR2-WT-injizierte Zellen wurden in einer retinalsupplementierten (+Retinal) und in einer retinalfreien Lösung (-Retinal) inkubiert. Bei Perfusion mit 115mM Guanidinium pH 10 wurde ein Strom-Spannungsprotokoll von +30mV bis -130mV in 20mV-Schritten durchgeführt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Diese Messungen unterstützen die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2.6 und 3.2.3. Die äquivalenten Fluoreszenzintensitäten und Bandenstärken des Immunoblots spiegeln sich in den Leitwerten für Guanidinium bei pH 10 wider.

3.5 pH-Sensoren

Im Jahr 1997 konnten Stefan Hoth et al. (1997) nachweisen, dass das Vorkommen von extrazellulären Histidinen die spannungsabhängige Aktivierung von KST1, einem pflanzlichen Kaliumkanal, beeinflusst. Bei KST1-WT führt eine Verringerung des extrazellulären pH-Wertes zu einer Verschiebung des halbmaximalen Aktivierungspotentials zu positiveren Werten. Durch Mutationen der entsprechenden Histidine ging die pH-Sensitivität verloren oder konnte sogar invertiert werden (Hoth, Dreyer et al. 1997). In einer weiteren Untersuchung von KST1 konnte gezeigt werden, dass bei einer Substitution von R181 durch Glutamin (Q) ein inverses Verhalten hervorgerufen wurde (Hoth and Hedrich 1999). Somit konnte bewiesen werden, dass Histidine (H) und Arginine (R) in extrazellulären Loops als pH-Sensoren fungieren. H (pK_s

Ergebnisse

~6.5), R ($pK_s \sim 12$) und K ($pK_s \sim 10$) sind bei neutralem pH positiv geladen, können bei Änderung des pH-Wertes aber deprotoniert werden und liegen dann ungeladen vor. Vor allem Histidine werden oft in aktiven Zentren von Enzymen gefunden, wo die De- und Reprotonierung der Seitenkette eine wichtige Rolle spielt (Findlay, Herries et al. 1962). Der einwärtsgerichtete, pH-abhängige und lichtunabhängige Strom bei Einfügen eines Tyrosins an Position 159 wies auf das mögliche Vorhandensein eines pH-Sensors bei ChR2 hin. In den extrazellulären Loops von ChR2 konnten zwei Histidine (H114, H249) und zwei Arginine (R120, R115) aufgrund des Alignments von Suzuki et al. (2003) identifiziert werden (Abb. 61). Die Aminosäuren wurden zu Glutamin (Q) und der basische Charakter von H und R zu polar und neutral verändert. Die Veränderungen von H und R wurden in Verbindung mit T159Y vorgenommen. Das Ziel hierbei war, auch bei einer Guanidiniumlösung bei pH 8 eine erhöhte Leitfähigkeit ohne die notwendige Lichtapplikation zu erzeugen.

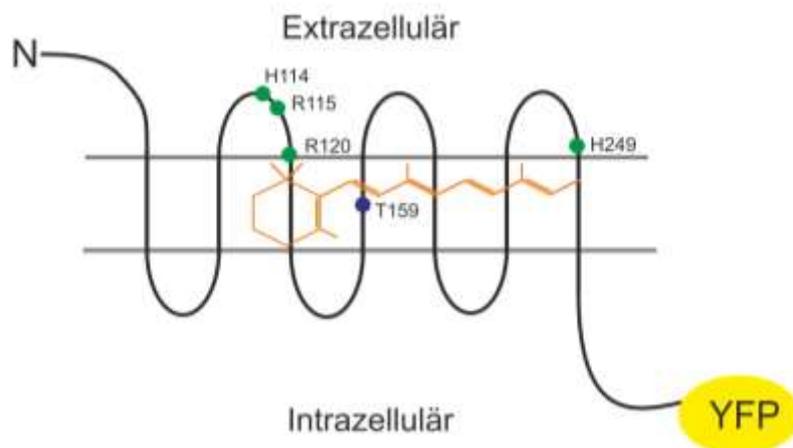


Abb. 61: Schematische Darstellung von ChR2

Die zu mutierenden Aminosäuren im extrazellulären Bereich sind in Grün dargestellt. Die bereits vorhandene Mutation T159Y ist in Blau dargestellt. Das Chromophor all-*trans*-Retinal ist in Orange dargestellt und liegt im membranären Bereich. Die Darstellung wurde auf Grundlage des Alignments von Suzuki et al. (2003) angefertigt.

3.5.1 H114 / R115

Die Aminosäuren Histidin 114 und Arginin 115 konnten im Loop zwischen den Helices 2 und 3 identifiziert werden. H114 und R115 wurden gleichzeitig und in Verbindung mit T159Y zu Q verändert. Die Messungen wurden wie schon beschrieben bei Perfusion mit einer Guanidiniumlösung pH 8 durchgeführt und die resultierenden Ströme in einem Strom-Spannungsdiagramm aufgetragen (Abb. 62). Trotz der veränderten Aminosäuren konnte bei Perfusion von pH 8 keinerlei erhöhten Dunkelleitfähigkeiten festgestellt werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Positionen H114 und R115 als pH-Sensor dienen

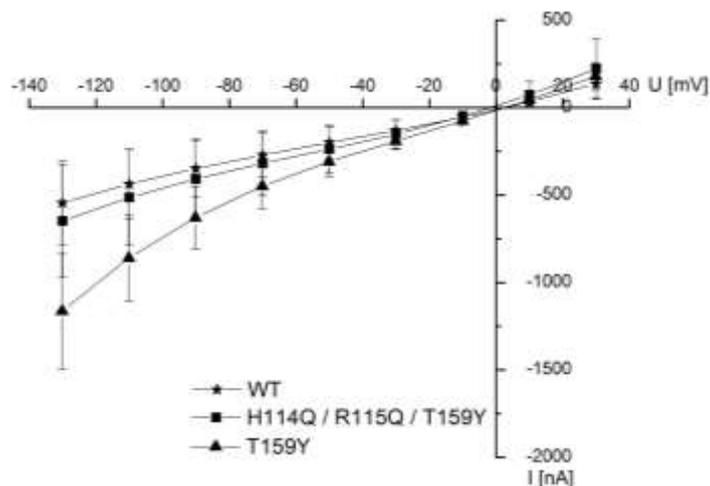


Abb. 62: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -H114Q/R115Q/T159Y- und -T159Y-injizierten Oozyten.

ChR2-WT-, ChR2-H114Q/R115Q/T159Y- und ChR2-T159Y-injizierte Zellen wurden in einer retinalsupplementierten Lösung inkubiert. Bei Perfusion mit 115mM Guanidinium pH 8 wurde ein Strom-Spannungs-Protokoll von +30mV bis -130mV in 20mV-Schritten durchgeführt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Verglichen zu WT- oder T159Y-injizierten Zellen fielen die Fluoreszenzintensitäten von H114Q/R115Q/T159Y-injizierten Oozyten deutlich geringer aus (Abb. 63). Aufgrund der signifikant kleineren lichtaktivierten Stromamplitude ($-67.5 \pm 25\text{nA}$; WT: $-2320 \pm 855.5\text{nA}$; T159Y: $-716.6 \pm 332.9\text{nA}$) war davon auszugehen, dass die Expressionsstärke stark verringert war.

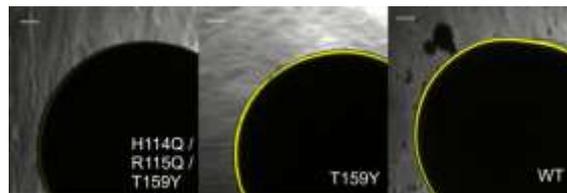


Abb. 63: Fluoreszenzen von ChR2-H114Q/R115Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und -WT::YFP

Injizierte Oozyten (je 20ng) nach 3 Tagen Expression in retinalsupplementierter ND96. Dargestellt sind exemplarische Oozyten der injizierten Zellen. Der weiße Balken stellt eine Länge von 100µm dar.

3.5.2 R120

Ebenfalls im Loop zwischen den Helices 2 und 3 konnte ein weiteres, hoch konserviertes Arginin (R120) als putativer pH-Sensor identifiziert werden. Im folgenden Strom-Spannungsdiagramm (Abb. 64) sind die resultierenden Ströme ohne Lichtapplikation in Abhängigkeit der Spannung bei Perfusion mit Guanidinium pH 8 dargestellt. Jedoch konnte keine Dunkelleitfähigkeit festgestellt werden.

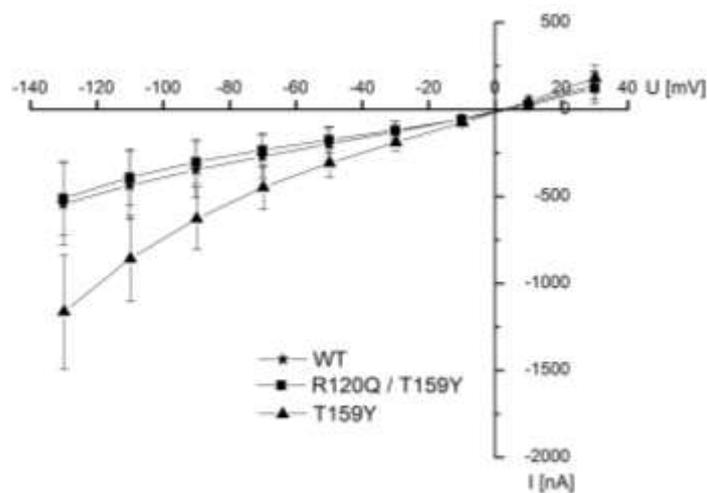


Abb. 64: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -R120Q/T159Y und -T159Y-injizierten Oozyten.

ChR2-WT-, ChR2-R120Q/T159Y- und ChR2-T159Y-injizierte Zellen wurden in einer retinalsupplementierten Lösung inkubiert. Bei Perfusion mit 115mM Guanidinium pH 8 wurde ein Strom-Spannungs-Protokoll von +30mV bis -130mV in 20mV-Schritten durchgeführt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Ergebnisse

Die Fluoreszenzintensitäten stehen in Relation zu den lichtaktivierten Strömen (Abb. 65:), die bei R120Q/T159Y ($-34 \pm 19.5\text{nA}$) im Vergleich zu WT ($-2320 \pm 855.5\text{nA}$) oder T159Y ($-716.6 \pm 332.9\text{nA}$) nur gering waren.

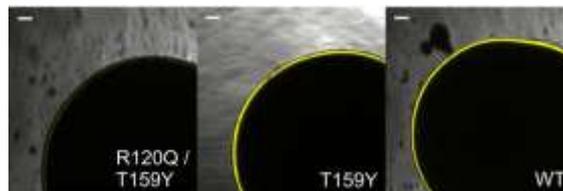


Abb. 65: Fluoreszenzen von ChR2-R120Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und -WT::YFP

Injizierte Oozyten (je 20ng) nach 3 Tagen Expression in retinalsupplementierter ND96. Dargestellt sind exemplarische Oozyten der injizierten Zellen. Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von $100\mu\text{m}$.

2.5.3 H249

Im extrazellulären Loop zwischen den Helices 6 und 7 konnte schließlich ein weiteres Histidin (H249) identifiziert werden. Die erhaltenen Daten des Strom-Spannungsdiagramms deuten auf keine erhöhte Leitfähigkeit für Guanidinium pH 8 (Abb. 66) hin.

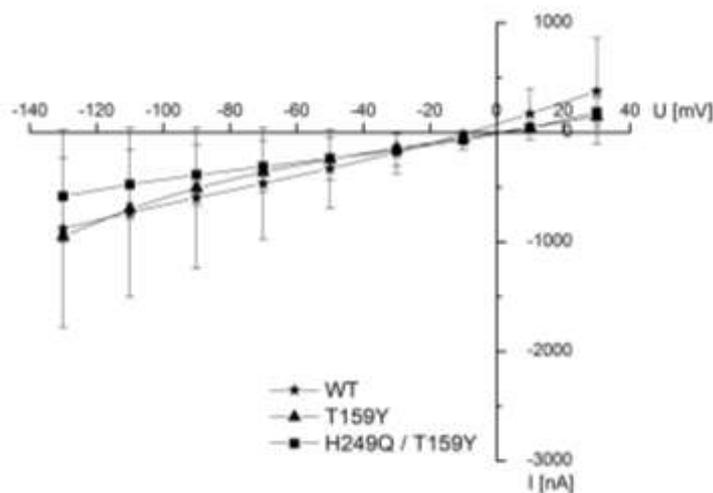


Abb. 66: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -T159Y- und -H249Q/T159Y-injizierten Oozyten

ChR2-WT-, ChR2-T159Y- und ChR2-H249Q/T159Y-injizierte Zellen wurden in einer retinalsupplementierten Lösung inkubiert. Bei Perfusion mit 115mM Guanidinium pH 8 wurde ein Strom-Spannungs-Protokoll von $+30\text{mV}$ bis -130mV in 20mV -Schritten durchgeführt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n \geq 3$).

Ergebnisse

Da sowohl Fluoreszenzintensitäten (Abb. 67), als auch lichtinduzierte Ströme von H249Q/T159Y sehr gering ausfielen ($-47.5 \pm 3.5\text{nA}$, WT: $-1951 \pm 699.1\text{nA}$, T159Y: $-1700 \pm 557\text{nA}$), konnte auf eine schwache Proteinexpression geschlossen werden.

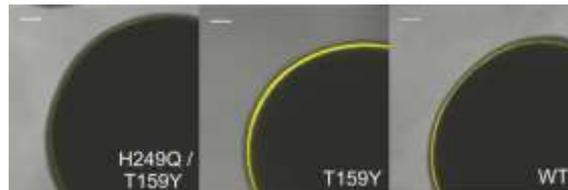


Abb. 67: Fluoreszenzintensitäten von ChR2- H249Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und -WT::YFP
Injizierte Oozyten (je 20ng) nach 3 Tagen Expression in retinalsupplementierter ND96. Dargestellt sind exemplarische Oozyten der injizierten Zellen. Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 100µm.

Das negative Ergebnis bezüglich der gesteigerten Guandinium-Leitfähigkeit bei pH 8 deutete nicht auf das Vorhandensein eines pH-Sensors hin. Die geringen Fluoreszenzintensitäten der injizierten Mutanten verwiesen jedoch auf eine stark verminderte Proteinexpression. Das negative Ergebnis hinsichtlich der pH-Sensoren war möglicherweise auf eine unzureichende Proteinmenge in der Plasmamembran der Oozyten zurückzuführen.

4. Diskussion

4.1 Retinalabhängige Stabilität

4.1.1 ChR2-WT

Bis dato ist nur wenig Literatur über die Stabilität von ChR2 zu finden. Die wenigen Arbeiten beziehen sich auf den Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*. Der verwendete Stamm der Grünalge ist aufgrund der blockierten β -Carotin-Synthese „blind“, d.h. ohne die Applikation zusätzlichen all-*trans*-Retinals erfolgte keine Reaktion auf Licht. Bei Zugabe des Kofaktors konnte innerhalb von 1 Minute eine Reaktion auf Licht beobachtet werden (Hegemann, Gartner et al. 1991, Lawson, Zacks et al. 1991). Es war somit davon auszugehen, dass in der Membran von *C. reinhardtii* Rhodopsin als nichtfunktionelles Apoprotein vorliegt. Im Veröffentlichungsjahr war indes noch nicht klar, dass die Grünalge zwei verschiedene Rhodopsine, ChR2 und ChR1, besitzt. In späteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von ChR1 im Augenfleck ausreicht, um sowohl photophobisch als auch phototaktisch zu reagieren. ChR1 stellt somit den dominanten Photorezeptor dar (Sineshchekov, Jung et al. 2002, Govorunova, Jung et al. 2004, Berthold, Tsunoda et al. 2008). Es wurden Hinweise gefunden, dass Chop1 ohne gebundenes Retinal degradiert wird (persönliche Kommunikation, Dr. Ronnie Gueta). Wildtypisches Chop1::YFP weist bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal nur geringe lichtaktivierte Stromamplituden und Fluoreszenzintensitäten auf, was, analog zu Chop2, auf den Abbau des Apoproteins hindeutet (persönliche Kommunikation, Dr. Ronnie Gueta). Die konträren Ergebnisse bezüglich der Stabilität sowohl von Chop1 als auch von Chop2 könnten in der Verwendung der verschiedenen Modellorganismen, bzw. der heterologen Expressionssysteme begründet sein. Die Verwendung von weiteren Modellorganismen und Expressionssystemen (*D. melanogaster*, *C. elegans*, HEK- oder HeLa-Zellen) kann diese Frage klären.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen für die retinalabhängige Stabilität von Chop2, da ChR2-injizierte Oozyten hinsichtlich der Fluoreszenzintensität (Abb. 18) und des lichtaktivierten Stromes (Abb. 17) eine deutliche Korrelation zu extern zugegebenem Chromophor aufwiesen. Die Annahme, dass Chop2-Apoproteine nicht in der Plasmamembran vorhanden waren, wurde durch Retinalinkubation über Nacht (Abb. 19), Retinalinkorporation innerhalb von 15 Minuten (Abb. 25) und Western-Blot-Analyse (Abb. 37) unterstützt. Bei einer Präsenz des Apoproteins in der Oozytenmembran wären bei Retinalzugabe äquivalente Fluoreszenzintensitäten und ein deutlicher Anstieg der lichtinduzierten Ströme zu erwarten gewesen.

Bei Retinitis Pigmentosa (siehe Abschnitt 1.6) ist bekannt, dass Mutationen zu Veränderungen in der Tertiärstruktur von Rhodopsin führen, die den Abbau des Proteins mittels des ERAD-Systems zur Folge haben (Sung, Schneider et al. 1991, Sung, Davenport et al. 1993). In bestimmten Fällen kann die Falschfaltung durch einen Überschuss an Retinal verhindert werden, was auf eine Stabilisierung durch die Bindung des Kofaktors 11-*cis*-Retinal schließen lässt (Hubbard 1958).

Eine Mutation des *RPE65*-Gens hat die Ausprägung der Leber'schen kongenitalen Amaurose zur Folge. Das Genprodukt katalysiert die Isomerisierung von all-*trans*- zu 11-*cis*-Retinal, was zur Wiederherstellung der Funktionalität notwendig ist. Redmond et al. (1998) konnten zeigen, dass trotz der Defizienz von RPE65 in Mäusen, das Apoprotein Opsin in den Photorezeptorzellen der Zapfen vorlag. In Patientenstudien konnte jedoch das Absterben von Photorezeptorzellen (Zapfen) der Makula gezeigt werden, was auf eine retinalabhängige Stabilität von Rhodopsin hinweist (Jacobson, Aleman et al. 2007). Sowohl aufgrund der breiten Variabilität von *RPE65*-Mutationen als auch der damit verbundenen unterschiedlichen Ausprägung des Krankheitsbildes ist eine eindeutige Aussage über die retinalabhängige Stabilität von Rhodopsin nicht möglich, dennoch weisen die Ergebnisse auf eine Degeneration des Opsins ohne gebundenen Kofaktor hin. Es ist denkbar, dass sich grundlegende Unterschiede zwischen Typ 1- und Typ 2-Rhodopsinen, wie etwa die Spaltung der Schiff' Base bei Belichtung, in der Konformationsänderung der Tertiärstruktur niederschlagen. Die retinalabhängige Expression bzw. Stabilität von ChR2 deutet evtl. auf eine, durch das Fehlen der Bindung

verursachte, strukturelle Veränderung hin, die putative Ubiquitinierungsstellen für das ERAD-System zugänglich macht.

Es ist nicht klar welche Konformation Chop2 ohne gebundenes Retinal einnimmt. Neben einer partiellen Faltung wäre auch eine vollständige Faltung denkbar. Aufgrund struktureller Daten ist es möglich, dass sich anstelle eines Kofaktors in der Nähe der Bindetasche Wassermoleküle befinden, welche von umliegenden Aminosäuren (u.a. T159, D156) koordiniert werden. Da diese Koordination unter großem Energieaufwand stattfindet, könnte hierdurch die strukturelle Integrität beeinträchtigt werden und so zur Degradation führen. Aufgrund einer eingefügten aromatischen Aminosäure kann die Hydrophobizität in diesem Bereich erhöht und das Eindringen des Wassers so verhindert werden.

Zur Überprüfung dieser These wäre es evtl. notwendig Chr2 in einem System zu exprimieren, das für kritische Faktoren des ERAD-System defizient ist (z.B. in Hefen). In diesen Stämmen sollte die Expressionsstärke von WT und T159Y/F/W annähernd identisch sein.

Eine zusätzliche Kontrolle könnte die Expression von nichtfusioniertem Chr2 und YFP sein. Durch das Einfügen einer IRES-Sequenz zwischen zwei kodierenden Sequenzen können auf Grundlage eines mRNA-Transkriptes einzelne, nichtfusionierte Proteine entstehen. An der IRES-Sequenz (Internal ribosomal entry site) können Ribosomen unabhängig vom 5'Cap binden und die Translation starten, was zu zwei individuellen Proteinen führt (Pelletier and Sonenberg 1988, Jang and Wimmer 1990). Alternativ dazu resultiert das Einfügen einer 2A-Sequenz zwischen Chop2 und YFP, ausgehend von einem Leseraster, ebenfalls in zwei individuellen Proteinen in äquimolaren Mengen (de Felipe, Luke et al. 2006, Tang, Ehrlich et al. 2009). Die 18 AS lange 2A-Sequenz bewirkt das Fortsetzen der Translation ohne das Ausbilden einer Peptidbindung zwischen den zwei Aminosäuren Glycin und Prolin (Donnelly, Luke et al. 2001).

Die Expressionsstärke unter retinalfreien Bedingungen, kann dann aufgrund der YFP-Fluoreszenzintensitäten direkt miteinander verglichen werden; während die messbaren, divergierenden Stromamplituden zur Untersuchung der Degradation von Chop2 herangezogen werden können.

4.1.2 Chr2-Volllänge

Im Falle von Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* konnte die Destabilisierung des Proteins, aufgrund einer Verkürzung des C-Terminus' (siehe Abschnitt 1.3), vor allem durch das Ansteigen der Denaturierungsrate nachgewiesen werden (Turner, Chittiboyina et al. 2009).

Das in dieser Arbeit verwendete Chr2 weist eine Länge von 310 AS auf, während die ursprüngliche Form 737 AS besitzt. Die uneingeschränkte Funktionalität des verkürzten Proteins konnte bereits in der Erstveröffentlichung (Nagel, Szellas et al. 2003) bestätigt werden. Bei heterologer Expression von Chr2 in Oozyten von *X. laevis*, sowie auch in weiteren Modellorganismen wird im Allgemeinen Retinal zum Inkubationsmedium hinzugefügt, da entweder endogen kein Retinal enthalten oder die Verfügbarkeit nur begrenzt ist (Nagel, Ollig et al. 2002, Nagel, Szellas et al. 2003, Nagel, Brauner et al. 2005, Schroll, Riemensperger et al. 2006). Somit lag bei retinalsupplementierter Inkubation das Augenmerk auf der Funktionalität; Expressionsstärke und Stabilität des verkürzten Proteins unter retinalfreien Bedingungen wurden in der Arbeit von Nagel et al. (2003) nicht berücksichtigt.

Bei Verwendung des 737 AS langen Chr2 konnte keine Stabilisierung festgestellt werden; sowohl Fluoreszenzintensitäten (Abb. 20), als auch die Retinalinkubation über Nacht (Abb. 21) lieferten keinen Hinweis auf ein, in der Membran vorliegendes Apoprotein. Als Funktion des C-Terminus von Chr1 wurde sowohl von Mittelmeier et al. (2011) als auch von Kato et al. (2012) subzelluläre Lokalisation und Membranverankerung in *C. reinhardtii* postuliert.

Der, im Vergleich zu Chr2-WT (310 AS), um ca. 55% verminderte lichtaktivierte Strom ist begründet in der reduzierten Anzahl an injizierten cRNA-Molekülen. In beiden Fällen wurden 20ng cRNA/Oozyte injiziert; Die gewonnene cRNA von Chr2-Volllänge ist jedoch um etwa 60% länger, was in einer reduzierten Anzahl an injizierten cRNA-Kopien und somit in verminderter Expression resultiert.

4.1.3 T159C

Im Zuge der Charakterisierung von T159C durch Berndt et al. wurden 10fach erhöhte lichtaktivierte Ströme im Vergleich zu ChR2-WT ermittelt; In dieser Arbeit konnte, verglichen mit ChR2-WT, lediglich eine Verdopplung der Ströme von T159C bei retinalsupplementierten Bedingungen festgestellt werden. Unter retinalfreien Bedingungen hingegen waren die Ströme von T159C verglichen mit ChR2-WT um den Faktor 5 vergrößert, was etwa der Stromamplitude von ChR2-WT + Retinal entspricht (Abb. 33).

Diese Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Affinität von T159C zum Chromophor hin, wodurch oozyteninternes Retinal besser genutzt werden kann und die Expression im Vergleich zu WT-injizierten Zellen verstärkt ist. Außerdem postulierten Berndt et al. aufgrund des verschobenen Umkehrpotentials von T159C, eine erhöhte Na⁺-Permeabilität, die in gesteigerten lichtaktivierten Strömen resultierte (Berndt, Schoenenberger et al. 2011, Gradmann, Berndt et al. 2011).

Eine Stabilisierung des Apoproteins durch Einfügen der nicht-aromatischen AS Cystein konnte aufgrund der Ergebnisse, der über-Nacht-Inkubation (Abb. 33) und Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation (Abb. 34), ausgeschlossen werden.

4.2 Retinalunabhängige Stabilität von ChR2-Mutanten

Greenhalgh et al. (1993) konnten erstmals Position M118 aus BR der Retinalbindetasche zuordnen, welche Position T159 in ChR2 entspricht. Dies und die Tatsache, dass M118 in Kontakt mit dem Chromophor steht konnte ebenfalls von Suzuki et al. (2003) und mit Aufklärung der Struktur von Kato et al. (2012) bestätigt werden. Kato et al. postulieren den Kontakt zwischen T159 (T198) und dem β -Ionon-Ring des Retinals (Abb. 68, links), Watanabe et al. (2012) jedoch an der Methylgruppe des C-9-Atoms (Abb. 68, rechts).

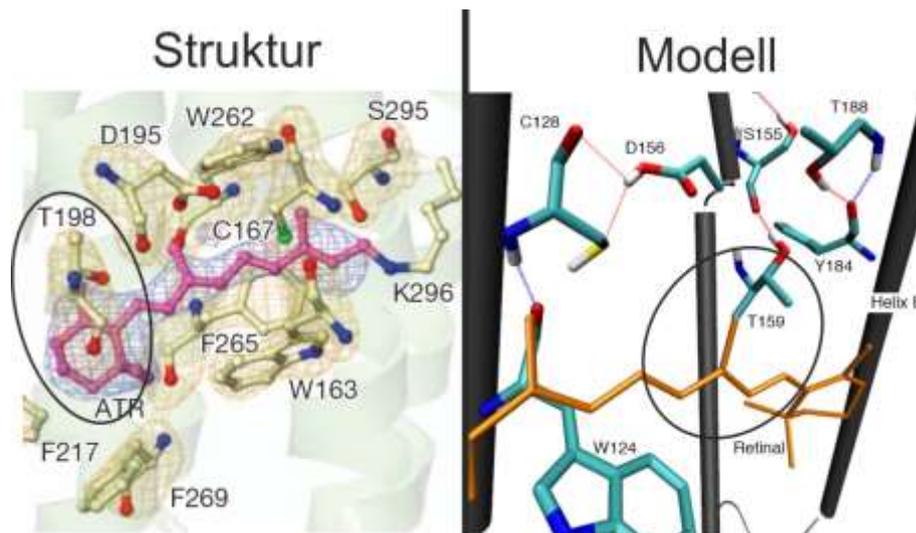


Abb. 68: Kristallstruktur und strukturelles Modell von ChR2

In der dargestellten Kristallstruktur (links) der Chimäre C1C2 weist die betreffende AS T159 (T198) einen direkten Kontakt zum β -Ionon-Ring des all-*trans*-Retinals auf; Im strukturellen Modell (rechts) von Chop2 besteht die Kontaktstelle zwischen T159 und der Methylgruppe des C-9-Atoms des Chromophors. Entnommen und modifiziert aus Kato et al. (2012) und Watanabe et al. (2012).

Bei Substitution der Retinalbindestelle K257 durch Arginin konnten mittels elektrophysiologischer Messungen keine Stromamplituden aufgezeichnet werden (Abb. 35).

Des Weiteren deutet das Fehlen eines YFP-Signals darauf hin, dass der Aminosäureaustausch zu Arginin im Unvermögen Retinal zu binden und somit in der Degradation des Proteins resultierte. Die Kombination mit T159Y bewirkte eine Stabilisierung des Apoproteins. Unter Verwendung von elektrophysiologischen Methoden konnten weiterhin keine lichtaktivierten Ströme festgestellt werden, was auf ein fehlendes Chromophor zurückzuführen ist. Das Vorhandensein von YFP-Fluoreszenzsignalen belegt jedoch die Existenz des Apoproteins in der Plasmamembran (Abb. 36).

Aufgrund der räumlichen Nähe von all-*trans*-Retinal und Aminosäure 159 und infolge der strukturellen Similarität, dem Vorhandensein delocalisierter π -Elektronen und der räumlichen Größe der aromatischen AS ist ein Mimikry hinsichtlich des gebundenen Kofaktors für das Apoprotein denkbar. Dies könnte zu einer, der Bindung von Retinal gleichwertigen, Konformationsänderung führen, die eine Degradation verhindert.

Denkbar wäre auch, dass, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, ein Ausschluss von Wassermolekülen eine Destabilisierung vermeiden könnte. Dies wäre durch computerbasierte Modelle, bzw. auf experimentellem Wege durch das Einfügen einer nichtaromatischen, hydrophoben Aminosäure (z.B. Valin, Isoleucin) zu klären.

4.3 Retinalbindeaffinität

Der geringe lichtinduzierte Strom, insbesondere bei T159Y und -W (Abb. 23a, Abb. 26a), bei ausschließlichen endogen vorhandenem Retinal, deutete, im Gegensatz zu T159C (Abb. 32), auf eine stark verminderte Affinität zum Chromophor *all-trans*-Retinal hin. Aufgrund der prägnanten Modifikationen in der Retinalbindetasche liegt der Grund hierfür möglicherweise in einer Veränderung der Hydrophobizität, die Auswirkung auf die Affinität für das ebenfalls hydrophobe *all-trans*-Retinal haben kann.

Der Hydrophobizitätsindex gibt an wie stark die Seitenkette einer AS vom Wasser verdrängt wird, d.h. je positiver der Wert ist, desto hydrophober ist die entsprechende AS (Eisenberg, Weiss et al. 1982). Bei aromatischen Aminosäuren ergibt sich die Reihe wie folgt:

Phenylalanin (F): 0.61 > Tryptophan (W): 0.37 > Tyrosin (Y): 0.02

Nach Zusammenfassung und Normierung der erhobenen Daten kann das Verhältnis der lichtinduzierten Ströme in Abhängigkeit von Retinal wie folgt berechnet werden:

$$\frac{I_{rel+Retinal}}{I_{rel-Retinal}}$$

$I_{rel + Retinal}$ steht hierbei für die relative Stromstärke bei Inkubation unter retinalsupplementierten Bedingungen, $I_{rel - Retinal}$ für die relative Stromstärke bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal.

Das Verhältnis wird hier als Index für die Affinität zum Retinal angesehen, d.h. reziprok zur Zunahme des Index' nimmt die Affinität zum Kofaktor ab.

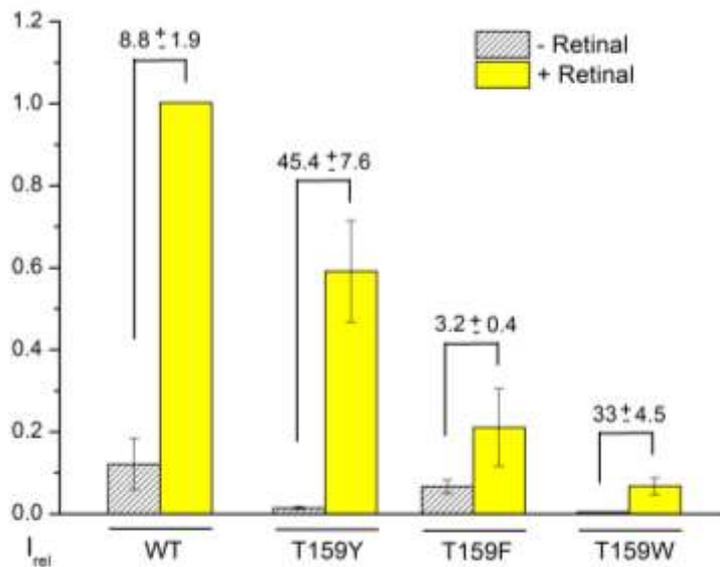


Abb. 69: Normierte lichtinduzierte Ströme von WT und T159Y/F/W

Die lichtinduzierten Stromamplituden wurden bei -100mV und Perfusion von ORI pH7.6 aufgezeichnet und normiert (ChR2-WT+Ret = 1). Das über den Klammern dargestellte Verhältnis von I_{+Ret}/I_{-Ret} steht als Index für die Retinalaffinität der Mutanten bzw. von ChR2-WT. Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm SD; $n \geq 6$.

Daraus ergibt sich, bezüglich der aromatischen Substitution, eine Reihe beginnend mit der geringsten Zunahme und höchsten Affinität:

$$\mathbf{T159F: 3.18 \pm 0.42 < T159W: 32.97 \pm 4.53 < T159Y: 45.39 \pm 7.62}$$

Die Reihe der Affinitäten entspricht der Reihe der Hydrophobizitätsindizes; demnach müsste Cystein, mit einem Wert von 0.04 eine ähnliche Affinität zu Retinal wie Tyrosin (0.02) haben.

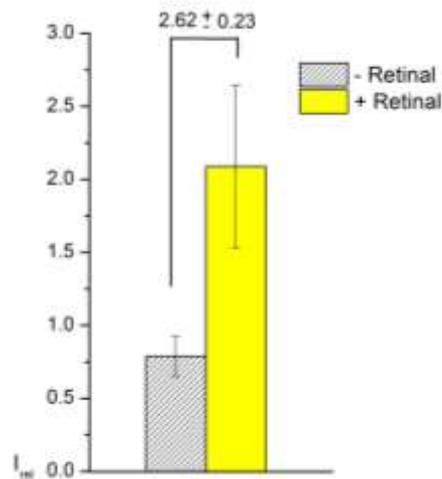


Abb. 70: Normierte lichtinduzierte Ströme von T159C in Abhängigkeit von Retinal

Die lichtinduzierten Stromamplituden wurden bei -100mV und Perfusion von ORi pH7.6 aufgezeichnet und normiert (Chr2-WT+Ret = 1). Das über den Klammern dargestellte Verhältnis von I_{+Ret}/I_{-Ret} steht als Index für die Retinalaffinität der Mutante bzw. von Chr2-WT. Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm SD; $n \geq 9$.

Nach Berechnung des Verhältnisses (Abb. 70) der erhaltenen Daten besitzt T159C mit 2.62 eine höhere Affinität als T159F, was den bisherigen Annahmen widerspricht. Cystein besitzt jedoch eine Schwefelgruppe und kann somit als gering hydrophob betrachtet werden und besitzt im Vergleich zu aromatischen Aminosäuren, eine verminderte räumliche Ausdehnung. Diese könnte sich, aufgrund der somit reduzierten räumlichen Konkurrenz zudem positiv auf die Bindeaffinität auswirken.

4.4 Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation

Die erhebliche Zunahme der lichtinduzierten Stromamplituden bei Retinalinkubation über Nacht, führten zu der Hypothese, dass das veränderte Apoprotein Chop2-T159Y / W / F in der Membran vorliegt, was sowohl durch fluoreszenzmikroskopische Daten als auch durch die Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation im Besonderen bestätigt wurde. Die Zunahme von 400% (T159Y, Abb. 25), 300% (T159W, Abb. 28) und 100% (T159F, Abb. 31) innerhalb von 15 Minuten kann nicht durch *de novo* Proteinsynthese erklärt werden, da dies ebenfalls bei WT-exprimierenden Zellen zu erwarten wäre.

Das Einfügen des Kofaktors geschieht vermutlich lateral über die Oozytenmembran. Sowohl von der cytoplasmatischen, als auch extrazellulären Seite sind sterische

Hinderungen durch die Sekundär- und Quartärstruktur zu erwarten. Des Weiteren wäre das Eindringen von all-*trans*-Retinal als hydrophobes Molekül aufgrund der, auf beiden Seiten der Membran vorhandenen, Wassermoleküle (Eisenhauer, Kuhne et al. 2012, Kato, Zhang et al. 2012) höchst unwahrscheinlich.

4.5 Proteinimmunoblot

Der Proteinimmunoblot (Abb. 37) machte deutlich, dass die generelle Expressionsstärke von T159Y / W / F und K257R/T159Y unabhängig von der Retinalverfügbarkeit war.

Im Falle von T159F war die Expressionsstärke mit der von WT - Retinal zu vergleichen. Fluoreszenzmikroskopische Daten zeigten jedoch stärkere Fluoreszenzintensitäten. Im Gegensatz dazu wurden bei elektrophysiologischen Messungen extrem verminderte Stromantworten aufgezeichnet. Es ist möglich, dass der geringe lichtaktivierte Strom durch die verminderte Leitfähigkeit des veränderten Kanal verursacht wurde. Des Weiteren ist es möglich, dass durch Einfügen einer aromatischen Aminosäure die Fluoreszenzintensität erhöht wurde.

T159C-exprimierende Oozyten zeigten, abhängig von der Retinalsupplementation der Inkubationsmedien, eine marginal veränderte Bandenstärke. Eine Stabilisierung des Proteins konnte jedoch durch Inkubation über Nacht (Abb. 33) und Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation (Abb. 34) ausgeschlossen werden. Denkbar ist eine zu lang gewählte Belichtungszeit, aufgrund der die Differenzen der Proteinmengen nicht unterschieden werden können.

Übereinstimmend mit fluoreszenzmikroskopischen Daten (Abb. 36) zeigten K257R/T159Y-exprimierende Oozyten geringe, aber deutlich sichtbare Banden, die trotz fehlender lichtaktivierter Ströme das Vorhandensein des mutierten Proteins in der Membranfraktion bestätigten. Aufgrund der Isolierung der Gesamtmembranfraktion der Zelle, ist eine Lokalisation bzw. Detektion von Chop2, vor allem bei retinalabhängiger Stabilität, in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums möglich. Bezüglich der Mutante K257R/T159Y belegen die in Abschnitt 3.4.4 vorgenommenen Messungen

jedoch eine, im Vergleich zu ChR2-WT-injizierten Oozyten, signifikant höhere, retinalunabhängige Leitfähigkeit für Gua⁺ bei pH10 (Abb. 60), was einer Lokalisation in der ER-Membran widerspricht.

Bei Inkubation in retinalfreiem Medium von WT-exprimierenden Zellen erscheint die vermutete Akkumulation des Proteins in der ER-Membran unwahrscheinlich, da dessen Detektion bei dem vorgenommenen Protokoll ebenfalls stattgefunden hätte.

4.6 Proteindegradation durch das ERAD-System

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abschnitt 1.6), sind Lysinreste die häufigsten Ubiquitinierungsstellen in der Aminosäuresequenz. Mit dem Ziel diese zu entfernen wurden ausgewählte Lysine der intrazellulären Loops zu Argininen mutiert. Der Bereich der intrazellulären Loops stellt die primäre „Angriffsfläche“ des ERAD-Systems dar. Da Transmembranproteine kotranslational in das ER bzw. dessen Membran gelangen, sind Transmembranhelices und extrazelluläre Bereiche für das System unzugänglich.

Die vorgenommenen Einzelmutationen wurden aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Daten (Abb. 39) als nicht-stabilisierend eingeordnet. Im Falle von ChR2-K194R (-Retinal) konnten im Vergleich zu ChR2-WT (-Retinal) höhere Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden. Die Inkubation bei retinalsupplementierter Lösung über Nacht hatte jedoch nur einen geringen Anstieg der lichtinduzierten Ströme zur Folge, vergleichbar zum Anstieg bei WT-injizierten Zellen, sowie der anderen Einzelmutanten (Abb. 40).

ChR2-K194R- und -K205R-exprimierende Oozyten zeigten außerdem verminderte lichtaktivierte Ströme bei Zugabe von Retinal, die etwa 50% des ChR2-WT-Stromes entsprachen (Abb. 40). Zusätzlich wurden bei Mutation von K205 deutlich verminderte Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet, die auf eine geringere Expression schließen ließen. Die Fluoreszenzstärke von K194R-injizierten Zellen entsprach in etwa WT-injizierten Zellen, was auf eine verminderte Leitfähigkeit hindeutete (Abb. 39).

Die Kombination der Einzelmutationen zu Tripel- oder 5-fach-Mutanten führte ebenfalls zu keinerlei Stabilisierung des Proteins. Obwohl im Falle der Tripel-Mutante geringfügig stärkere Fluoreszenzintensitäten ohne externes Retinal zu beobachten waren (Abb. 41), spiegelte sich dies nicht in der Größe der lichtaktivierten Ströme nach über-Nacht-Inkubation wider (Abb. 42).

Zusätzlich lag, bei Zugabe von Retinal, die Größe der lichtaktivierten Ströme bei 5-facher Mutation nur bei ca. 25% verglichen mit WT-exprimierenden Zellen. Dies deutet in Verbindung mit den nur schwachen Fluoreszenzintensitäten auf verminderte Expression und/oder auf verringerte Leitfähigkeiten hin (Abb. 41, Abb. 42).

Die weitere Verkürzung von ChR2 auf 282 AS und damit verbundene Eliminierung von YFP resultierte in einer um ca. 50% verminderten lichtinduzierten Stromantwort (Abb. 43). Der vorhandene C-Terminus beinhaltet, zusätzlich zum vorhandenen YFP, zwei weitere Lysine, die als putative Ubiquitinierungsstellen in Frage kommen. Aufgrund des fehlenden fluoreszenten Proteins kann keine Aussage über die Korrelation zwischen verminderter Stromantwort und Expressionsstärke getroffen werden. Neben der reduzierten Expressionsstärke ist es ebenfalls möglich, dass sich die drastische Verkürzung auf 282 AS negativ auf die Einzelkanalleitfähigkeit auswirkte und der resultierende Strom über der gesamten Oozytenmembran vermindert wurde.

Die beschriebenen Lysine stellen aufgrund dieser Ergebnisse wahrscheinlich keine Ubiquitinierungsstellen dar. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abschnitt 1.6), können auch Cysteine, Serine, Threonine oder AS des N-Terminus ubiquitiniert werden (Ciechanover and Ben-Saadon 2004, Cadwell and Coscoy 2005). Da der N-Terminus im extrazellulären, dem ERAD-System nicht zugänglichen, Bereich liegt, kann dieses Segment ausgeschlossen werden. ChR2 besitzt jedoch, laut Proteinsequenzvergleich (Abb. 16, Suzuki, Yamasaki et al. 2003), zwei Cysteine (C79, C208), drei Threonine (T78, T139, T202) und drei Serine (S77, S141, S146) in den intrazellulären Loops, die als Ubiquitinierungsstellen fungieren können.

Die hier ausgewählten Lysine wurden mit Hilfe des Alignments von Suzuki et al. (Abb. 16) identifiziert; Lysine, die hierbei in die intrazellulären Loops eingeordnet sind, wurden als putative ERAD-Angriffspunkte betrachtet. Nach Aufklärung der Struktur durch Kato et al.

konnte festgestellt werden, dass Lysin 194 in der Mitte von Helix 5 liegt, was sie als Angriffspunkt des ERAD-Systems unwahrscheinlich erscheinen lässt. Des Weiteren kann, aufgrund der Kristallstruktur, Serin 136 im Loop zwischen Helix 3 und 4 als weitere putative Ubiquitinierungsstelle vermutet werden.

Eine Modifikation der genannten AS könnte zu einem detaillierteren Wissen der Stabilität bzw. des Abbaus durch das ERAD-System führen. Des Weiteren könnte der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren hinreichende Informationen über die Beteiligung des ERAD-Systems bezüglich der retinalabhängigen Stabilität von Chr2 liefern.

4.7 Guanidinium-Dunkelleitfähigkeit

Die Eigenschaft der pH-abhängigen Dunkelleitfähigkeit konnte für alle aromatisch substituierten Modifikationen erstmalig gezeigt werden; In der Literatur sind bisher keine vergleichbaren Eigenschaften in mikrobiellen Rhodopsinen beschrieben worden.

Das Guanidiniumion (Gua^+) trägt seine positive Ladung über die räumliche Ausdehnung des Moleküls verteilt (ca. $5\text{\AA} \times 3\text{\AA}$; persönliche Kommunikation, Prof. Dr. Thomas Müller).

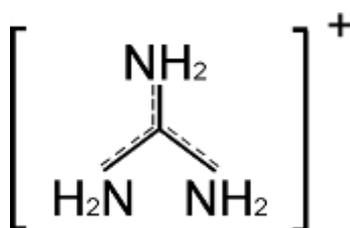


Abb. 71: Ladungsverteilung des Guanidinium-Ions

Im Gegensatz dazu ist die Ladungsverteilung beispielsweise bei K^+ , Na^+ oder Li^+ aufgrund ihrer Größe punktuell anzusehen (siehe Tab. 12).

Ion	Radius [Å]	$\Delta H^\circ_{\text{hydratation}}$ [kcal/mol]
Li ⁺	0.60	-131
Na ⁺	0.95	-105
K ⁺	1.33	-85
Ca ²⁺	0.99	-397
Cl ⁻	1.81	-82

Tab. 12: Ionenradien und Standardenthalpien der Hydratation nach Pauling
Entnommen aus Hille 2001

Die Verteilung der Ladung bei Gua⁺ resultiert in einer verminderten (De)Hydratisierungsenergie ($\Delta H^\circ_{\text{hydratation}}$), die aufgewendet werden muss, damit Kationen ohne umgebende Hydrathülle durch die Pore von Chr2 gelangen können. $\Delta H^\circ_{\text{hydratation}}$ verhält sich umgekehrt proportional zum Ionenradius und folglich zur Ladungsdichte.

Von Gua⁺ wird angenommen, dass die Ladungsdichte etwa 1/3 der Ladungsdichte von Cl⁻ beträgt, dessen $\Delta H^\circ_{\text{hydratation}}$ mit -82kcal/mol sehr gering ausfällt, somit besitzt Gua⁺ eine der schwächsten, bekannten Hydratisierungsstrukturen (Hille 2001, Mason, Neilson et al. 2003).

Aufgrund seiner Molekularstruktur mit delokalisierten π -Elektronen, besitzt Gua⁺ schwache hydrophobe Eigenschaften, die zur Interaktion, vor allem mit aromatischen oder apolaren Seitenketten von Aminosäuren, beitragen (Mason, Neilson et al. 2004, Mason, Dempsey et al. 2005). Infolge dieser Tatsache wäre ein Durchqueren des Proteins von Gua⁺ auf alternativem Wege denkbar.

Zur pH-Abhängigkeit des Dunkelstromes werden zwei Hypothesen postuliert:

1.) pH-Sensor

Da der lichtunabhängige Strom mit steigendem pH-Wert zunimmt, wurde angenommen, dass in der extrazellulären Porenregion eine basische Aminosäure vorhanden ist, die bei Verringerung der Protonenkonzentration deprotoniert

4.7.1 Überprüfung der Hypothesen

4.7.1.1 Putative pH-Sensoren

Da die Modifikation ausgewählter AS zu keinerlei pH-unabhängigen Gua^+ -Strömen führte, konnte die Hypothese eines pH-Sensors (siehe Abschnitt 4.7) nicht eindeutig bestätigt werden.

Die Expressionsstärke aller Mutanten weist in Kombination mit T159Y aufgrund geringer YFP-Signale (Abb. 63, Abb. 65, Abb. 67) auf eine starke Reduktion hin, was ebenfalls durch die lichtaktivierten Ströme verdeutlicht wird.

Die verminderte Expressionsstärke wird zusätzlich durch das Fehlen von lichtunabhängigen Strömen, bei Perfusion mit einer guanidiniumhaltigen Lösung bei pH 10 untermauert; somit kann keine eindeutige Aussage über die pH-Sensitivität der genannten AS getroffen werden.

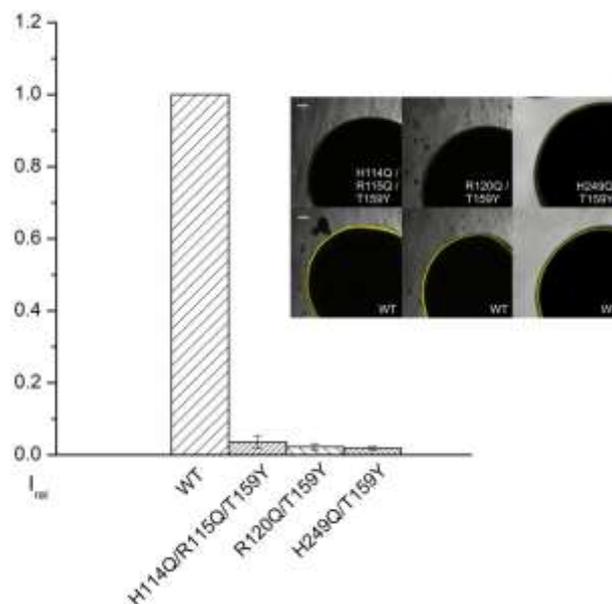


Abb. 73: Normierte lichtaktivierte Ströme der putativen pH-Sensoren

Injizierte Oozyten wurden unter retinalsupplementierten Bedingungen inkubiert. Lichtaktivierte Ströme wurden bei -100mV und Perfusion von ORI pH7.6 aufgezeichnet und normiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert ($n \geq 6$). Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von $100\mu\text{m}$

In Abb. 73 sind die normierten, lichtinduzierten Ströme und Fluoreszenzintensitäten der putativen pH-Sensoren unter retinalsupplementierten Bedingungen dargestellt. Bei

Oozyten, die unter retinalfreien Bedingungen inkubiert wurden, konnten keine lichtaktivierten Ströme aufgezeichnet werden.

Die minimale Expression deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren für die strukturelle oder funktionelle Integrität kritische sind. Bei Aufklärung der Struktur konnten Lys115 und Arg120 als Teil der äußeren (extrazellulären) Porenregion identifiziert werden. Bei Mutation von, in mikrobiellen Rhodopsinen hochkonserviertem, Arg120 zu Alanin konnten Kato et al. trotz starken Fluoreszenzsignals in der Membran keine lichtaktivierten Ströme aufzeichnen, was dessen Relevanz für die Funktionalität unterstreicht (Kato, Zhang et al. 2012).

H249 wurde bisher nicht als kritische Aminosäure beschrieben.

Bei Aufklärung der Struktur durch Kato et al. konnten weitere putative pH-Sensoren identifiziert werden; K93 der zweiten Transmembranhelix ist sowohl in *Chlamydomonas*, als auch in *Volvox* konserviert und bildet mit anderen polaren Resten die Porenoberfläche, die in Kontakt mit von der extrazellulären Seite eingewanderten Wassermolekülen steht (Eisenhauer, Kuhne et al. 2012). Aufgrund der Lage im Inneren der Pore haben Änderungen des pH-Wertes der extrazellulären Seite keinen direkten Einfluss auf den Protonierungsstatus des Lysins. Denkbar wäre eine Übertragung von Änderungen des äußeren pH-Wertes durch extrazellulär gelegene AS, deren veränderter Protonierungsstatus sich bis ins Innere der Pore auf K93 übertragen könnte. Des Weiteren gilt K93 als putativer Protonenakzeptor hinsichtlich der Hypothese der Deprotonierung der Schiff´ Base (siehe Absatz 4.7). Eine Modifikation von K93 zu einer AS ohne protonierbaren Rest könnte zur Klärung dieser Annahme beitragen.

Lysin 103 wurde bisher Transmembranhelix 2 zugeordnet (Suzuki, Yamasaki et al. 2003); nach Aufklärung der Struktur wurde diese AS dem Loop zwischen TM2 und 3 zugeordnet (Kato, Zhang et al. 2012) und stellt theoretisch einen weiteren putativen pH-Sensor dar.

4.7.1.2 Deprotonierung der Schiff´ Base

Bei wildtypischem ChR2 wird bei Belichtung und dem folgenden Durchlaufen des Photozyklus die im Dunkelzustand protoniert vorliegende Schiff´ Base deprotoniert. Das

Proton wird an den postulierten Akzeptor E123 (Bamann, Kirsch et al. 2008) bzw. D253 (Kato, Zhang et al. 2012) und schließlich in das extrazelluläre Medium abgegeben. Die Reprotonierung der Schiff'Base geschieht von der cytoplasmatischen Seite aus über den postulierten Protonendonator H134.

Bei Abgabe des Protons von Gua⁺ an einen Akzeptor (K93, E123 oder D253), der Weitergabe auf „regulärem“ Weg in den extrazellulären Raum und der darauf folgenden Reprotonierung der Schiff' Base aus dem Cytoplasma wäre der resultierende Strom OnA. Die Annahme der Hypothese kann somit nicht gänzlich korrekt sein. Da sich innerhalb des Proteins Wassermoleküle befinden ist eine Interaktion der beteiligten AS mit diesen nicht ausgeschlossen und infolgedessen eine Reprotonierung zur Folge haben.

Die übereinstimmenden lichtunabhängigen Stromverläufe von K257R/T159Y und T159Y, bzw. die geringe zusätzliche Auswirkung der Substitution von Lysin (K) zu Arginin (R) (abgesehen vom Unvermögen Retinal zu binden) ist vermutlich in den vergleichbaren chemischen und physikalischen Eigenschaften der beiden basischen Aminosäuren begründet. Arginin besitzt ebenfalls eine Seitenkette mit protonierbarem Rest, dessen Proton vom ungeladenen Guanidinium aufgenommen werden könnte und infolgedessen der resultierende Dunkelstrom beobachtet werden kann.

Eine Substitution zu Alanin (A) oder Glutamin (Q) stellt eine erheblichere Modifikation dar, da der Charakter der eingefügten AS zu neutral verändert wird und nunmehr keine protonierbare Seitenkette mehr vorliegt. Die Fluoreszenzen bei Retinalsupplementation wiesen, im Falle von K257A/T159Y deutliche, bei K257Q/T159Y nur schwache, Signale auf; die Dunkelleitfähigkeit für Gua⁺ konnte bei pH 10 in beiden Fällen nicht bestätigt werden (Abb. 74).

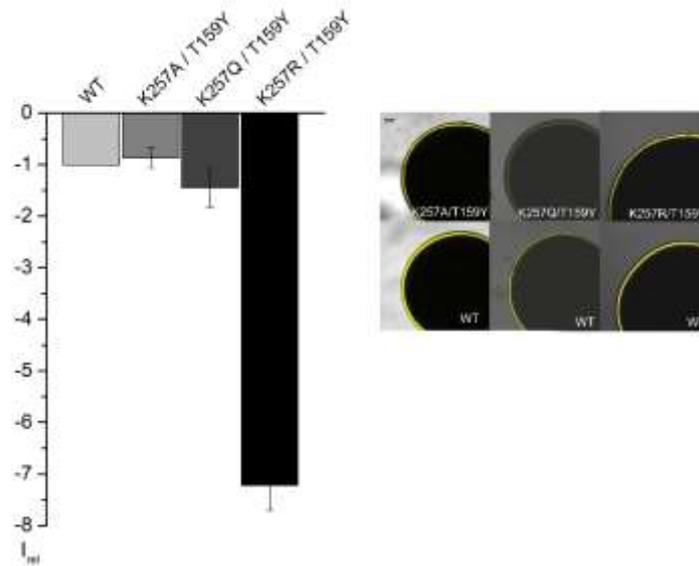


Abb. 74: Balkendiagramm und Fluoreszenzen von K257A/T159Y, K257Q/T159Y und K257R/T159Y
Die erhobenen Daten (Perfusion Gua^+ pH10, $V_m = -130\text{mV}$) wurden normiert und negativiert; Die Aufnahme der abgebildeten Oozyten fand an zwei unterschiedlichen Tagen statt; der abgebildete WT entspricht der jeweiligen Mutante. Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von $100\mu\text{m}$; Dargestellt ist das arithmetische Mittel \pm SD; $n \geq 3$

Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass die Dunkelleitfähigkeit, hervorgerufen durch T159Y, in Verbindung mit der Schiff' Base bzw. der Aminosäure 257 steht. Trotz des Unvermögens eine Schiff' Base auszubilden ist durch das Einfügen von Arginin eine positive Ladung vorhanden, die von Gua aufgenommen werden kann. Das Entfernen der positiven Ladung durch Einfügen von Alanin oder Glutamin, führte zum Ausbleiben des pH-abhängigen Dunkelstroms (Abb. 74).

4.7.2 T159Y/F/W und der Einfluss von Retinal

Die Zugabe von all-*trans*-Retinal bei T159F-injizierten Oozyten bewirkte eine Reduktion der Dunkelleitfähigkeit für Gua^+ (Abb. 57, Tab. 11). Die Substitution durch Tyrosin und Tryptophan an Position 159 hatte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Dunkelstroms in Abhängigkeit vom gebundenen Kofaktor zur Folge (Abb. 52, Abb. 55). Diese Beobachtung impliziert einen Mechanismus der Gua^+ -Leitfähigkeit, der – im Falle von T159F – bei gebundenem Retinal nicht zugänglich ist.

Die Betrachtung der Kristallstruktur legt die Vermutung nahe, dass die Nähe zur benachbarten Aminosäure D156 eine Interaktion zwischen D156 und der aromatischen Substitution an Position 159 zur Folge haben kann. Aufgrund seiner elektronenziehenden Eigenschaft könnte D156 π -Elektronen an sich ziehen und so die partiell polaren AS Tyrosin und Tryptophan koordinieren, was das Entstehen einer zusätzlichen, alternativen Pore zur Folge haben könnte. Bei Einfügen von F an Position 159 fände diese Koordination infolge seiner chemischen Eigenschaften nicht statt, sodass dieser Weg durch die Bindung des Kofaktors versperrt ist. Diese Hypothese würde die Existenz von zwei Poren zur Folge haben. Dies wird durch die verminderten Leitfähigkeiten von T159F –Retinal unterstützt (Abb. 57, Tab. 11).

Die Theorie der Deprotonierung der Schiff' Base (siehe 4.7, Abschnitt 2) wäre bei Existenz zweier Poren jedoch hinfällig, da die Mutante T159F unabhängig von der Bindung des Kofaktors, eine Dunkelleitfähigkeit aufweisen müsste. Eine Modifikation von D156 zu einer AS ohne elektronenziehende Eigenschaften, wie z.B. Phenylalanin, könnte in Kombination mit T159Y einen tieferen Einblick in diese Hypothese gewähren. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die genannten Annahmen auf der Kristallstruktur der C1C2-Chimäre beruhen, deren TM1-5 der Bestandteil von ChR1 sind und nur TM6 und 7 Bestandteil von ChR2 sind. Außerdem stellt die Kristallstruktur eine „Momentaufnahme“ eines Proteins dar, deren mobiler Charakter nicht berücksichtigt werden kann. Hinsichtlich der Leitfähigkeiten bei Vorhandensein von zwei Poren ist ausserdem zu berücksichtigen, dass es sich hier nicht um Einzelkanalleitfähigkeiten des Kanals handelt, sondern um Leitfähigkeiten die gesamte Oozyte betreffend; hierbei müssen Anzahl der Moleküle in der Membran, sowie deren eingeschränkte Aktivierung durch die Belichtung mittels Lichtleiter in Betracht gezogen werden.

5. Zusammenfassung

Channelrhodopsin 2 (ChR2) aus dem Augenfleck von *C. reinhardtii* gehört zur Gruppe der mikrobiellen Rhodopsine (Typ1-Rhodopsine). ChR2 besteht aus einem extrazellulär gelegenen N-Terminus, 7 Transmembranhelices und einem zytosolisch gelegenen C-Terminus. Der lichtreaktive Bestandteil (Chromophor) all-*trans*-Retinal ist via Schiff' Base kovalent an ein Lysinrest der siebten Transmembranhelix gebunden. Bei Applikation von Blaulicht isomerisiert all-*trans*- zu 13-*cis*-Retinal, was in einer Konformationsänderung und dem Öffnen des Kanals resultiert. Abhängig vom elektrochemischen Gradienten können ein- und zweiwertige Kationen in die Zelle ein- oder aus der Zelle herausströmen.

Eine retinalabhängige Stabilität konnte bereits für Bakteriorhodopsin (BR) bestätigt werden (Booth, Farooq et al. 1996, Turner, Chittiboyina et al. 2009, Curnow and Booth 2010), bezüglich ChR2 waren bisher nur wenige Daten verfügbar (Hegemann, Gartner et al. 1991, Lawson, Zacks et al. 1991). Die heterologe Expression von wildtypischem und modifiziertem ChR2 in Oozyten von *X. laevis* erlaubte einen detaillierteren Einblick in die retinalabhängige Stabilität und pH-abhängige Dunkelleitfähigkeit von Guanidinium.

5.1 Retinalabhängigkeit

Wildtypisches Chop2 zeigte bei Zugabe von Retinal zum Inkubationsmedium, direkt nach RNA-Injektion, Stromamplituden im μ A-Bereich und deutliche Fluoreszenzintensitäten. Ausschließlich endogen vorhandenes Retinal hatte verminderten Fluoreszenzen und Stromamplituden zur Folge, was auf ein geringes Vorhandensein von Chop2-Proteinen in der Plasmamembran hindeutete. Da die Inkubation über Nacht in retinalsupplementierter Lösung nur eine minimale Erhöhung des resultierenden Stromes erbrachte, deuten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stark auf eine verminderte Stabilität des Proteins bei fehlender Bindung des Kofaktors Retinal.

Zusammenfassung

Das Einfügen einer aromatischen Aminosäure (Y/F/W) an Position 159 führte zu einer, von der Retinalsupplementation unabhängigen, in beiden Ansätzen gleichwertigen Expressionsstärke. Diese äusserte sich in äquivalenten Fluoreszenzintensitäten. Die erhaltenen Stromamplituden wiesen eine starke Differenz auf: ohne Zugabe zusätzlichen Chromophors lag die Stromstärke bei nur wenigen Nanoampere, die bei Inkubation in einer retinalhaltigen Lösung über Nacht auf das Niveau von retinalsupplementierten Oozyten anstieg. Des Weiteren konnte die Zunahme der Stromamplitude innerhalb von 15 Minuten beobachtet werden, wenn die vermessenen Oozyten mit einer retinalhaltigen Lösung perfundiert wurden. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse auf eine Stabilisierung des aromatisch substituierten Proteins hin. Bei der von Berndt et al. (2011) beschriebenen Mutante T159C konnten diese Eigenschaften nicht nachgewiesen werden.

Die Modifikation der Retinalbindestelle (K257) in Verbindung mit einer aromatischen Substitution an Position 159 resultierte in deutlichen Fluoreszenzintensitäten, unabhängig von der Retinalverfügbarkeit bei, in beiden Fällen, fehlenden lichtaktivierten Strömen. Diese und die gleichwertigen Bandenstärken des Proteinimmunoblots von aromatisch substituierten Chr2-Varianten unterstützen die Hypothese der retinalunabhängigen Stabilität zusätzlich.

Die Ergebnisse legen, im Falle von Chop2-WT, eine Degradation des Apoproteins nahe. Bei Einfügen einer aromatischen AS an Position 159 ist das Apoprotein davor geschützt (siehe Abb. 75). Infolge der strukturellen Similarität, dem Vorhandensein delokalisierter π -Elektronen und der räumlichen Größe der aromatischen AS ist eine strukturelle Veränderung des Apoproteins denkbar, die eine Degradation aufgrund von nunmehr unzugänglichen Ubiquitinierungsstellen verhindert.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass sich bei fehlender Bindung des Kofaktors Wassermoleküle in der Nähe der Bindetasche befinden, welche von umliegenden Aminosäuren (u.a. T159, D156) unter großem Energieaufwand koordiniert werden und die strukturelle Integrität bis hin zur Degradation beeinträchtigen können. Dies könnte

Zusammenfassung

durch eine Erhöhung der Hydrophobizität bei Einfügen einer aromatischen Aminosäure verhindert werden.

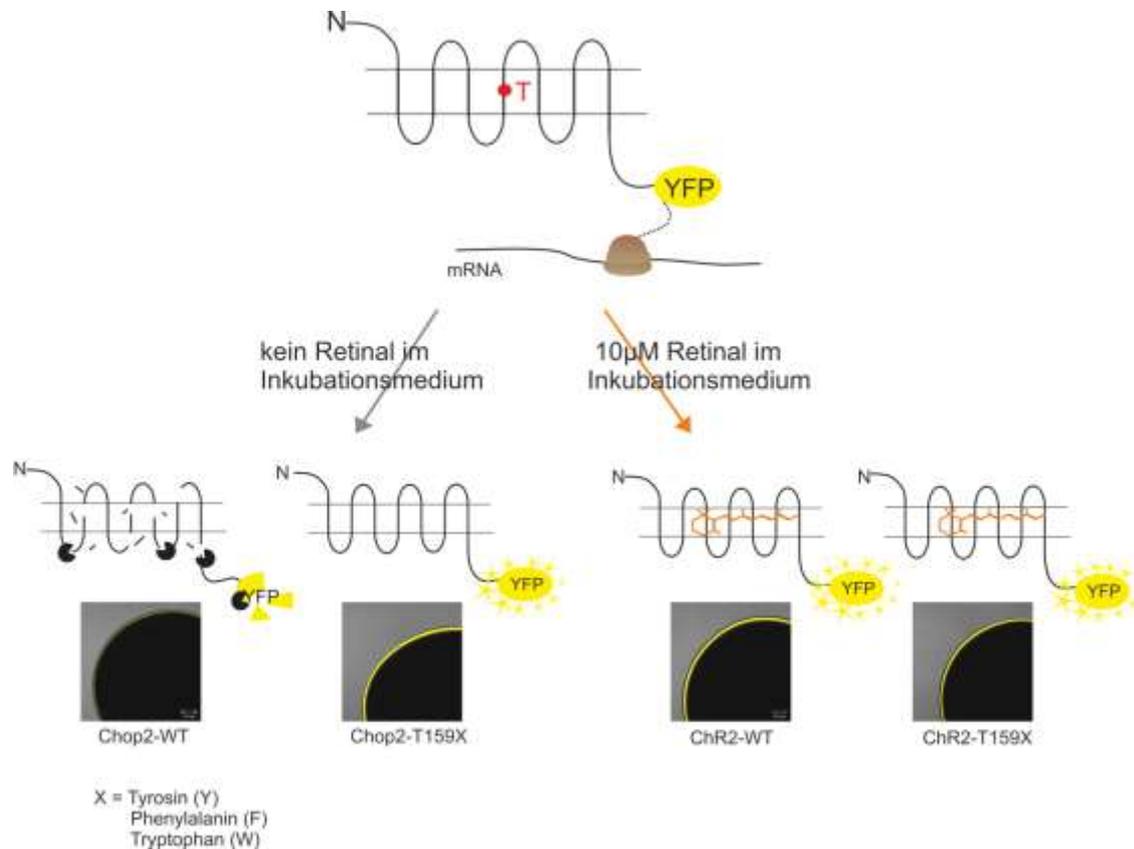


Abb. 75: Skizzierte Übersicht der retinalabhängigen und -unabhängigen Stabilität von Chop2

5.2 Guanidiniumleitfähigkeit

Bei Substitutionen durch eine aromatische AS (Y/W/F) an Position 159 zeigte sich ein weiteres, bisher nicht beschriebenes, Charakteristikum. Bei Perfusion der Oozyten mit einer guanidiniumhaltigen Lösung, konnten in Abhängigkeit des pH-Wertes ohne die Applikation von Licht Stöme im μA -Bereich aufgezeichnet werden. Die Größe der Stromamplitude korreliert hierbei mit dem Anstieg des pH-Wertes und der Konzentration an Guanidiniumionen der perfundierten Lösung und kann durch das Hinzufügen von 1mM Lanthan reversibel geblockt werden. Des Weiteren konnten die

Zusammenfassung

vorgenommenen Messungen die Ergebnisse der retinalabhängigen Degradation verifizieren, da der Einstrom von Gua⁺ sowohl bei retinalsupplementierter Inkubation, als auch bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal zu beobachten war. Des Weiteren zeigte auch die Doppelmutante T159Y/K257R trotz ihres Unvermögens Retinal zu binden, die beschriebenen lichtunabhängigen Ströme.

Die Ergebnisse bei Substitution durch Phenylalanin (F) stellen eine Abweichung des Musters dar. Bei Inkubation von T159F-injizierten Zellen bei ausschließlich endogen vorhandenem Retinal konnte eine stark erhöhte Guanidiniumleitfähigkeit festgestellt werden, diese kam jedoch bei retinalsupplementierter Inkubation nicht zum Tragen. Dies könnte ein Hinweis auf eine sterische Hinderung durch das gebundene Chromophor sein, die bei den Substitutionen durch Tyrosin und Tryptophan, möglicherweise durch unterschiedliche chemische Eigenschaften der AS, nicht auftreten.

Die hervorgerufene pH-Abhängigkeit kann in zwei möglichen Ursachen begründet liegen:

- Vorhandensein einer (de)protonierbaren Gruppe wie Histidin, Arginin oder Lysin, die als pH-Sensor dienen könnte
- Deprotonierung der Schiff´ Base durch Guanidinium

Das Vorhandensein eines pH-Sensors konnte durch die vorgenommenen Modifikationen von H114, R115, R120 und H249 nicht bestätigt werden.

Bei Substitution von K257 (in Verbindung mit T159Y) zu Arginin (R) konnte weiterhin ein pH-abhängiger Gua⁺-Dunkelstrom festgestellt werden. Die Modifikation zu Alanin (A) oder Glutamin (Q) hingegen resultierte im Ausbleiben der Ströme. Der Austausch einer basischen zu einer neutralen Gruppe ohne protonierbaren Rest deutet auf die Beteiligung der Schiff´ Base bzw. der Aminosäure an Position 257 am Mechanismus der Dunkelleitfähigkeit hin.

6. Summary

Channelrhodopsin 2 (ChR2) from the eyespot of *C. reinhardtii* belongs to the group of microbial-type rhodopsins (Type1-rhodopsins). It consists of an extracellular N-terminus, seven transmembranehelices and a cytosolic C-terminus. The light-reactive element (Chromophor) all-*trans*-retinal is covalently bound to a lysine of the seventh transmembrane helix via Schiff' Base. The isomerisation from all-*trans*- to 13-*cis*-Retinal after illumination leads to a conformational change within the protein, resulting in the opening of the channel and thereby in an in- or efflux of mono- and divalent cations, depending on the electrochemical gradient.

For bacteriorhodopsin (BR) a retinal dependent stability could be confirmed (Booth, Farooq et al. 1996, Turner, Chittiboyina et al. 2009, Curnow and Booth 2010), concerning ChR2 only limited data is available (Hegemann, Gartner et al. 1991, Lawson, Zacks et al. 1991). Heterologous expression of wildtype (WT) and mutant ChR2 in the oocytes of *X. laevis* revealed a more detailed insight into retinal dependent stability and pH-dependent conductance of guanidinium without the application of light.

6.1 Retinaldependence

Supplementation of retinal to the incubation medium directly after RNA- injection of Chop2-WT results in current amplitudes of several μA and strong fluorescence intensities. Incubation of oocytes without the addition of external retinal reveals only limited fluorescence intensities and current amplitudes, pointing to small amounts of Chop2-protein in the plasmamembrane. Since over-night incubation in retinal-supplemented media resulted in only a marginal increase of light-activated currents, the results obtained in this study strongly indicate a reduced stability of the protein in the absence of the bound cofactor retinal.

Summary

Substitution of threonine 159 to an aromatic amino acid (Y/F/W) leads to a retinal-independent protein expression. Fluorescence intensities were comparable but current amplitudes revealed a strong difference, depending on retinal availability. Incubation of oocytes in retinal-containing solution over night resulted in light activated currents comparable to oocytes incubated in retinal-supplemented media since RNA-injection. Furthermore within 15 minutes the increase of current amplitudes could be observed when perfusing injected oocytes with retinal-containing solution.

Berndt et al. (2011) described the mutant ChR2-T159C with elevated current amplitudes; retinal-independent stability could not be proven for this substitution.

Modifications of the retinal binding site (K257), leading to the incapability of retinal-binding, in combination with an aromatic substitution at position 159 resulted in retinal-independent fluorescence intensities. These and the equivalent band strengths of Proteinimmunoblots of aromatically substituted ChR2 variants further support the hypothesis of retinal-independent stability.

The results in respect to Chop2-WT are pointing to a degradation of the apoprotein. The insertion of an aromatic amino acid at position 159 leads to the protection from degradation of the apoprotein (see Fig. 76).

Due to the structural similarity, the presence of delocalized π -electrons and the spatial size of the aromatic amino acid, a structural change of the apoprotein is conceivable, leading to now inaccessible ubiquitilation sites and thereby preventing degradation.

Furthermore, there is the possibility that in the absence of the cofactor water molecules are existing in the vicinity of the binding site. These could be coordinated with great energy expenditure by surrounding amino acids (including T159 and D156), and may compromise the structural integrity of Chop2 up to its degradation. This could be prevented by increasing the hydrophobicity upon insertion of an aromatic amino acid.

Summary

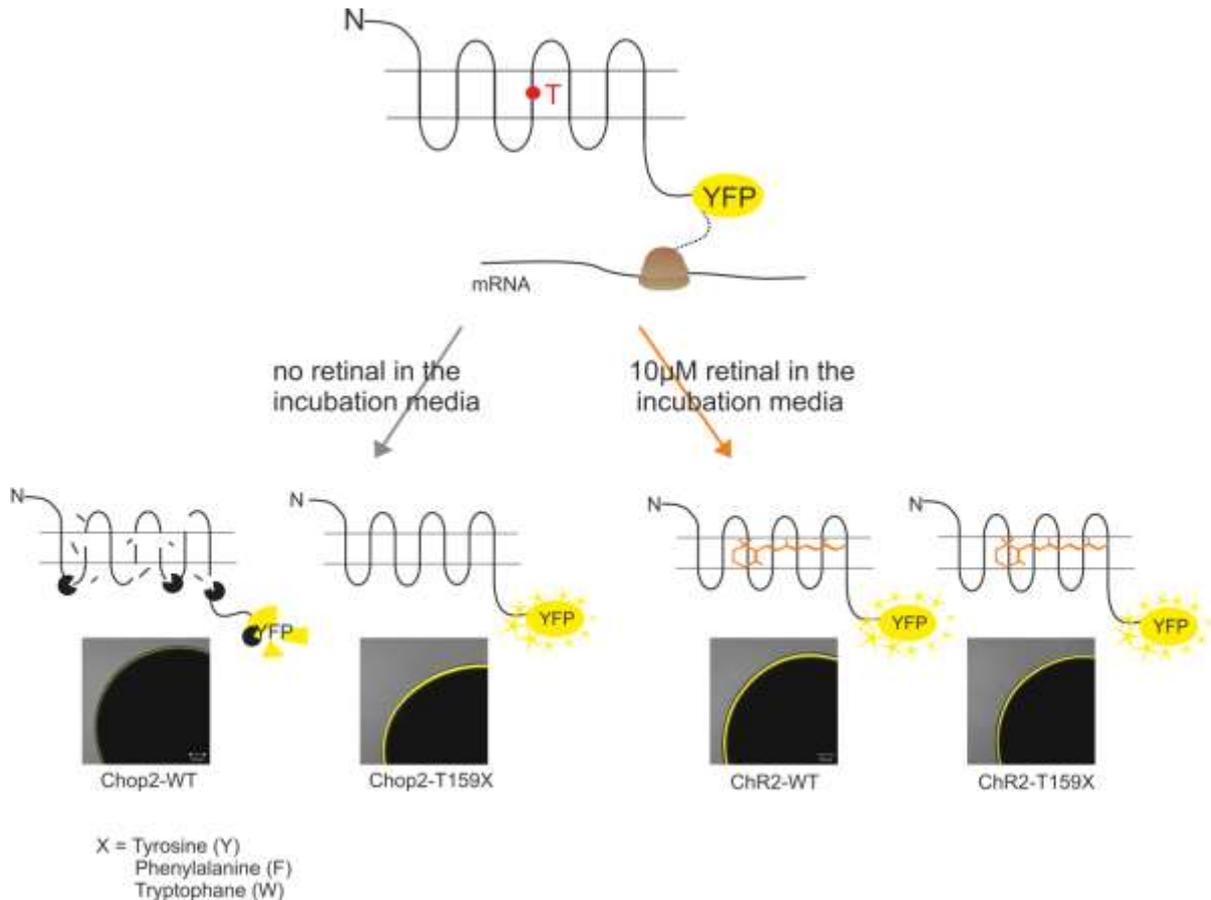


Fig. 76: Schematic overview of the retinal-dependent and -independent Stability of Chop2

6.2 Guanidine conductance

With the substitution to an aromatic amino acid (Y/F/W) at position 159, a guanidine (Gua^+) conductance could be observed. Without the application of light and at high pH-values current amplitude in the range of μA could be observed when perfusing the oocyte with guanidine containing solution. Current amplitude correlates with pH-values and guanidine concentration and can be reversibly blocked by the addition of 1mM Lanthanum. Furthermore, the results of retinal dependent degradation could be verified, since the influx of Gua^+ could be observed in oocytes incubated in retinal containing incubation media as well as with only oocyte-endogenous retinal. Furthermore, the double mutant T159Y/K257R also showed light-independent currents, despite its inability to bind retinal.

Summary

When exchanging T159 to phenylalanine dark currents could only be observed when oocytes were incubated in retinal-free incubation media. The addition of the chromophore to the incubation media resulted in the depletion of the dark currents. This findings could be due to the steric hindrance caused by the bound cofactor, which are not emerging at substitutions by tyrosine and tryptophane, possibly due to different chemical properties of the amino acids.

The observed pH-dependency might be explained by two reasons:

- Existence of a (de)protonatable group like histidine, arginine or lysine, which might serve as pH-sensor
- Deprotonation of the Schiff' Base by guanidine

The existence of a pH-sensor could not be confirmed by mutagenesis of H114, R115, R120 and K249.

The substitution of K257 to arginine (in combination with T159Y) still revealed a pH-dependent dark current of Gua⁺. Modifications at that position to alanine (A) or glutamine (Q) resulted in the depletion of the dark currents, probably due to the exchange from a basic to a neutral amino acid without protonatable side chain, suggesting the involvement of the schiff' base and the amino acid at position 257 respectively, in the mechanism of dark conductivity.

Referenzen

Azuma, M., T. Irie and T. Seki (1993). "Retinals and retinols induced by estrogen in the blood plasma of *Xenopus laevis*." J Exp Biol **178**: 89-96.

Azuma, M., T. Seki and S. Fujishita (1988). "Formation of visual pigment chromophores during the development of *Xenopus laevis*." Vision Res **28**(9): 959-964.

Bamann, C., R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel and E. Bamberg (2010). "Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond." Biochemistry **49**(2): 267-278.

Bamann, C., T. Kirsch, G. Nagel and E. Bamberg (2008). "Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function." Journal of Molecular Biology **375**(3): 686-694.

Bamberg, E., P. Hegemann and D. Oesterhelt (1984). "Reconstitution of halorhodopsin in black lipid membranes." Prog Clin Biol Res **164**: 73-79.

Bamberg, E., J. Tittor and D. Oesterhelt (1993). "Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 639-643.

Bayley, H., K. S. Huang, R. Radhakrishnan, A. H. Ross, Y. Takagaki and H. G. Khorana (1981). "Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2225-2229.

Berndt, A., P. Schoenenberger, J. Mattis, K. M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann and T. G. Oertner (2011). "High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(18): 7595-7600.

Berndt, A., O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann and K. Deisseroth (2009). "Bi-stable neural state switches." Nat Neurosci **12**(2): 229-234.

Referenzen

Berthold, P., S. P. Tsunoda, O. P. Ernst, W. Mages, D. Gradmann and P. Hegemann (2008). "Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization." Plant Cell **20**(6): 1665-1677.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.

Blomhoff, R., M. H. Green, J. B. Green, T. Berg and K. R. Norum (1991). "Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage." Physiol Rev **71**(4): 951-990.

Booth, P. J., A. Farooq and S. L. Flitsch (1996). "Retinal binding during folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin." Biochemistry **35**(18): 5902-5909.

Boucek, M. M. and R. Snyderman (1976). "Calcium Influx Requirement for Human Neutrophil Chemotaxis - Inhibition by Lanthanum Chloride." Science **193**(4256): 905-907.

Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-1268.

Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark and et al. (1988). "Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles." Science **240**(4858): 1534-1538.

Britton, G. (1995). "Structure and properties of carotenoids in relation to function." Faseb Journal **9**(15): 1551-1558.

Butt, H. J., K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor and D. Oesterhelt (1989). "Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump." EMBO J **8**(6): 1657-1663.

Referenzen

Cadwell, K. and L. Coscoy (2005). "Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase." Science **309**(5731): 127-130.

Ciechanover, A. and R. Ben-Saadon (2004). "N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in." Trends Cell Biol **14**(3): 103-106.

Claessen, J. H., L. Kundrat and H. L. Ploegh (2012). "Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook." Trends Cell Biol **22**(1): 22-32.

Cole, K. S. (1949). "Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane." Archives Des Sciences Physiologiques **3**(2): 253-258.

Cole, K. S. and H. J. Curtis (1939). "Electric Impedance of the Squid Giant Axon during Activity." J Gen Physiol **22**(5): 649-670.

Crosas, B., D. J. Hyndman, O. Gallego, S. Martras, X. Pares, T. G. Flynn and J. Farres (2003). "Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism." Biochem J **373**(Pt 3): 973-979.

Curnow, P. and P. J. Booth (2010). "The contribution of a covalently bound cofactor to the folding and thermodynamic stability of an integral membrane protein." Journal of Molecular Biology **403**(4): 630-642.

de Felipe, P., G. A. Luke, L. E. Hughes, D. Gani, C. Halpin and M. D. Ryan (2006). "E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein." Trends Biotechnol **24**(2): 68-75.

Dencher, N. A. and M. P. Heyn (1979). "Bacteriorhodopsin monomers pump protons." FEBS Lett **108**(2): 307-310.

Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.

Donnelly, M. L., G. Luke, A. Mehrotra, X. Li, L. E. Hughes, D. Gani and M. D. Ryan (2001). "Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a

Referenzen

proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'." J Gen Virol **82**(Pt 5): 1013-1025.

Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." J Morphol **136**(2): 153-179.

Eisenberg, D., R. M. Weiss, T. C. Terwilliger and W. Wilcox (1982). "Hydrophobic Moments and Protein Structure." Faraday Symp. Chem. Soc **17**: 109-120.

Eisenhauer, K., J. Kuhne, E. Ritter, A. Berndt, S. Wolf, E. Freier, F. Bartl, P. Hegemann and K. Gerwert (2012). "In channelrhodopsin-2 Glu-90 is crucial for ion selectivity and is deprotonated during the photocycle." Journal of Biological Chemistry **287**(9): 6904-6911.

Findlay, D., D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin and C. A. Ross (1962). "The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 7. The catalytic mechanism." Biochem J **85**(1): 152-153.

Finkel, A. S. and S. J. Redman (1985). Optimal Voltage Clamping with Single Microelectrode, in Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes. Baltimore, Williams and Wilkins.

Gerwert, K., B. Hess, J. Soppa and D. Oesterhelt (1989). "Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 4943-4947.

Goodman, D. W., H. S. Huang and T. Shiratori (1965). "Tissue Distribution and Metabolism of Newly Absorbed Vitamin a in the Rat." J Lipid Res **6**: 390-396.

Govorunova, E. G., K. H. Jung, O. A. Sineshchekov and J. L. Spudich (2004). "Chlamydomonas sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses." Biophys J **86**(4): 2342-2349.

Gradmann, D., A. Berndt, F. Schneider and P. Hegemann (2011). "Rectification of the channelrhodopsin early conductance." Biophys J **101**(5): 1057-1068.

Referenzen

- Greenhalgh, D. A., D. L. Farrens, S. Subramaniam and H. G. Khorana (1993). "Hydrophobic amino acids in the retinal-binding pocket of bacteriorhodopsin." Journal of Biological Chemistry **268**(27): 20305-20311.
- Gunaydin, L. A., O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth and P. Hegemann (2010). "Ultrafast optogenetic control." Nat Neurosci **13**(3): 387-392.
- Haglund, K., P. P. Di Fiore and I. Dikic (2003). "Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis." Trends Biochem Sci **28**(11): 598-603.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches." Pflugers Archiv-European Journal of Physiology **391**(2): 85-100.
- Havelka, W. A., R. Henderson, J. A. Heymann and D. Oesterhelt (1993). "Projection structure of halorhodopsin from Halobacterium halobium at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy." Journal of Molecular Biology **234**(3): 837-846.
- Hegemann, P. (2008). "Algal sensory photoreceptors." Annu Rev Plant Biol **59**: 167-189.
- Hegemann, P., W. Gartner and R. Uhl (1991). "All-trans retinal constitutes the functional chromophore in Chlamydomonas rhodopsin." Biophys J **60**(6): 1477-1489.
- Helgerud, P., L. B. Petersen and K. R. Norum (1982). "Acyl CoA:retinol acyltransferase in rat small intestine: its activity and some properties of the enzymic reaction." J Lipid Res **23**(4): 609-618.
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes, Sunderland MA; Sinauer Associates.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley and B. Katz (1949). "Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid." Archives Des Sciences Physiologiques **3**(2): 129-150.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley and B. Katz (1952). "Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo." Journal of Physiology-London **116**(4): 424-448.

Referenzen

Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid." J Physiol **108**(1): 37-77.

Hollander, D. and P. E. Ruble, Jr. (1978). "beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport." Am J Physiol **235**(6): E686-691.

Hoth, S., I. Dreyer, P. Dietrich, D. Becker, B. Muller-Rober and R. Hedrich (1997). "Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4806-4810.

Hoth, S. and R. Hedrich (1999). "Distinct molecular bases for pH sensitivity of the guard cell K⁺ channels KST1 and KAT1." Journal of Biological Chemistry **274**(17): 11599-11603.

Hou, S. Y., E. G. Govorunova, M. Ntefidou, C. E. Lane, E. N. Spudich, O. A. Sineshchekov and J. L. Spudich (2012). "Diversity of chlamydomonas channelrhodopsins." Photochem Photobiol **88**(1): 119-128.

Hubbard, R. (1958). "The thermal stability of rhodopsin and opsin." J Gen Physiol **42**(2): 259-280.

Ihara, K., T. Amemiya, Y. Miyashita and Y. Mukohata (1994). "Met-145 is a key residue in the dark adaptation of bacteriorhodopsin homologs." Biophys J **67**(3): 1187-1191.

Irie, T., M. Azuma and T. Seki (1991). "The Retinal and 3-Dehydroretinal in *Xenopus-Laevis* Eggs Are Bound to Lipovitellin-1 by a Schiff-Base Linkage." Zoological Science **8**(5): 855-863.

Jacobson, S. G., T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, E. Heon, M. Golczak, W. A. Beltran, A. Sumaroka, S. B. Schwartz, A. J. Roman, E. A. Windsor, J. M. Wilson, G. D. Aguirre, E. M. Stone and K. Palczewski (2007). "Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(38): 15123-15128.

Jang, S. K. and E. Wimmer (1990). "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein." Genes Dev **4**(9): 1560-1572.

Referenzen

Kakkad, B. P. and D. E. Ong (1988). "Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine." Journal of Biological Chemistry **263**(26): 12916-12919.

Kam, R. K., Y. Deng, Y. Chen and H. Zhao (2012). "Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development." Cell Biosci **2**(1): 11.

Kastner, P., M. Mark and P. Chambon (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" Cell **83**(6): 859-869.

Kateriya, S., G. Nagel, E. Bamberg and P. Hegemann (2004). ""Vision" in single-celled algae." News Physiol Sci **19**: 133-137.

Kato, H. E., F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth and O. Nureki (2012). "Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel." Nature.

Kleinlogel, S., K. Feldbauer, R. E. Dempski, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann and E. Bamberg (2011). "Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable channelrhodopsin CatCh." Nat Neurosci **14**(4): 513-518.

Kouyama, T. and M. Murakami (2010). "Structural divergence and functional versatility of the rhodopsin superfamily." Photochem Photobiol Sci **9**(11): 1458-1465.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lanyi, J. K. (2006). "Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle." Biochim Biophys Acta **1757**(8): 1012-1018.

Lanyi, J. K. (2007). "Studies of the bacteriorhodopsin photocycle without the use of light: clues to proton transfer coupled reactions." J Mol Microbiol Biotechnol **12**(3-4): 210-217.

Lawson, M. A., D. N. Zacks, F. Derguini, K. Nakanishi and J. L. Spudich (1991). "Retinal analog restoration of photophobic responses in a blind *Chlamydomonas reinhardtii*

Referenzen

mutant. Evidence for an archaebacterial like chromophore in a eukaryotic rhodopsin." Biophys J **60**(6): 1490-1498.

Leduc-Nadeau, A., K. Lahjouji, P. Bissonnette, J. Y. Lapointe and D. G. Bichet (2007). "Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes." Am J Physiol Cell Physiol **292**(3): C1132-1136.

Li, T., M. A. Sandberg, B. S. Pawlyk, B. Rosner, K. C. Hayes, T. P. Dryja and E. L. Berson (1998). "Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11933-11938.

Li, T., W. K. Snyder, J. E. Olsson and T. P. Dryja (1996). "Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14176-14181.

Liao, M. J. and H. G. Khorana (1984). "Removal of the carboxyl-terminal peptide does not affect refolding or function of bacteriorhodopsin as a light-dependent proton pump." Journal of Biological Chemistry **259**(7): 4194-4199.

Lin, J. Y., M. Z. Lin, P. Steinbach and R. Y. Tsien (2009). "Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics." Biophys J **96**(5): 1803-1814.

Lubzens, E., L. Lissauer, B. Levavi-Sivan, J. C. Avarre and M. Sammar (2003). "Carotenoid and retinoid transport to fish oocytes and eggs: what is the role of retinol binding protein?" Mol Aspects Med **24**(6): 441-457.

Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler and J. K. Lanyi (1999). "Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution." Journal of Molecular Biology **291**(4): 899-911.

MacDonald, P. N. and D. E. Ong (1988). "Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine." Journal of Biological Chemistry **263**(25): 12478-12482.

Referenzen

Marmont, G. (1949). "Studies on the Axon Membrane .1. A New Method." Journal of Cellular and Comparative Physiology **34**(3): 351-382.

Marti, T., H. Otto, T. Mogi, S. J. Rosselet, M. P. Heyn and H. G. Khorana (1991). "Bacteriorhodopsin mutants containing single substitutions of serine or threonine residues are all active in proton translocation." Journal of Biological Chemistry **266**(11): 6919-6927.

Mason, P. E., C. E. Dempsey, G. W. Neilson and J. W. Brady (2005). "Nanometer-scale ion aggregates in aqueous electrolyte solutions: guanidinium sulfate and guanidinium thiocyanate." J Phys Chem B **109**(50): 24185-24196.

Mason, P. E., G. W. Neilson, C. E. Dempsey, A. C. Barnes and J. M. Cruickshank (2003). "The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4557-4561.

Mason, P. E., G. W. Neilson, J. E. Enderby, M. L. Sabounji, C. E. Dempsey, A. D. MacKerell, Jr. and J. W. Brady (2004). "The structure of aqueous guanidinium chloride solutions." Journal of the American Chemical Society **126**(37): 11462-11470.

McKearin, D. M., M. C. Barton, M. J. Keller and D. J. Shapiro (1987). "Estrogen induces transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol-binding protein gene." Journal of Biological Chemistry **262**(11): 4939-4942.

McKearin, D. M. and D. J. Shapiro (1988). "Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol binding protein mRNA." Journal of Biological Chemistry **263**(7): 3261-3265.

Mittelmeier, T. M., J. S. Boyd, M. R. Lamb and C. L. Dieckmann (2011). "Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization." J Cell Biol **193**(4): 741-753.

Morriss-Kay, G. M. and S. J. Ward (1999). "Retinoids and mammalian development." Int Rev Cytol **188**: 73-131.

Referenzen

Muller, M., C. Bamann, E. Bamberg and W. Kuhlbrandt (2011). "Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography." Journal of Molecular Biology **414**(1): 86-95.

Muller, V. and A. Oren (2003). "Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes." Extremophiles **7**(4): 261-266.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Nack, M., I. Radu, M. Gossing, C. Bamann, E. Bamberg, G. F. von Mollard and J. Heberle (2010). "The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156." Photochem Photobiol Sci **9**(2): 194-198.

Nagel, G., M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg and A. Gottschalk (2005). "Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses." Current Biology **15**(24): 2279-2284.

Nagel, G., D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Mustl, E. Bamberg and P. Hegemann (2002). "Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae." Science **296**(5577): 2395-2398.

Nagel, G., T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann and E. Bamberg (2003). "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13940-13945.

Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

Nelson, D. and M. Cox (2009). Lehninger Biochemie. Berlin Heidelberg, Springer

Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1971). "Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*." Nat New Biol **233**(39): 149-152.

Referenzen

Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1973). "Functions of a new photoreceptor membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(10): 2853-2857.

Ong, D. E. (1984). "A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization." Journal of Biological Chemistry **259**(3): 1476-1482.

Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-325.

Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Current Opinion in Chemical Biology **8**(6): 610-616.

Racker, E. and W. Stoeckenius (1974). "Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation." Journal of Biological Chemistry **249**(2): 662-663.

Randolph-Anderson, B. L., J. E. Boynton, N. W. Gillham, E. H. Harris, A. M. Johnson, M. P. Dorthu and R. F. Matagne (1993). "Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation." Mol Gen Genet **236**(2-3): 235-244.

Redmond, T. M., S. Yu, E. Lee, D. Bok, D. Hamasaki, N. Chen, P. Goletz, J. X. Ma, R. K. Crouch and K. Pfeifer (1998). "Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle." Nat Genet **20**(4): 344-351.

Ritter, E., K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann and F. J. Bartl (2008). "Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of Biological Chemistry **283**(50): 35033-35041.

Rudolph, R. and H. Lilie (1996). "In vitro folding of inclusion body proteins." Faseb Journal **10**(1): 49-56.

Sager, R. (1960). "Genetic systems in *Chlamydomonas*." Science **132**(3438): 1459-1465.

Referenzen

Saliba, R. S., P. M. Munro, P. J. Luthert and M. E. Cheetham (2002). "The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2907-2918.

Schobert, B. and J. K. Lanyi (1982). "Halorhodopsin is a light-driven chloride pump." Journal of Biological Chemistry **257**(17): 10306-10313.

Schreckenbach, T., B. Walckhoff and D. Oesterhelt (1977). "Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin." Eur J Biochem **76**(2): 499-511.

Schreckenbach, T., B. Walckhoff and D. Oesterhelt (1978). "Specificity of Retinal Binding-Site of Bacteriorhodopsin - Chemical and Stereochemical Requirements for Binding of Retinol and Retinal." Biochemistry **17**(25): 5353-5359.

Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-789.

Schroll, C., T. Riemensperger, D. Bucher, J. Ehmer, T. Voller, K. Erbguth, B. Gerber, T. Hendel, G. Nagel, E. Buchner and A. Fiala (2006). "Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae." Current Biology **16**(17): 1741-1747.

Schweiger, U., J. Tittor and D. Oesterhelt (1994). "Bacteriorhodopsin Can Function without a Covalent Linkage between Retinal and Protein." Biochemistry **33**(2): 535-541.

Seki, A., S. Miyauchi, S. Hayashi, T. Kikukawa, M. Kubo, M. Demura, V. Ganapathy and N. Kamo (2007). "Heterologous expression of Pharaonis halorhodopsin in *Xenopus laevis* oocytes and electrophysiological characterization of its light-driven Cl⁻ pump activity." Biophys J **92**(7): 2559-2569.

Seki, T., S. Fujishita, M. Azuma and T. Suzuki (1987). "Retinal and 3-Dehydroretinal in the Egg of the Clawed Toad, *Xenopus-Laevis*." Zoological Science **4**(3): 475-481.

Sharma, A. K., J. L. Spudich and W. F. Doolittle (2006). "Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility." Trends Microbiol **14**(11): 463-469.

Referenzen

- Sineshchekov, O. A., K. H. Jung and J. L. Spudich (2002). "Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8689-8694.
- Sitia, R. and I. Braakman (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory." Nature **426**(6968): 891-894.
- Smith, M. H., H. L. Ploegh and J. S. Weissman (2011). "Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum." Science **334**(6059): 1086-1090.
- Sonar, S., M. P. Krebs, H. G. Khorana and K. J. Rothschild (1993). "Static and time-resolved absorption spectroscopy of the bacteriorhodopsin mutant Tyr-185-->Phe: evidence for an equilibrium between bR570 and an O-like species." Biochemistry **32**(9): 2263-2271.
- Sorokin, A. V., E. R. Kim and L. P. Ovchinnikov (2009). "Proteasome system of protein degradation and processing." Biochemistry (Mosc) **74**(13): 1411-1442.
- Spreitzer, R. J. and L. Mets (1981). "Photosynthesis-deficient Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with Associated Light-sensitive Phenotypes." Plant Physiol **67**(3): 565-569.
- Spudich, J. L., C. S. Yang, K. H. Jung and E. N. Spudich (2000). "Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 365-392.
- Stehfest, K. and P. Hegemann (2010). "Evolution of the channelrhodopsin photocycle model." Chemphyschem **11**(6): 1120-1126.
- Stehfest, K., E. Ritter, A. Berndt, F. Bartl and P. Hegemann (2010). "The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T." Journal of Molecular Biology **398**(5): 690-702.
- Stern, D. and G. Witman (2008). The Chlamydomonas sourcebook, Academic Press.
- Stevens, F. J. and Y. Argon (1999). "Protein folding in the ER." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 443-454.

Referenzen

Streble, H. and D. Krauter (1988). Das Leben im Wassertropfen. Stuttgart, Franckh-Kosmos Verlag.

Sudo, Y., K. Ihara, S. Kobayashi, D. Suzuki, H. Irieda, T. Kikukawa, H. Kandori and M. Homma (2011). "A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties." Journal of Biological Chemistry **286**(8): 5967-5976.

Sung, C. H., C. M. Davenport and J. Nathans (1993). "Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain." Journal of Biological Chemistry **268**(35): 26645-26649.

Sung, C. H., C. Makino, D. Baylor and J. Nathans (1994). "A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment." J Neurosci **14**(10): 5818-5833.

Sung, C. H., B. G. Schneider, N. Agarwal, D. S. Papermaster and J. Nathans (1991). "Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8840-8844.

Suzuki, T., K. Yamasaki, S. Fujita, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh, E. Asamizu, S. Tabata, K. Miura, H. Fukuzawa, S. Nakamura and T. Takahashi (2003). "Archaeal-type rhodopsins in Chlamydomonas: model structure and intracellular localization." Biochem Biophys Res Commun **301**(3): 711-717.

Tang, W., I. Ehrlich, S. B. Wolff, A. M. Michalski, S. Wolf, M. T. Hasan, A. Luthi and R. Sprengel (2009). "Faithful expression of multiple proteins via 2A-peptide self-processing: a versatile and reliable method for manipulating brain circuits." J Neurosci **29**(27): 8621-8629.

Terakita, A. (2005). "The opsins." Genome Biol **6**(3): 213.

Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner and C. M. Pickart (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." EMBO J **19**(1): 94-102.

Referenzen

Tsunoda, S. P. and P. Hegemann (2009). "Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation." Photochem Photobiol **85**(2): 564-569.

Turner, G. J., S. Chittiboyina, L. Pohren, K. G. Hines, J. J. Correia and D. C. Mitchell (2009). "The bacteriorhodopsin carboxyl-terminus contributes to proton recruitment and protein stability." Biochemistry **48**(5): 1112-1122.

van Bennekum, A., M. Werder, S. T. Thuahnai, C. H. Han, P. Duong, D. L. Williams, P. Wettstein, G. Schulthess, M. C. Phillips and H. Hauser (2005). "Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol." Biochemistry **44**(11): 4517-4525.

von Lintig, J. and K. Vogt (2000). "Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal." Journal of Biological Chemistry **275**(16): 11915-11920.

Wahli, W., I. B. Dawid, G. U. Ryffel and R. Weber (1981). "Vitellogenesis and the vitellogenin gene family." Science **212**(4492): 298-304.

Watanabe, H. C., K. Welke, F. Schneider, S. Tsunoda, F. Zhang, K. Deisseroth, P. Hegemann and M. Elstner (2012). "Structural model of channelrhodopsin." Journal of Biological Chemistry **287**(10): 7456-7466.

Weiss, G. B. (1974). "Cellular Pharmacology of Lanthanum." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **14**: 343-354.

Wyss, A., G. Wirtz, W. Woggon, R. Brugger, M. Wyss, A. Friedlein, H. Bachmann and W. Hunziker (2000). "Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase." Biochem Biophys Res Commun **271**(2): 334-336.

Quellenangaben

<http://ihg.gsf.de/ihg/patinfo/diagnostik/rp.html>

<http://www.duden.de>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1
Abb. 2: Schematische Abbildung von Rhodopsinen	3
Abb. 3: Partielles Alignment der Aminosäuresequenz von ChRs aus Chlamydomonas und BR	4
Abb. 4: Schematische Darstellung von	5
Abb. 5: Stromverlauf von ChR2 bei Belichtung von $\lambda=473\text{nm}$	8
Abb. 6: Struktur der Chimäre C1C2 als Dimer	13
Abb. 7: Schematischer Photozyklus von ChR2.....	15
Abb. 8: Schematische Darstellung der Vitamin A-Absorption, -Transport, -Lagerung und	17
Abb. 9 Schematische Übersicht des ERAD-Systems	20
Abb. 10: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	33
Abb. 11: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskopes	35
Abb. 12: Schematische Darstellung der TEVC-Technik.....	37
Abb. 13: Darstellung der halbierten Schlauchstücke in der Badkammer.....	39
Abb. 14: Protokoll zur Aufzeichnung von lichtaktivierten Strömen von ChR2	40
Abb. 15: Protokoll zur Aufzeichnung der lichtunabhängigen Dunkelströme von ChR2....	41
Abb. 16: Proteinalignment von ChR1 (=Acop1), ChR2 (=Acop2), BR, Proteorhodopsin und Nop-1	50
Abb. 17: Lichtaktivierte Ströme von ChR2-WT-injizierten Oozyten	51
Abb. 18: Fluoreszenzen von ChR2-WT::YFP-injizierten Oozyten.....	52
Abb. 19: Lichtaktivierte Ströme bei ChR2-WT-injizierten Oozyten nach 15 Stunden	52
Abb. 20: Fluoreszenzen von ChR2-Volllänge::YFP- und ChR2-WT::YFP-injizierten Oozyten	53
Abb. 21: Balkendiagramm der lichtinduzierten Ströme von ChR2-WT und ChR2-Volllänge	54
Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159Y::YFP	54
Abb. 23: Lichtaktivierte Ströme von ChR2-T159Y::YFP.....	55
Abb. 24: Lichtaktivierte Ströme bei ChR2-T159Y-injizierten Oozyten nach 15 Stunden...56	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 25: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159Y	57
Abb. 26: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159W::YFP	58
Abb. 27: Lichtaktivierte Ströme bei ChR2-T159W-injizierten Oozyten nach 15 Stunden	59
Abb. 28: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159W	60
Abb. 29: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159F::YFP	61
Abb. 30: Lichtaktivierte Ströme bei T159F-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation	62
Abb. 31: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159F	62
Abb. 32: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-T159C::YFP	63
Abb. 33: Lichtaktivierte Ströme bei T159C-injizierten Oozyten nach 15 Stunden Retinalinkubation	64
Abb. 34: Echtzeitanalyse der Retinalinkorporation von ChR2-T159C	64
Abb. 35: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ChR2-K257R::YFP	65
Abb. 36: Lichtaktivierte Ströme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von	66
Abb. 37: Protein-Immunoblot von Chop2-WT und Chop2-Mutanten exprimierenden Oozyten	67
Abb. 38: Skizze von ChR2 bzw. dessen putative Ubiquitinierungsstellen	68
Abb. 39: Fluoreszenzen von ChR2-K76R, -K194R, -K205R und -WT-injizierten Oozyten ..	69
Abb. 40: Normierte lichtaktivierte Ströme der Lysin-Einzelmutanten bei $V_m = -100\text{mV}$..	70
Abb. 41: Fluoreszenzen von ChR2-Tripel, -5fach und -WT-injizierten Oozyten	71
Abb. 42: Normierte lichtaktivierte Ströme von Lysin-Mehrfachmutanten bei $V_m = -100\text{mV}$	71
Abb. 43: Normierte lichtinduzierte Ströme von Chop2-282 $V_m = -100\text{mV}$	72
Abb. 44: Dissoziiertes Guanidiniumchlorid	73
Abb. 45: Lichtunabhängiger Dunkelstrom von ChR2-T159Y	74
Abb. 46: Von den Rohdaten zum Strom-Spannungsdiagramm	76
Abb. 47: ChR2-T159Y bei variabler Guanidiniumkonzentration	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 48: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-T159Y bei 115mM NaCl bzw. 115mM GuaCl, pH10	78
Abb. 49: ChR2-T159Y-Ströme bei Zugabe von La^{3+}	78
Abb. 50: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-T159Y bei Gua 10 und bei Zugabe von 1mM La^{3+}	79
Abb. 51: Zusammenfassung der Dunkelströme in einem Balkendiagramm von ChR2-T159Y.....	80
Abb. 52: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT- und ChR2-T159Y injizierten Zellen bei Gua pH10.....	81
Abb. 53: ChR2-T159W-Ströme bei Zugabe von La^{3+}	82
Abb. 54: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-T159W.....	83
Abb. 55: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT- und -T159W injizierten Zellen bei Gua pH10	83
Abb. 56: Perfusion von ChR2-T159F + Retinal	84
Abb. 57: Strom-Spannungsdiagramm bei ChR2-WT- und -T159F-injizierten Zellen	85
Abb. 58: Perfusion von ChR2-T159Y/K257R bei $V_m = -50mV$	86
Abb. 59: Zusammenfassung der Dunkelströme in einem Balkendiagramm von ChR2-T159Y/K257R.....	87
Abb. 60: Strom-Spannungsdiagramm bei ChR2-WT- und -T159Y/K257R-injizierten Zellen	88
Abb. 61: Schematische Darstellung von ChR2	89
Abb. 62: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -H114Q/R115Q/T159Y- und -T159Y-injizierten Oozyten.....	90
Abb. 63: Fluoreszenzen von ChR2-H114Q/R115Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und -WT::YFP	91
Abb. 64: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -R120Q/T159Y und -T159Y-injizierten Oozyten.....	91
Abb. 65: Fluoreszenzen von ChR2-R120Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und -WT::YFP	92
Abb. 66: Strom-Spannungsdiagramm von ChR2-WT-, -T159Y- und -H249Q/T159Y-injizierten Oozyten.....	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 67: Fluoreszenzintensitäten von ChR2- H249Q/T159Y::YFP, -T159Y::YFP und - WT::YFP	93
Abb. 68: Kristallstruktur und strukturelles Modell von ChR2	99
Abb. 69: Normierte lichtinduzierte Ströme von WT und T159Y/F/W	101
Abb. 70: Normierte lichtinduzierte Ströme von T159C in Abhängigkeit von Retinal	102
Abb. 71: Ladungsverteilung des Guanidinium-Ions	106
Abb. 72: Skizze zur Hypothese der Deprotonierung der Schiff' Base	108
Abb. 73: Normierte lichtaktivierte Ströme der putativen pH-Sensoren	109
Abb. 74: Balkendiagramm und Fluoreszenzen von K257A/T159Y, K257Q/T159Y und K257R/T159Y	112
Abb. 75: Skizzierte Übersicht der retinalabhängigen und -unabhängigen Stabilität von Chop2	116
Fig. 76: Schematic overview of the retinal-dependent and -independent Stability of Chop2	120

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ansatz einer Glyoxal Reaktion	24
Tab. 2: Ansatz einer Mutagenese-Reaktion.....	25
Tab. 3: Verwendetes PCR-Programm. Die Annealingtemperatur ist abhängig von den eingesetzten Oligonukleotiden.....	25
Tab. 4: Ansatz einer Restriktion	26
Tab. 5: Ansatz einer Standard PCR-Reaktion	27
Tab. 6: Ansatz einer in-vitro-Transkriptionsreaktion (abgewandelt von Epicentre)	28
Tab. 7: Erläuterung der Heizleistung zum Ziehen von Injektionskapillaren	29
Tab. 8: Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels	32
Tab. 9 Zusammensetzung der Probe zum Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel	32
Tab. 10: Erläuterung der Heizleistung zum Ziehen von Kapillaren.....	38
Tab. 11 : Vergleich der berechneten Leitfähigkeiten von Chr2-T159F und Chr2-WT.....	85
Tab. 12: Ionenradien und Standardenthalpien der Hydratation nach Pauling	107

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Å	Ångström (= 10^{-10}m ; 100pm)
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar
BR	Bakteriorhodopsin
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celcius
Chop	Channelopsin
ChR	Channelrhodopsin
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
D	Asparaginsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (<i>dt.</i> : DNS: Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated degradation (<i>dt.</i> : ER-assoziierte Degradation)
F	Phenylalanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9.81m/s^2)
g	Gramm
HR	Halorhodopsin
I_{ss}	stationärer Strom
I_{peak}	Peakstrom
IV	Strom-Spannungsdiagramm
IVT	<i>in-vitro</i> -Transkription

Abkürzungsverzeichnis

K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	[lambda] Wellenlänge
l	Liter
LB	Lysogeny broth
M	molar
	Mega
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
NMG	N-methyl-D-glucamin
n	Nano (10^{-9})
Ω	Ohm (SI-Einheit des elektrischen Widerstandes)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> ; negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic acid (<i>dt.</i> : Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur (22°C)
S	Siemens
SD	standard deviation (<i>dt.</i> : Standardabweichung)
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (<i>dt.</i> : Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEVC	Two-electrode-voltage-clamp (<i>dt.</i> : Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik)
TM	Transmembranhelix
TMAP	Tetramethylammoniumphosphat
U	Unit (<i>dt.</i> : Einheit)
V	Volt
W	Watt
	Tryptophan

Abkürzungsverzeichnis

Y	Tyrosin
YFP	Yellow fluorescent protein (<i>dt.</i> : Gelb fluoreszierendes Protein)

Nukleotidsequenzen

Channelrhodopsin 2 (ChR2) aus *Chlamydomonas reinhardtii*; Aminosäuren 1 - 737

```
1 atggagggcgc cctgagtgcc gttggggcgcg agctgctatt tgtaacgaac ccagtagtgcg
61 tcaatggctc tgtacttggtg cctgaggacc agtggtactg cgcgggctgg attgagtcgc
121 gtggcaca aaa cggtgcccaa acggcgtcga acgtgctgca atggcttget gctggcttct
181 ccactactact gcttatgttt tacgcctacc aaacatggaa gtcaacctgc ggctgggagg
241 agatctatgt gtgcgctatc gagatgggtca aggtgattct cgagttcttc ttcgagtta
301 agaaccgcgc catgctgtat ctagccacag gccaccgcgt ccagtggttg cgttacgccg
361 agtggcttct cacctgcccg gtcattctca ttcacctgac aaacctgacg ggcttgcca
421 acgactacag caggcgcacc atgggtctgc ttgtgtctga tattggcaca attgtgtggg
481 gcgccacttc cgccatggcc accggatacg tcaaggatcat cttcttctgc ctgggtctgt
541 gttatgggtg taacacggtc tttcacgctg ccaaggccta catcgagggt taccacaccg
601 tgccgaaggg ccgggtgtgc cagggtggga ctggcatggc ttggctcttc ttcgtatcat
661 ggggtatggt ccccatcctg ttcatacctc gccccgaggg cttcggcgtc ctgagcgtgt
721 acggctccac cgtcggccac accatcattg acctgatgct gaagaactgc tggggctctg
781 tcggcacta cctgcgcgtg ctgatccacg agcatatcct catccacggc gacattcgca
841 agaccaccaa attgaacatt ggtggcactg agattgaggc cgagacgctg gtggaggacg
901 aggcgagggc tggcgcggtc aacaagggca ccggcaagta cgcctcccgc gattccttc
961 tggatcatgc cgacaagatg aaggagaagg gcattgacgt gcgcgcctct ctggacaaca
1021 gcaaggagggt ggagcaggag caggccgcca gggctgcat gatgatgatg aacggcaatg
1081 gcatgggtat gggaatggga atgaacggca tgaacggaat gggcggatg aacgggatg
1141 ctggcggcgc caagcccggc ctggagctca ctccgcagct acagcccggc cgcgtcatcc
1201 tggcggtgcc ggacatcagc atgggtgact tcttccgca gcagtttget cagctatcgg
1261 tgacgtacga gctggtgccg gccctgggcg ctgacaacac actggcgtg gttacgcagg
1321 cgcagaacct gggcggcgtg gactttgtgt tgattcacc cgagttcctg cgcgaccgct
1381 ctagcaccag catcctgagc cgctgcgcg gcgcgggcca gcgtgtggct gcgttcggct
1441 gggcgcagct ggggcccatt cgtgacctga tcgagtccgc aaacctggac ggctggctgg
1501 agggcccctc gttcggacag ggcatacctg ccggccacat cgttgccctg gtggccaaga
1561 tgcagcagat gcgcaagatg cagcagatgc agcagattgg catgatgacc ggcgcatga
1621 acggcatggg cggcggatg ggcggcggca tgaacggcat gggcggcggc aacggcatga
1681 acaacatggg caacggcatg ggcggcggca tgggcaacgg catgggcccg aatggcatga
1741 acggaatggg tggcggcaac ggcatgaaca acatgggccc caacggaatg gccggcaacg
1801 gaatgggccc cggcatgggc ggcaacggta tgggtggctc catgaacggc atgagctccg
1861 gcgtggtggc caacgtgacg ccctccgccc ccggcggcat gggcggcatg atgaacggcg
1921 gcatggctgc gcccagtcg cccggcatga acggcggccc cctgggtacc aaccgctct
1981 tcaacgcccg gccctcaccg ctacagctcg agctcgtgac cgaggcaggc atgggcagca
2041 tgggaggcat gggcggaatg agcggaatgg gaggcatggg tggaatggg ggcattggcg
2101 gcgcggcgc cgccacgacg caggctgcgg gcggcaacgc ggaggcggag atgctgcaga
2161 atctcatgaa cgagatcaat cgcctgaagc gcgagcttgg cgagtaa
```

Nukleotidsequenzen

Channelrhodopsin 2 (ChR2) aus *Chlamydomonas reinhardtii*; Aminosäuren 1 - 310

```
1 atggattatg gaggcgccct gaggcgcggt gggcgcgagc tgctatttgt aacgaacca
61 gtagtcgtca atggctctgt acttgtgcct gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt
121 gaggcgcggt gcacaaacgg tgcccaaacg gcgtcgaacg tgctgcaatg gcttgctgct
181 ggcttctcca tctactgct tatgttttac gcctaccaa catggaagtc aacctgcggc
241 tgggaggaga tctatgtgtg cgctatcgag atggcgaagg tgattctcga gttcttcttc
301 gaggtttaaga acccgtccat gctgtatcta gccacaggcc accgctcca gtggttgctg
361 tacgocgagt ggcttctcac ctgcccggtc attctcattc acctgtcaa cctgacgggc
421 ttgtccaacg actacagcag gcgcaccatg ggtctgcttg tgtctgatat tggcacaatt
481 gtgtggggcg ccacttccgc catggccacc ggatacgtca aggtcatctt cttctgcctg
541 ggtctgtggt atgggtgctaa cacgttcttt cacgctgcca aggcctacat cgagggttac
601 cacaccgtgc cgaagggccg gtgtcgccag gtgggtgactg gcatggcttg gctcttcttc
661 gtatcatggg gtatgttccc catcctgttc atcctcggcc ccgagggctt cggcgtcctg
721 agcgtgtacg gctccaccgt cggccacacc atcattgacc tgatgtcga gaaactgctgg
781 ggtctgctcg gccactacct gcgctgctg atccacgagc atatcctcat ccacggcgac
841 attcgcaaga ccaccaaatt gaacattggt ggcactgaga ttgaggtcga gacgctgggt
901 gaggacgagg ccgaggctgg cgcggtacc
```

Yellow fluorescent protein (YFP); Aminosäuren 1-240

```
1 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac
61 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac
121 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc
181 ctctgaccca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag
241 cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc
301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg
361 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac
421 aagctggagt acaactaaa cagccacaac gtctatatca tggccgaca gcagaagaac
481 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc
541 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac
601 tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc
661 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa
```

Nukleotidsequenzen

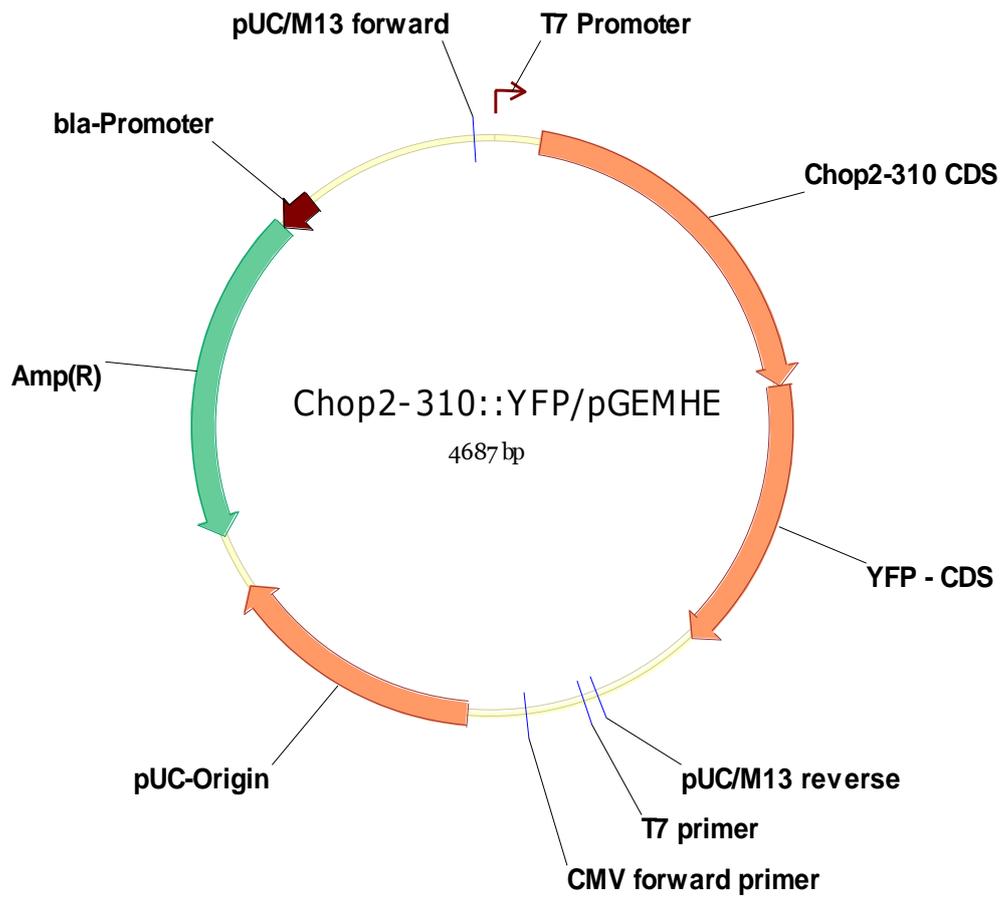
Primersequenzen

Die für die Mutation verantwortlichen Nukleotide sind unterstrichen

Primer	Sequenz 5' - 3'
Chop2-T159Y	GTCTGATATTGGCT <u>TAT</u> ATTGTGTGGGGCGCC
Chop2-T159W	GTCTGATATTGGCT <u>GG</u> ATTGTGTGGGGC
Chop2-T159F	GTCTGATATTGGCT <u>TTT</u> ATTGTGTGGGGCGCC
Chop2-T159C	GTCTGATATTGGCT <u>TGT</u> ATTGTGTGGGGCGCC
Chop2-K257R	ACCTGATGTTCG <u>AGGA</u> ACTGCTGGG
Chop2-K257A	ACCTGATGTTCG <u>GCGA</u> ACTGCTGGG
Chop2-K257Q	ACCTGATGTTCG <u>CAGA</u> ACTGCTGGG
Chop2-K76R	ACCAAACATGG <u>CGAT</u> CAACCTGCGG
Chop2-K194R	TTCACGCTGCC <u>CGAG</u> CCCTACATCGA
Chop2-K205R	CACCGTGCCG <u>CGAG</u> GCCGGTGTC
Chop2-K283R/K286R	GCGACATTCGC <u>AGGACCACCAG</u> ATTGAACATTGG
Chop2-282 (verkürzt)	CACGGCGACATTCGCGCGGCCGCATAAGCTTGATCTGG
Chop2-H114Q/R115Q	TAGCCACAGGCC <u>CAACA</u> AGTCCAGTGGTTGC
Chop2-R120Q	GTCCAGTGGTTG <u>CAAT</u> ACGCCGAGTGGC
Chop2-H249Q	CACCGTCGGC <u>CAA</u> ACCATCATTGAC

Vektorkarten

Darstellung des verwendeten Vektors Chop2-310::YFP/pGemHE



Publikationsliste

CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations.

Voss K, Stahl S, Schleider E, **Ullrich S**, Nickel J, Mueller TD, Felbor U.

Neurogenetics. 2007 Nov;8(4):249-56. Epub 2007 Jul 27.

Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants.

Ullrich S, Gueta R, Nagel G.

Biol Chem. 2013 Feb;394(2):271-80. doi: 10.1515/hsz-2012-0256.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg angefertigt. Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen maßgeblich beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 05. Oktober 2013

.....

Sybille Ullrich