

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Simona GNIDICA

**ELEKTRORETINOGRAFSKA OPREDELITEV FENOTIPOV
TRANSGENIH VINSKIH MUŠIC (*Drosophila melanogaster*, INSECTA:
DIPTERA) S HIMERIČNIMI IONSKIMI KANALČKI TRP IN TRPL**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ELECTRORETINOGRAPHIC PHENOTYPE CHARACTERISATION
OF TRANSGENIC FRUITFLIES (*Drosophila melanogaster*, INSECTA:
DIPTERA) WITH CHIMERIC IONIC CHANNELS TRP AND TRPL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za fotorepcijo na Katedri za fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenoval doc. dr. Petra Stuška in za somentorja asist. dr. Gregorja Belušiča.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Janko Božič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: doc. dr. Gregor ZUPANČIČ, recenzent,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: doc. dr. Peter STUŠEK, mentor,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: asist. dr. Gregor BELUŠIČ, somentor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Simona Gnidica

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 591.18:595.773(043.2)=163.6
KG *Drosophila*/fotoreceptor/elektoretinogram/TRP/TRPL/himera
AV GNIDICA, Simona
SA STUŠEK, Peter (mentor)/BELUŠIČ, Gregor (somentor)
KZ SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN ELEKTRORETINOGRAFSKA OPREDELITEV FENOTIPOV TRANSGENIH VINSKIH MUŠIC (*Drosophila melanogaster*, INSECTA: DIPTERA) S HIMERIČNIMI IONSKIMI KANALČKI TRP IN TRPL
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 58 str., 1 pregl., 19 sl., 4 str. virov
IJ SI
JI sl/en
AI Absorpcija fotona v žuželčjih očeh posledično vpliva na odprtje ionskih kanalčkov v membrani fotoreceptorske celice. Pri vinski mušici v membrani mikrovilov fotoreceptorjev najdemo dve vrsti ionskih kanalčkov, TRP in TRPL, ki posredujeta od svetlobe odvisno depolarizacijo. Oba imata sorodno aminokislinsko zaporedje, skupna jima je tudi molekulska organizacijska shema (transmembranska porna regija iz šestih domen). TRP kanalček je nemobilni, pritrjen na ogrodni protein, in selektiven za Ca^{2+} . TRPL kanalček je mobilni (v temi je v mikrovilu, v svetlobi v somi fotoreceptorja) in manj selektiven za katione. Mutante mušic, ki vsebujejo samo en tip kanalčkov v membrani fotoreceptorskih celic, imajo značilne ERG fenotipe: *trp* (vsebuje le TRPL) ima prehodni receptorski potencial, *trpl* (vsebuje le TRP) pa toničen receptorski potencial z oscilacijami in zmanjšano nevrnalno komponento. Okarakterizirali smo ERG treh himeričnih sevov vinskih mušic, ki so imele v fotoreceptorjih izražene himerične ionske kanalčke, sestavljene iz delov TRP in TRPL. Vse so vsebovale transmembransko porno regijo TRP kanalčka, različno kombinirane konce TRP in TRPL kanalčkov ter zeleni fluorescentni protein (eGFP) na C-koncu. V poskusu smo na sevih *wt*, *trp*^{P343} in vseh treh himeričnih sevih merili ERG, odvisnost amplitud ERG od različnih svetlobnih intenzitet in refraktarnost po maksimalni obremenitvi fotoreceptorjev. Poleg tega smo s pomočjo fluorescence eGFP proteina sklepali na abundanco in mobilnost himeričnih kanalčkov. S pomočjo omenjenih protokolov smo želeli ugotoviti, katerim od nativnih ionskih kanalčkov bodo himerični ionski kanalčki glede na funkcionalne lastnosti bolj podobni. Izkazalo se je, da so vsi himerični kanalčki glede na funkcionalne lastnosti bolj podobni TRPL kanalčkom, saj smo pri vseh zabeležili prehodni receptorski potencial. Himerični ionski kanalčki so se zelo slabo translocirali v mikrovile. Izjema je bil himerični kanalček, ki je imel oba citoplazemska konca iz TRPL, poro pa iz TRP. Dokazali smo, da v kompleksnem sistemu terminalni konci kanalčkov v večji meri vplivajo na lastnosti kanalčkov kot pa sama transmembranska porna domena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 591.18:595.773(043.2)=163.6
CX *Drosophila*/fotoreceptor/electoretinogram/TRP/TRPL/chimera
AU GNIDICA, Simona
AA STUŠEK, Peter (supervisor)/BELUŠIČ, Gregor (co-supervisor)
PP SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Biology department
PY 2010
TI ELECTRORETINOGRAPHIC PHENOTYPE CHARACTERISATION OF
TRANSGENC FRUITFLIES (*Drosophila melanogaster*, INSECTA: DIPTERA) WITH
CHIMERIC IONIC CHANNELS TRP AND TRPL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 58 p., 1 tab., 19 fig., 4 p. of ref.
LA SI
AL sl/en
AB Photon absorption in insect eyes results in the opening of ionic channels in the membrane of the photoreceptor cell. In the photoreceptors of the fruitfly, two types of ionic channel that mediate the light-dependent depolarization can be found in the microvillar membrane, TRP and TRPL. They both share the similar aminoacid sequence and molecular organization scheme (transmembrane pore region formed of six domains). TRP channel is immobile, attached to a scaffold protein and Ca²⁺-selective. TRPL channel is mobile (microvillar in the darkness, translocated to the receptor soma in the light) and less selective for cations. Fruitfly mutants which have only one type of ionic channel in the photoreceptor membrane have typical ERG phenotypes: *trp* (contains only TRPL) has a transient receptor potential, while *trpl* (contains only TRP) has a tonic receptor potential with oscillations and reduced neural component. We have characterized the ERGs in three chimeric fruitfly strains. Their ionic channels were composed of parts of TRP and TRPL. The channel transmembrane pore region was of the TRP channel, the termini of TRP and TRPL channel, and a green fluorescent protein (eGFP) was attached to the C-terminus. In our experiments in the strains *wt*, *trp*^{P343} and the three chimeric strains, we have measured the ERG, ERG amplitude dependence on different light intensities and the refractory period following maximal metabolic load of the photoreceptors. Furthermore, we have assayed by observing the GFP fluorescence the abundance and mobility of himeric channels. By using these protocols we wanted to ascertain to which of the native ionic channels the himeric channel functional characteristics would be most similar. It turned out that all chimeric channels exhibited transient receptor potential and were most similar to TRP. The chimeric ionic channels have also poorly translocated into the microvilli. The exception was the chimeric channel with both cytoplasmic termini from TRPL and a TRP pore. We have demonstrated that in a complex system, the terminal ends of channel protein can influence the channel characteristics more than the transmembrane domain itself.

KAZALO VSEBINE

str.

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik.....	VII
Okrajšave in simboli.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 STRUKTURA OČI VINSKE MUŠICE	2
1.2 FOTOTRANSDUKCIJA	5
1.2.1 Aktivacija fototransdukcije	5
1.2.2 Kvantni sunek	7
1.2.3 PDA	8
1.3 IONSKI KANALČKI V MEMBRANI FOTORECEPTORJEV	9
1.4 ELEKTRORETINOGRAM	11
1.5 PROBLEMI IN DELOVNE HIPOTEZE	12
2 MATERIALI IN METODE	13
2.1 POSKUSNE ŽIVALI	13
2.1.1 Potek in shematski prikaz križanja sevov	15
2.1.2 Preparacija poskusnih živali	16
2.2 FOTOSTIMULACIJA	17
2.2.1 Svetlobni vir	17
2.3 REGISTRACIJA ERG	18
2.4 EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI	18
2.4.1 PDA protokol	19
2.4.2 Meritve občutljivosti fotoreceptorjev na različne svetlobne intenzitete	19
2.4.3 Meritev refraktarnosti fotoreceptorjev	19
2.5 OBDELAVA REZULTATOV	20
2.5.1 Uporabljena programska orodja	20
2.5.2 Statistična obdelava rezultatov	20
2.5.3 Prilagajanje jakostne krivulje	21
3 REZULTATI.....	22

3.1 Splošne značilnosti ERG in PDA vinskih mušic	22
3.2 Intenzitetne krivulje	28
3.3 Refraktarnost	31
3.4 Prisotnost himeričnih ionskih kanalčkov v rabdomu	34
4 DISKUSIJA IN SKLEPI	36
4.1 Prehodni (tranzientni) ERG fenotip himeričnih sevov	36
4.2 Fluorescenca izraženih himeričnih kanalčkov in amplituda ERG	37
4.3 Refraktarnost	39
4.4 Sklepi	41
5 POVZETEK	43
6 VIRI	45

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Shematski prikaz križanja sevov.....	16
--	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz TRPC ionskega kanalčka.....	2
Slika 2: Shema sestavljenega očesa in enega omatidija.....	3
Slika 3: Sinaptične povezave fotoreceptorskih celic.....	4
Slika 4: Shema fototransdukcijske kaskade.....	6
Slika 5: Transducisom ali signalpleks.....	7
Slika 6: Elektrofiziološki odziv sevov <i>wt</i> , <i>trp</i> ^{P343} in <i>trpl</i> ³⁰² na 20 s svetlobni pulz.....	10
Slika 7: Faze elektoretinograma pri divjem tipu (<i>wt</i>).....	12
Slika 8: Shematski prikaz ionskih kanalčkov pri sevih Ch 1, Ch 2 in Ch 3.....	14
Slika 9: Shema fotostimulatorja in elektrofoziološkega kompleta.....	17
Slika 10: ERG in PDA vseh sevov.....	23
Slika 11: Amplituda ERG ob prvem svetlobnem dražljaju (580 nm).....	27
Slika 12: Padec amplitude ERG v času prvega pulza (580 nm).....	28
Slika 13: Intenzitetne krivulje.....	29
Slika 14: Srednje vrednosti intenzitetnih krivulj.....	30
Slika 15: Nakloni intenzitetnih krivulj v točki log I_{50}	31
Slika 16: Časovni potek refraktarnosti po PDA.....	32
Slika 17: Padec občutljivosti na testni pulz po PDA.....	33
Slika 18: Časovna konstanta vračanja svetlobne občutljivosti po PDA.....	34

Slika 19: Oči mušic s kanalčki eGFP-TRPL in s himeričnimi ionskimi kanalčki (eGFP-Ch1, eGFP-Ch2, eGFP-Ch3).....36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ERG	elektretinogram
TRP	»transient receptor potential« ionski kanalček
TRPL	»transient receptor potential-like« ionski kanalček
TRPC	»transient receptor potential canonic« ionski kanalček; skupina kanalčkov, najbolj podobnih mušičjim TRP kanalčkom
<i>wt</i>	divji tip
Ch1	himera 1 (himerični ionski kanalček; sev vinske mušice)
Ch2	himera 2 (himerični ionski kanalček; sev vinske mušice)
Ch3	himera 3 (himerični ionski kanalček; sev vinske mušice)
R1-6	periferne fotoreceptorske celice v omatidiju dipterskih insektov
R7, R8	centralni fotoreceptorski celici v omatidiju dipterskih insektov
G-protein membrano	receptorska molekula, ki v obliki α heliksov sedemkrat prečka celično
GDP, GTP	gvanozin di-, trifosfat
PLC	fosfolipaza C
PIP ₂	fosfatidilinozitol-4,5,-bifosfat
IP ₃	inozitol-1,4,5-trifosfat
DAG	diacilglicerol
PDA afterpotential«)	podaljšani depolarizacijski popotencial (»prolonged depolarization
LMC	nevroni prvega optičnega ganglija (»large monopolar cells«)
eGFP protein«)	zeleni fluorescentni markerski protein (»enhanced green fluorescence
InaD	ogrodni protein InaD (»Inactivation-no afterpotential«)
NinaC	pritrjevalni protein (»neither inactivation nor afterpotential C«)

OBBOO eksperimentalni protokol; zaporedni pulzi oranžne, dvakrat modre in dvakrat oranžne svetlobe (»orange, blue, blue, orange, orange«)

Zapis z velikimi tiskanimi črkami (naprimer TRP) označuje ionski kanalček, medtem ko zapis z malimi poševnimi črkami (naprimer *trp*) označuje sev, ki istoimenskega ionskega kanalčka ne vsebuje. Z majhnimi poševnimi črkami označujemo tudi gene, ki kodirajo proteine za nastanek istoimenskih kanalčkov.

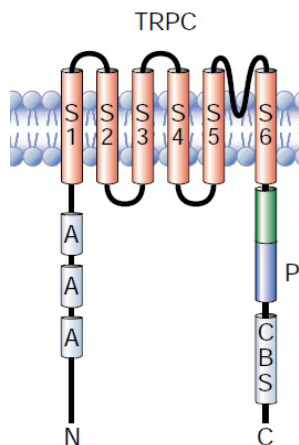
1 UVOD

Vid je pri večini živali informacijsko najbogatejša modaliteta zaznave signalov iz okolja. Na svetlobo občutljive receptorske celice prevajajo energijo svetlobnih dražljajev v vzburjenje. To vzburjenje imenujemo receptorski potencial: sprememba napetosti receptorske celice, proporcionalna svetlobni jakosti.

Vinska mušica je zaradi dekodiranega in dobro raziskanega genoma ter razvitih molekularno genetskih tehnik najboljše preučeni živalski model zaznavanja svetlobe.

Receptorska molekula, ki proži fototransdukcijsko kaskado, je rodopsin. Absorpciji fotona svetlobe sledi konformacijska sprememba rodopsina v metarodopsin, ki veže G-protein. G-protein razpade na α in $\beta\gamma$ podenoti. α podenota aktivira encim fosfolipazo C (PLC), ta pa cepi membranski fosfolipid PIP_2 v IP_3 in DAG, obveščevalni molekuli. Končni rezultat aktivacije kaskade je odprtje TRP in TRPL ionskih kanalčkov v membrani fotoreceptorskih celic.

Mušičji kanalčki spadajo v družino TRP-sorodnih ionskih kanalčkov in poddružino TRPC kanalčkov ("transient receptor potential canonical channels"). Zanje je značilno, da imajo poleg šest-domenske transmembranske porne regije še kratek N-konec (terminus) s tremi ankirinskimi ponovitvami ter C-konec (terminus) z vezavnim mestom za kalmodulin (slika 1).



Slika1: Shematski prikaz TRPC ionskega kanalčka. S1-S6 transmembranske domene, na N-koncu so tri ankirinske (A) ponovitve, C-konec pa vsebuje prolinsko regijo (P) in vezavno mesto za kalmodulin (CBS).

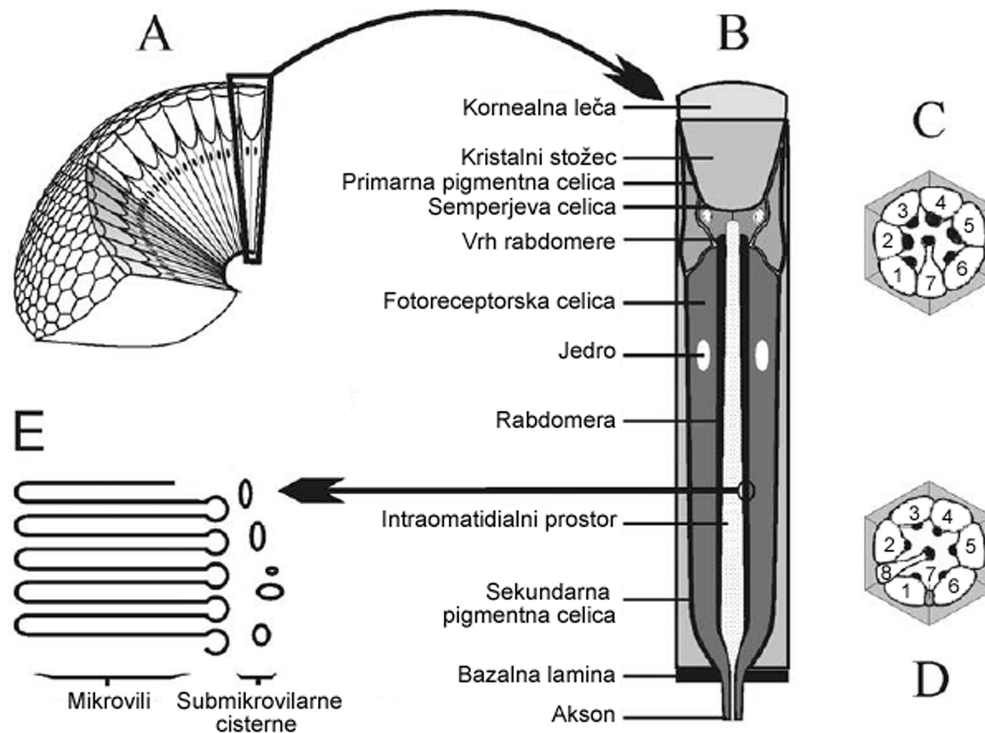
V omenjeno poddružino spadajo TRP in TRPL kanalčki, ki so bili odkriti ravno na modelu vinske mušice. Oba tipa kanalčkov imata skupne strukturne lastnosti, vendar pa vloge posameznih tipov kanalčkov še do danes niso jasno definirane. Zato smo v diplomski nalogi preučevali himerično sestavljene ionske kanalčke, ki so na enotni transmembranski TRP domeni vsebovali različno kombinirane TRP in TRPL konce (terminuse) in ugotavljali, katera domena ključno vpliva na funkcionalne lastnosti teh kanalčkov.

1.1 STRUKTURA OČI VINSKE MUŠICE

Vidni sistem vinske mušice tvorita dve sestavljeni očesi in trije oceli. Slednji so enostavne oči na temenu glave, sestavljeno oko pa tvori do 800 omatidijev.

Posamezen omatidij je sestavljen iz osmih fotoreptorskih celic, primarnih in sekundarnih pigmentnih celic in Semperjevih celic. Pot svetlobe poteka od kornealne leče skozi kristalni stožec ter nato preko Semperjevih celic do fotoreptorja ter v končni fazi do njegovega fotoobčutljivega dela-rabdomere, kjer se svetloba absorbira (slika 2).

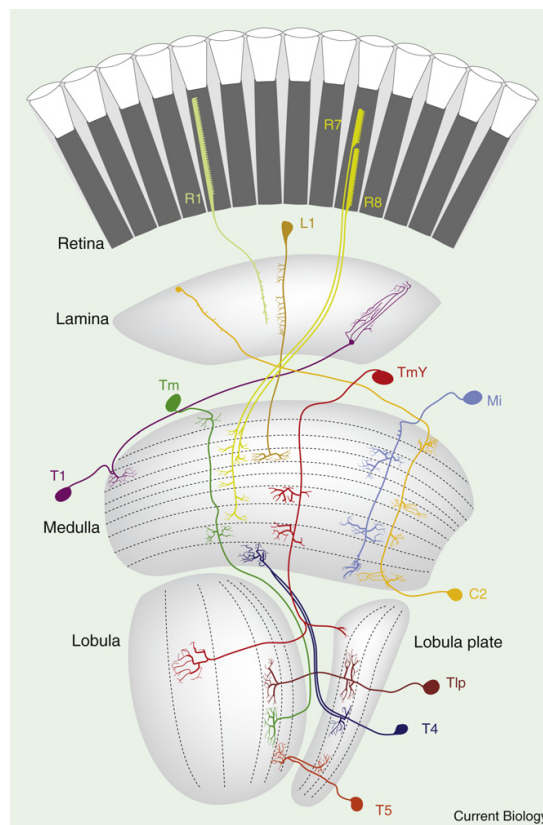
Rabdomera je specializiran organel vsake fotoreptorske celice, ki ga sestavlja okoli 30 000 mikrovilov. V mikrovilih se nahaja celoten nabor beljakovin, ki opravljajo fototransdukcijo. Rabdomere posameznega omatidija tvorijo svetločutni del očesa, rabdom, ki je pri vinski mušici odprtega tipa, saj so posamezne rabdomere med seboj razmaknjene. Takšna organizacija omogoča zaznavanje svetlobe iz različnih smeri, vendar je kljub temu zaradi minimalne medsebojne oddaljenosti zagotovljeno, da svetloba ne prehaja v sosednje rabdomere. To dvojje definira nevalno superpozicijo mušičjega očesa, ki hkrati omogoča visoko ločljivost zaradi optične ločenosti in visoko občutljivost zaradi sestavljanja informacije s sinapsami v nižjih plasteh (Kirschfeld 1973).



Slika 2: Shema sestavljenega očesa in enega omatidija: A, sestavljeno oko. B, struktura omatidija. C, prečni prerez distalnega dela omatidija z R7 receptorsko celico. D, prečni prerez proksimalnega dela omatidija z R8 receptorsko celico. E, shematski prikaz mikrovilarne membrane rabdomere s submikrovilarnimi cisternami. (prirejeno po Paulsen et al. 2001)

Osem fotoreceptorskih celic lahko na osnovi spektralne občutljivosti, položaja rabdomere v omatidiju in sinaptičnih povezav v optičnih ganglijih razdelimo v tri razrede (Hardie 1983). Celice R1-6 so največje, vsebujejo rodopsin z absorpcijskim vrhom v modrem delu spektra (480 nm), njihovi aksoni pa sinapsirajo v lamini. Druga dva razreda fotoreceptorskih celic, R7 in R8, sta opredeljena glede na položaj njihovih rabdomer v središču centralnega kanala, njihovi aksoni pa sinapsirajo v meduli. Celica R7 v retini leži distalno in vsebuje ali rodopsin Rh3 ali Rh4, nikoli pa obeh hkrati. Celica R8 leži proksimalno, z rabdomero točno pod rabdomero celice R7, in vsebuje ali rodopsin Rh5 ali pa Rh6.

Bazalna lamina loči retino od optičnih ganglijev, njena funkcija pa je poleg opore še kemična in električna izolacija (slika 3).



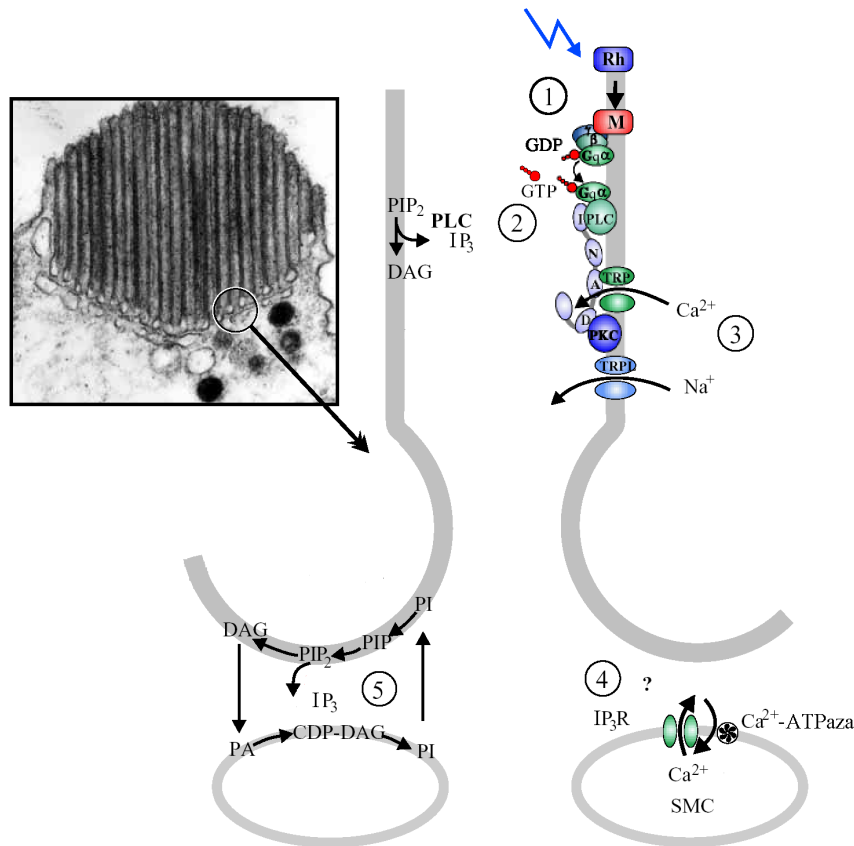
Slika 3: Sinaptične povezave fotoreceptorskih celic. Aksoni receptorskih celic R1 sinapsirajo v lamini (enako velja za vse celice R1-R6), aksoni receptorskih celic R7 in R8 pa sinapsirajo v meduli (povzeto po Borst, 2010).

1.2 FOTOTRANSDUKCIJA

1.2.1 Aktivacija fototransdukcije

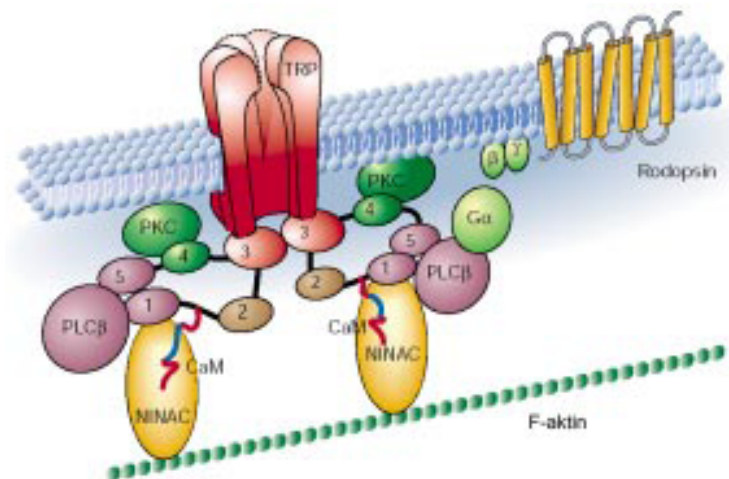
Fototransdukcija je mehanizem, ki prevaja energijo fotona vidne in UV svetlobe v električno vzburjenje membrane fotoreceptorjev. Prične se z absorpcijo fotona svetlobe v rodopsinu, natančneje v njegovem neproteinskem delu, 3-hidroksi retinalu, ki s tem spremeni konfiguracijo iz 11-cis v *all-trans* obliko. To povzroči nastanek katalitično aktivne metarodopsinske molekule.

Metarodopsin aktivira Gq protein, ki ob aktivaciji izmenja GDP za GTP in razpade na α in $\beta\gamma$ podenoti. Gq α podenota aktivira več molekul fosfolipaze β (PLC), le -ta pa katalizira pretvorbo mnogih molekul fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata (PIP₂) na citosolni inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃) in na membransko vezan diacilglicerol (DAG) (Devary et al. 1987), sprosti pa se tudi proton. Nedavne objave podpirajo hipotezo, da do odprtja ionskih kanalčkov TRP in TRPL pride zaradi kombiniranih učinkov nastanka DAG, izpraznjenja PIP₂ in sprostitve protona oziroma zakisanja citoplazme v mikrovilu (Huang et al., 2010).



Slika 4: Shema fototransdukcijske kaskade (1) Absorpciji fotona sledi fotokonverzija rodopsina v metarodopsin. Slednji aktivira heterodimerni G-protein s pomočjo izmenjave GTP – GDP. (2) Gqα podenota G-proteina aktivira PLC. Ta razcepi membranski protein PIP₂ na DAG in IP₃. (3) TRPL in TRP kanalčki se odprejo po neznanem mehanizmu. Ca²⁺ in Na⁺ ioni prodrejo v notranjost celice. (4) Submikrovilarne cisterne so zaloga sekundarnega sporočevalca Ca²⁺. Ca²⁺ kanalčki se odprejo po vezavi IP₃ na membrano cisterne. (5) Fosfoinozidni cikel predelave IP₃ in DAG v PIP₂ (prirejeno po Hardie 2001).

Fototransdukcijska kaskada fotoreceptorjev pri vinski mušici je najhitrejša znana signalna kaskada, saj od absorpcije fotona svetlobe pa do odprtja ionskih kanalčkov preteče manj kot 5 ms. Vzrok za takšno izjemno hitrost je v učinkoviti organizaciji komponent transducisoma, ki omogoča minimalne difuzijske razdalje in direktno interakcijo med elementi kaskade. Vse komponente fototransdukcijske kaskade se nahajajo v membranah mikrovilov v rabdomu celice in so med seboj povezane z InaD proteinom. Celoten transducisom pa na mikrovilarni aktinski filament pritrjuje protein NinaC (slika 5).



Slika 5: Transducisom ali signalpleks. Mikrovil je organiziran okrog aktinskega filameta. Na filament se pritrdja nekonvencionalni miozin NinaC, ki ima dve vezavni mesti za kalmodulin (CaM). NinaC povezuje aktin in InaD protein, ki je na tej shemi označen s številkami od 1 do 5. Številke predstavljajo PDZ domene (poimenovane po tipičnih nahajališčih: post-synaptic density, discs-large, zonula occludens), značilne za strukturne protein v drugih nevronih. Na InaD se preko PDZ domen pritrdjajo še Trp kanalček, fosfolipaza C (PLC β) in regulatorni protein, protein kinaza C (PKC). Na shemi sta prikazana še G-protein in rodopsin (prirejeno po Hardie 2001).

1.2.2 Kvantni sunek

Kvantni sunek je elementarni dogodek v fotoreceptorjih, ki sledi absorpciji fotona. Pri nevretenčarjih, torej tudi pri vinskih mušicah, gre za nastanek kationskega toka, ki depolarizira fotoreceptorske celice. Obratno pa pri vretenčarskih fotoreceptorjih kvantni sunek povzroči elementarno zmanjšanje kationskega toka skozi kanalčke, posledica pa je hiperpolarizacije fotoreceptorjev.

Amplituda toka kvantnega sunka pri vinski mušici je v danih pogojih adaptacije podvržena načelu "vse ali nič". Domnevajo, da sprememba napetosti nastane na naslednji način (po (Hardie et al., 2010): vdor majhne količine Ca²⁺ skozi prve odprte TRP kanalčke povzroči porast koncentracije Ca²⁺ v mikrovilu, tako da Ca²⁺ po pozitivni povratni zanki facilitira še

odprtje vseh ostalih TRP kanalčkov v mikrovilu. To povzroči eksploziven dvig Ca^{2+} in še nekaterih drugih kationov (Na^+ , Mg^{2+}). Ca^{2+} neposredno in prek kalmodulina ob visoki koncentraciji sproži negativno povratno zanko tako posreduje zaprtje ionskih kanalčkov. Na ta način kvantni sunek v trenutku doseže maksimalno amplitudo in se nato hitro zaključi.

S seštevanjem amplitud depolarizacij zaradi množice kvantnih sunkov nastaja receptorski potencial fotoreceptorske celice. Receptorski potencial je toničen odgovor fotoreceptorske celice na svetlobne dražljaje. Depolarizacija fotoreceptorjev znaša maksimalno 60 do 70 mV nad mirovnim membranskim potencialom, ki znaša približno -70 mV. Delovanje fotoreceptorjev je najbrž optimizirano tako, da so v “normalnih pogojih” ambientalne osvetlitve v povprečju depolarizirani le do polovične maksimalne amplitude depolarizacije. Na ta način je njihov dinamični razpon karseda velik in njihovo kodiranje kontrastov karseda natančno.

1.2.3 PDA

Deaktivacijo metarodopsinske molekule zagotavlja encim arestin. Arestina je v celici nekajkrat manj kot rodopsina, zato lahko prebitek metarodopsina sproži trajno aktivacijo receptorjev, ki jo lahko elektrofiziološko spremljamo kot PDA (“**p**rolonged **d**epolarizing **a**fterpotential”) (Hamdorf et al. 1973, Hamdorf in Razmjoo 1979, Dolph et al. 1993). Pogoji so, da izberemo svetlobo ustrezne valovne dolžine; pri mušičjih fotoreceptorjih 1-6 je to kratkovalovna svetloba med 320 nm in 540 nm, torej UV, vijolična, modra ali zelena svetloba. Ker je metarodopsin termično stabilen, lahko PDA pri vinski mušici traja več ur. Naknaden pulz dolgovalovne svetlobe ($\lambda > 540$ nm) lahko pretvori vidni pigment nazaj v rodopsinsko obliko, s čimer sprožimo repolarizacijo PDA.

1.3 IONSKI KANALČKI V MEMBRANI FOTORECEPTORJEV

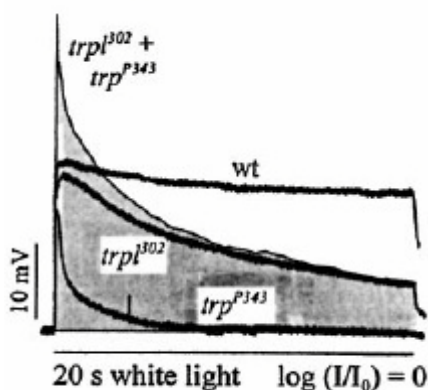
Membranski kanalčki, skozi katere teče od svetlobe odvisni ionski tok (LIC, "light induced current"), sodijo v evolucijsko razširjeno in ohranjeno družino TRP kanalčkov. Družina TRP beljakovin predstavlja nov razred ionskih kanalčkov, ki so udeleženi v kalcijevem signaliziranju. Prototipični člani tega razreda, TRP in TRPL, so bili prvič opisani v vidnem sistemu vinske mušice, kjer posredujejo od svetlobe odvisno prevodnost (Hardie in Minke 1992, 1993a, Niemeyer et al. 1996). Od tedaj raziskujejo fototransdukcijo vinske mušice kot sistem, v katerem je mogoče z molekularnimi metodami študirati funkcije TRP kanalčkov. Mušičji TRP sodijo k podrazredu kratkih TRP kanalčkov (STRPC, "Short TRP channels"). STRPC kanalčki so vselej za Ca^{2+} permeabilni kationski kanalčki, ki jih aktivira z receptorji posredovana stimulacija različnih izoform fosfolipaze C.

Doslej so bili identificirani trije strukturno sorodni kanalski proteini vidnega sistema vinske mušice, ki jih kodirata gena 'transient receptor potencial' (*trp*) (Montell in Rubin 1989), 'transient receptor potential like' (*trpl*) (Phillips et al. 1992), našli pa so še tretjo, TRP podobno obliko kanalčka (TRP γ) (Xu et al. 2000). Vsi navedeni kanalčki so v velikem številu prisotni v rbdomerah fotoreceptorjev (Niemeyer et al. 1996, Chevesich et al. 1997, Xu et al. 2000), poleg tega pa so sorodne TRP kanalčke našli še v antenah, kjer nabrž posreduje olfaktorni odgovor ali pa sodeluje pri razvoju olfaktornih receptorskih celic (Störtkuhl et al. 1999).

Genetski in elektrofiziološki eksperimenti so pokazali, da je od svetlobe odvisna prevodnost v fotoreceptorjih vinske mušice posredovana z dvema vrstama ionskih kanalčkov, TRP in TRPL. Oboji imajo skupne strukturne lastnosti, ki jih najdemo tudi pri vretenčarskih napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkih. Ena od teh je organizacijska shema iz šestih transmembranskih domen (glej npr. pregledni članek Minke in Cook 2002). *Trp* ("transient receptor potential") mutante kažejo občutno zmanjšane, prehodne (tranzientne) odgovore na svetlobo (Consens in Manning 1969), medtem ko je *trpl;trp* dvojna mutanta popolnoma neodzivna na svetlobo.

Poskusi z metodo whole cell patch clamp na izoliranih omatidijih vinske mušice kažejo, da je svetlobni tok pri *Drosophila* linearen seštevek tokov skozi dva razreda kanalčkov, Trp in Trpl. Pri tem ni zključena možnost, da se kanalčki pojavljajo tudi v heteromultimerah (Niemeyer et al. 1996, Xu et al. 1997).

Verjetno sta oba tipa ionskih kanalčkov pri divjem tipu (TRP in TRPL) v funkcionalni interakciji in delujeta vzajemno, na kar kaže dejstvo, da ERG divjega tipa ni linearen seštevek ERG *trp* in *trpl* mutant (Leung, Geng in Pak, 2000) (slika 6).



Slika 6: Elektrofiziološki odziv sevov *wt*, *trpl*^{P343} in *trpl*³⁰² na 20 s svetlobni pulz (znotrajcelični posnetki odgovorov fotoreceptorjev na 20 s pulz bele svetlobe). Zasenčeno območje prikazuje seštevek receptorskih potencialov *trpl*³⁰² in *trpl*^{P343}. Seštevek ni enak odzivu divjega tipa (*wt*) (prirejeno po Leung, Geng in Pak, 2000).

TRP kanalček je v rabdому približno šestkrat bolj abundanten od TRPL kanalčka, je selektiven za kalcij ($pCa^{2+} : pNa^{+} > 100:1$), njegova prevodnost je razmeroma nizka (8pS) (Reuss et al. 1997) in je zasidran v transducisom prek InaD proteina. Po drugi strani pa je TRPL ionski kanalček dokaj neselektiven ($pCa^{2+} : pNa^{+} = 4:1$), ima razmeroma visoko prevodnost (35pS) (Reuss et al. 1997) in naj ne bi bil pritrjen na ogrodne beljakovine.

Posebnost TRPL kanalčka je, da sta njegova abundanca in aktivnost v mikrovilu odvisna od svetlobne adaptacije (Bähner et al. 2001): v mraku sta najvišji, v močni svetlobi pa kanalček v roku ene ure praktično izgine iz svetločutnega dela. Proces znotrajcelične

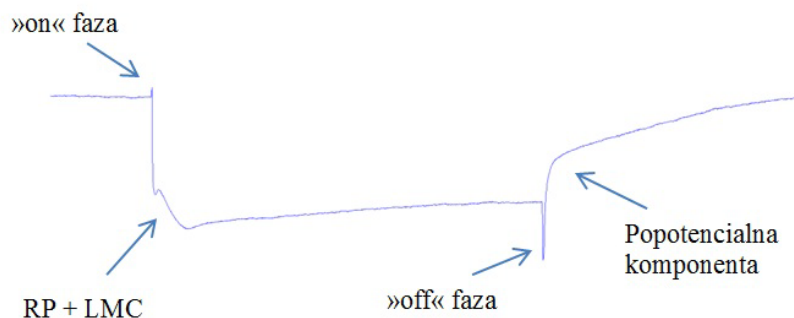
translokacije je reverzibilen, potovanje v rbdomero v temi traja eno uro, mehanizem translokacije pa ni znan. Kaže, da prav spreminjanje razmerja med TRP in TRPL služi kot pomemben mehanizem receptorske adaptacije na svetlobne pogoje (Bähner et al. 2001).

1.4 ELEKTRORETINOGRAM

Elektoretinogram je zunajcelični zapis sprememb električne napetosti med očesom in nevzdražnim delom telesa, in je sumarični potencial fotoreceptorskih celic vseh 700-800 omatidijev očesa in nevronov višjega reda.

Elektoretinogram je sestavljen iz štirih faz (slika 7):

- **“on” faza**; pojavi se ob začetku svetlobnega dražljaja, gre pa za hiter hiperpolarizacijski odgovor LMC nevronov. V sinapsah med fotoreceptorji in LMC nevroni histamin kot prenašalna molekula, ki odpira kloridne kanalčke, ob depolarizaciji fotoreceptorjev povzroči hiperpolarizacijo LMC nevronov.
- **vsota receptorskega potenciala in odgovora LMC nevronov**; v tem delu zunajcelično spremembo napetosti tvori seštevek negativno polarne, tonične depolarizacije fotoreceptorjev in pozitivno polarne, fazično-tonične hiperpolarizacije LMC nevronov
- **“off” faza**; prehodno naraščanje in zatem pojemanje zunajcelične spremembe napetosti zaradi repolarizacije fotoreceptorjev in fazične depolarizacije LMC nevronov
- **popotencialna komponenta**; kot posledica ugašanja odgovora fotoreceptorjev in LMC nevronov



Slika 7: Faze elektoretinograma pri divjem tipu (*wt*)

Oblika elektoretinograma je zelo odvisna od namestitve registracijske elektrode. Najučinkovitejša je tik pod korneo, in sicer zaradi na ta način omogočene stabilnosti preparata in minimalnega prispevka LMC nevronov.

1.5 PROBLEMI IN DELOVNE HIPOTEZE

Proces zaznave svetlobe v mikrovilarnih fotoreceptorjih, kakor ga poznamo v primeru vinske mušice, poteka preko aktivacije G-proteinske signalne kaskade, ki vodi do odprtja ionskih kanalčkov TRP in TRPL. To sta dve sorodni vrsti ionskih kanalčkov z nekoliko različnima prevodnostima za Na^+ in Ca^{2+} ione. TRP kanalček je vezan na ogrodni protein in je zato vselej prisoten v mikrovilih, TRPL kanalček pa ni vezan ter se translocira med mikrovili in somo fotoreceptorjev v odvisnosti od svetlobne adaptacije celice. Partnerski laboratorij iz Univerze v Hohenheimu je na modelu vinske mušice translokacijo TRPL kanalčka odkril in jo študira tudi s pomočjo transgenih vinskih mušic, ki imajo v fotoreceptorjih izražene takoimenovane himerične ionske kanalčke, sestavljene iz delov TRP in TRPL. V naš laboratorij smo za elektrofiziološke preiskave prejeli tri ključne seve s himeričnimi kanalčki, izraženimi pri mutiranih mušicah, ki so sicer brez nativnih ionskih

kanalčkov TRP in TRPL v fotoreceptorjih. Himerični kanalčki so sestavljeni iz transmembranske domene TRP in iz citoplazmatskih koncev TRP ali TRPL.

Z elektoretinografijo transgenih vinskih mušic s himeričnimi ionskimi kanalčki TRP/TRPL smo želeli ugotoviti, ali so izraženi himerični ionski kanalčki tudi funkcionalni. Ugotoviti smo želeli tudi, kateri citoplazemski konec kanalčka vpliva na njegovo prisotnost v mikrovilu, na translokacijo in nemara tudi na prevodnost.

Klasične mutante vinske mušice *trp* in *trpl*, ki vsebujejo le en razred ionskih kanalčkov, imajo zelo značilne ERG fenotipe: *trp* odlikuje prehodni (tranzientni) receptorski potencial (odtod kratica *trp*), *trpl* pa tonični receptorski potencial z oscilacijami in ERG z zmanjšano nevrnalno komponento. Predpostavljali smo, da bomo pri mušicah s himeričnimi ionskimi kanalčki izmerili ERG, ki bo podoben ERGju ene ali druge klasične mutante, nemara pa bo imel celo mešane lastnosti ERG obeh sevov. S pomočjo tega smo sklepali o funkcionalnih lastnostih himeričnih kanalčkov ter o funkcionalnem pomenu njihovih citoplazmatskih domen. Ker so ionski kanalčki označeni s kovalentno vezanim fluorescentnim proteinom eGFP, smo lahko o njihovi prisotnosti v mikrovilih ali somi sklepali na osnovi slikanja s fluorescentnim mikroskopom.

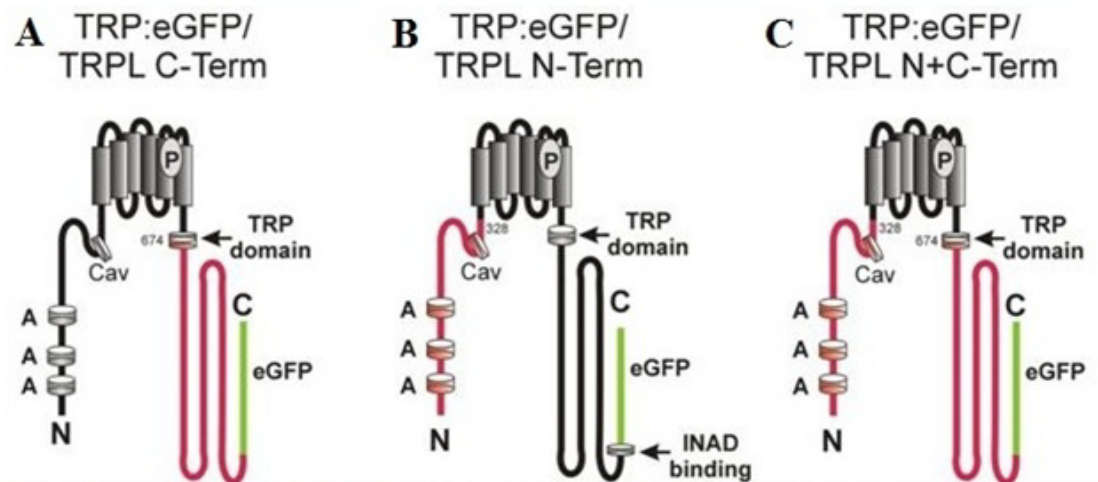
2 MATERIALI IN METODE

2.1 POSKUSNE ŽIVALI

V diplomski nalogi smo raziskovali belooke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), ki v očeh nimajo zaščitnega pigmenta. Seve belookih mušic smo prejeli iz Oddelka za biosenzoriko, Inštituta za fiziologijo Fakultete za naravoslovne znanosti Univerze Hohenheim v Stuttgartu. Končni del križanja smo opravili sami.

Raziskave so potekale na mušičjih sevih, ki so imeli v fotoreceptorjih brez kanalčkov TRP in TRPL (sev *trpl*³⁰²;*trp*^{P343}) pod nadzorom rodopsinskega (Rh1) promotorja izražene naslednje himerične ionske kanalčke:

1. sev himera 1 (Ch1): kanalček s transmembransko domeno in N-koncem TRP in pripetim fluorescentnim označevalcem eGFP; C-konec iz kanalčka TRPL
2. sev himera 2 (Ch2): kanalček s transmembransko domeno in C-koncem TRP in pripetim fluorescentnim označevalcem eGFP; N-konec iz kanalčka TRPL
3. sev himera 3 (Ch3): kanalček s transmembransko domeno TRP in pripetim fluorescentnim označevalcem eGFP; C- in N-konca iz kanalčka TRPL



Slika 8: Shematski prikaz ionskih kanalčkov pri sevih Ch 1, Ch 2 in Ch 3. A, himera 1 (TRP:eGFP/TRPL C-Term), B, himera 2 (TRP:eGFP/TRPL N-Term), C, himera 3 (TRP:eGFP/TRPL N+C-Term) (prirejeno po Richter, 2007).

V kontrolnih poskusih smo uprabili še naslednje seve:

4. sev *trp*^{P343} – izločeni kanalčki TRP, samo kanalčki TRPL; v ERG prisotni samo prehodni (tranzientni) receptorski potenciali
5. sev *trpl*³⁰² – izločeni kanalčki TRPL, samo kanalčki TRP; manj izrazit ERG fenotip, oscilatorni receptorski potenciali in zmanjšani “on” in “off” komponenti
6. sev A35-divji tip (*wt*)

Pričakovali smo namreč, da bodo fenotipi himeričnih sevov podobni fenotipom sevov *trp*, *trpl* ali pa kombinaciji obeh.

2.1.1 Potek in shematski prikaz križanja sevov

Homozigotna oblika seva Himer 3 je bila iz neznanega razloga slabo viabilna in nestabilna. Zato smo pred poskusi s križanjem vzgojili heterozigotni sev, ki je imel izločena oba kanalčka, TRP in TRPL, ter izraženo eno kopijo kanalčka Ch3. Križanje je prikazano na spodnji shemi.

V shematskem prikazu križanja sta alela posameznega kromosoma mušice ločena z vodoravno ulomkovo črto, kromosomi med seboj pa s podpičjem. Kromosomi so prikazani v naslednjem vrstnem redu: spolni, avtosom 2, avtosom 3; avtosoma 4 ne prikazujemo. Znak + pomeni, da na kromatidi kromosoma ni nobene spremembe glede na divji tip. Znaki yw, CyO in Sb so označevalci, ki jih fenotipsko vidimo kot: yw-(»yellow-white«) svetlejše in bolj prosojno telo, CyO-(»curly wings«) kodrasta krila, Sb-(»stubble«) toge torakalne dlake. Ti zunanji znaki so nam pomagali pri selekcioniranju pravih potomcev, ki smo jih uporabili za naslednji korak. Potomec križanja se nahaja pod križcem njegovih staršev.

Preglednica 1: shematski prikaz križanja

$$\frac{yw^{-}}{yw^{-}}; \frac{CyO}{trpl^{-}}; \frac{Sb}{Ch3\ trp^{-}} \times \frac{yw^{-}}{yw^{-}}; \frac{trpl^{-}}{trpl^{-}}; \frac{trp^{-}}{trp^{-}}$$

$$\frac{yw^{-}}{yw^{-}}; \frac{trpl^{-}}{trpl^{-}}; \frac{Ch3\ trp^{-}}{trp^{-}}$$

Mušice smo od izleganja do poskusa gojili v temi, za poskus pa smo uporabili dva do sedem dni stare.

2.1.2 Preparacija poskusnih živali

S primerno preparacijo smo želeli doseči čim daljšo obstojnost preparata in hkrati čim manjšo mobilnost živali, da bi bila kakovost ERG karseda visoka.

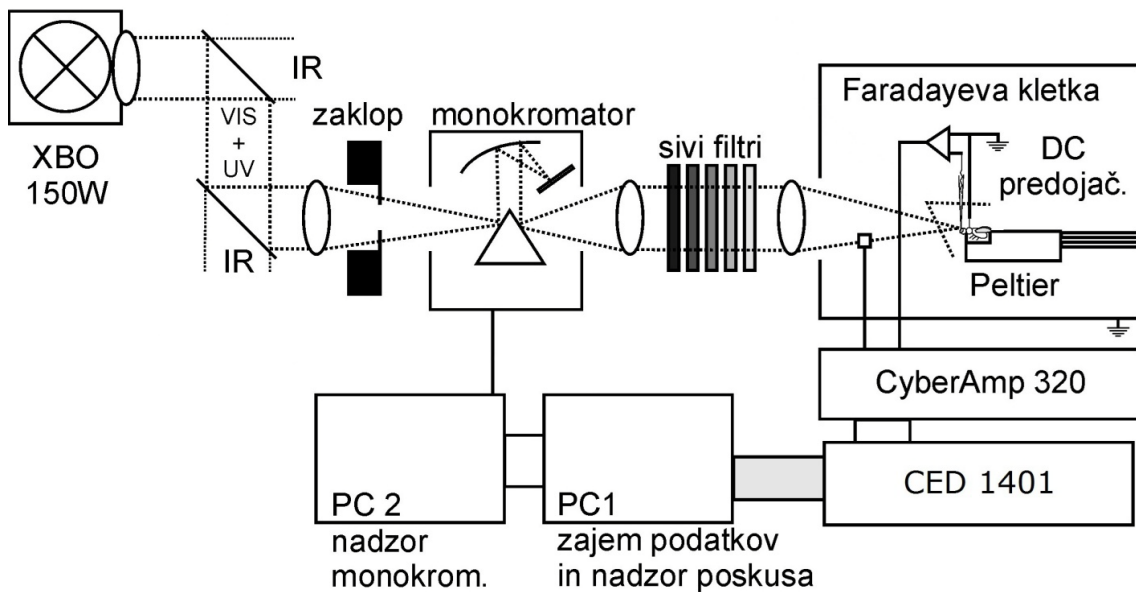
Posamezno mušico smo s pinceto najprej vzeli iz epruvete, ji zaradi lažjega dela odstranili noge, nato pa jo, za boljšo imobilizacijo, bočno pritrdili na bakreni nosilec. To smo naredili tako, da smo s pomočjo mešanice čebeljega voska in kolofonije prilepili toraks in proboscis na podlago. Pri tem smo pazili tudi na to, da je bilo eno oko pod ustreznim kotom za kasnejše zabadanje merilne elektrode. Nosilec s fiksirano živaljo smo nato vstavili na mizico mikromanipulatorja v Faradayevi kletki, ki poleg električne nudi tudi svetlobno izolacijo.

2.2 FOTOSTIMULACIJA

2.2.1 Svetlobni vir

Glavni vir svetlobe je bila ksenonova žarnica tipa XBO z močjo 150 W (Osram, Nemčija). V začetni fazi smo svetlobi z dvema periskopsko postavljenima hladnima zrcaloma izločili infrardeči del spektra. Ohlajeno svetlobo smo z lečo zbrali na vhodni reži računalniško vodenega monokromatorja Oriel 77250 (Oriol, Stratford, ZDA).

Dolžino svetlobnega pulza smo uravnavavali z računalniško vodenim zaklopom (Compur, Nemčija), nameščenim pred monokromatorjem. Svetlobne žarke iz monokromatorja smo k dimirali z vmesno zbiralno lečo. V naslednji fazi žarkov ne pot smo v optično os po potrebi ročno vstavljali refleksijske nevtralno sive filtre absorbance 3.2, 2.3, 1 in 0.5 (Melles Griot, Zeevenar, Nizozemska). Sledila je še objektna leča, s katero smo svetlobo zbrali na preparat. Vse komponente žarkovne poti prepoščajo UV svetlobo.



Slika 9: Shema fotostimulatorja in elektrofiziološkega kompleta.

2.3 REGISTRACIJA ERG

Steklene kapilare iz borosilikatnega stekla z zunanjim premerom 1,5 mm, notranjim premerom 0,7 mm in filamentom 10 μm smo na "pullerju" P-97 (Sutter, Novato, ZDA) oblikovali v pipete z odprtino cca 10 μm in upornostjo v kiloohmskem razredu. Napolnili smo jih z fiziološko raztopino (v mM: NaCl 113, KCl 2, CaCl₂ 1, NaHCO₃ 2; pH=7,2), jih vstavili v nosilec z Ag/AgCl žico (ALA Scientific Inst., Westbury, ZDA) in tako naredili zunajcelične registracijske elektrode. Nosilec z elektrodo smo pritrdili na ročni manipulator (Narishige, Tokio, Japonska) z motorizirano Z-osjo (Maerzhauser, Wetzlar, Nemčija). S polavtomatsko mikromanipulacijo smo predrli korneo in namestili konico elektrode čim bližje površini. Za izdelavo indiferentne elektrode smo uporabili 50 μm klorirano srebrno žico. Nosilec indiferentne elektrode smo pritrdili na bakren blok s preparatom in jo med preparacijo s pinceto namestili v toraks.

Signal, ki smo ga odvajali iz očesa, smo s predojačevalnikom AI 401 desetkratno ojačali in peljali na obdelovalnik signala CyberAmp 320 (Axon Instruments Inc., Union City, ZDA). Izravnali smo potencialno razliko med elektrodama, signal dodatno ojačali (20 do 100-krat) in ga filtrirali z nizkopasovnim filtrom ($f_c=200$ Hz). Za digitalizacijo signala smo uporabili 12 bitni vmesnik CED 1401+ (CED, Cambridge, Velika Britanija), in ga na PC Pentium računalniku zapisovali s programom Whole Cell Analysis Program (WCP), verzija 3.5.6 (avtor prof. John Dempster, Univerza Strathclyde, Velika Britanija). Poleg zapisa signala program prek digitalnih izhodov omogoča krmiljenje zaklopa ter drugega računalnika za nadzor monokromatorja.

2.4 EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI

Pri delu na vseh osebkih vseh sevov poskusnih živali smo uporabili naslednje tri protokole:

2.4.1 PDA protokol

S PDA protokolom smo preverjali prisotnost PDA stanja R1-R6 receptorskih celic. V našem primeru smo uporabili OBBOO protokol, kar pomeni, da smo poskusne živali zaporedoma osvetljevali najprej s pulzom oranžne svetlobe (O; 580 nm), zatem z dvema pulzoma modre svetlobe (B,B; 480 nm) in nato še z dvema pulzoma oranžne svetlobe (O,O; 580 nm).

Protokol je torej vseboval 5 zaporednih svetlobnih pulzov, vsak posamezen pulz je trajal 5 s, čas med pulzi pa je znašal 10 s.

Najprej smo začeli s pulzom oranžne svetlobe, ki je ves metarodopsin v fotoreceptorjih pretvoril v njegovo rodopsinsko obliko. Nato sta z zamikom sledila dva modra pulza, ki sta ustvarila prebitek metarodopsina in s tem podaljšani popotencial (PDA) v fotoreceptorjih s funkcionalnimi ionskimi kanalčki, oziroma začasno neodzivnost na dražljaje v primeru nefunkcionalnosti ionskih kanalčkov. Po dveh modrih sta sledila še dva oranžna pulza, ki sta metarodopsin ponovno vrnila v njegovo rodopsinsko obliko.

S pomočjo tega protokola smo dobili podatke o funkcionalnosti posameznih razredov fotoreceptorskih celic.

2.4.2 Meritve občutljivosti fotoreceptorjev na različne svetlobne intenzitete

Pri omenjenem protokolu smo uporabili svetlobni vir valovne dolžine 580 nm, ki smo ga zasenčevali s kombinacijami sivih filtrov. S tem smo dosegli osvetljevanje z različnimi svetlobnimi intenzitetami, in sicer od -6 log enot do polne svetlobe, in to v korakih po 0,5 log enote. Tako smo vsako poskusno žival osvetlili skupno s trinajstimi svetlobnimi pulzi. Vsak pulz je trajal 1 sekundo, čas med pulzi pa je znašal 5 s.

2.4.3 Meritev refraktarnosti fotoreceptorjev

Vinske mušice smo najprej osvetlili s pulzom modre svetlobe (valovna dolžina 480 nm), ki je v fotoreceptorjih ves rodopsin pretvoril v metarodopsinsko obliko in izzval PDA. S tem smo fotoreceptorje izpostavili maksimalni metabolni obremenitvi in izpraznjenju rezerv

sekundarnih sporočevalnih molekul. Nato smo z oranžno svetlobo (580 nm) vidni pigment pretvorili nazaj v rodopsinsko obliko in prekinili obremenitev. Takoj zatem smo merili odgovor na kratke (30 ms) oranžne testne pulze (580 nm, 15 pulzev, vsakih 10 s). Merili smo časovni potek refraktarnosti, to je čas zmanjšane odzivnosti na testne pulze. Amplitudo odgovora na testni pulz smo s pomočjo reverzne Hillove transformacije preračunali na efektivno svetlobno občutljivost. Parametre Hillove funkcije smo predhodno izračunali v poskusu, pri katerem smo merili intenzitetne krivulje. Glede na različno sposobnost obnovitve zalog sekundarnih obveščevalnih molekul, smo pri sevih zabeležili različno dolg čas refraktarnosti. Čas refraktarnosti smo ovrednotili v obliki časovne konstante τ večanja občutljivosti na testni pulz.

2.5 OBDELAVA REZULTATOV

2.5.1 Uporabljeni programska orodja

V programu WinWCP smo zapisali signale pridobljene pri meritvah in naredili osnovne analize odvisnosti amplitude odgovora od valovne dolžine ali od svetlobne intenzitete. Amplitude odgovorov smo merili na platojskem delu ERG, razen pri protokolu intenzitetnih krivulj, kjer smo merili tudi amplitude vrhov (pri sevu himera 3). Za nadaljnjo obdelavo smo numerične podatke prenesli v Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), Origin 7.0 (OriginLab Corp., Northampton, ZDA) ali Prism 4.03 (GraphPad Software, ZDA). Za slikovni prikaz elektoretinogramov smo signale obdelali s programom CorelDraw (Corel Corp., Ottawa, Canada).

2.5.2 Statistična obdelava rezultatov

Statistično smo analizirali pomembnost razlik med dvema skupinama s Studentovim T-testom z dvorepo distribucijo v programu Microsoft Excel. Na ta način smo podatke obdelali pri amplitudah ERG depolarizacije ter pri padcu amplitude ERG med prvim

pulzem. Student T-test izračuna verjetnost (p), da dve skupini podatkov pripadata isti populaciji. Če je $p < 0.05$, se dve skupini statistično pomembno razlikujeta.

2.5.3 Prilagajanje jakostne krivulje

Prilagajanje (curve fitting) jakostne krivulje smo izvedli v programu Origin 7.0 s prilagajanjem Hillove funkcije. Odnos med velikostjo odgovora in logaritmom jakosti svetlobe smo izračunali po funkciji, ki sta jo Matić in Laughlin (1981) zapisala v naslednji obliki:

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{I^n}{(I^n + I_{50}^n)} \quad \dots(1)$$

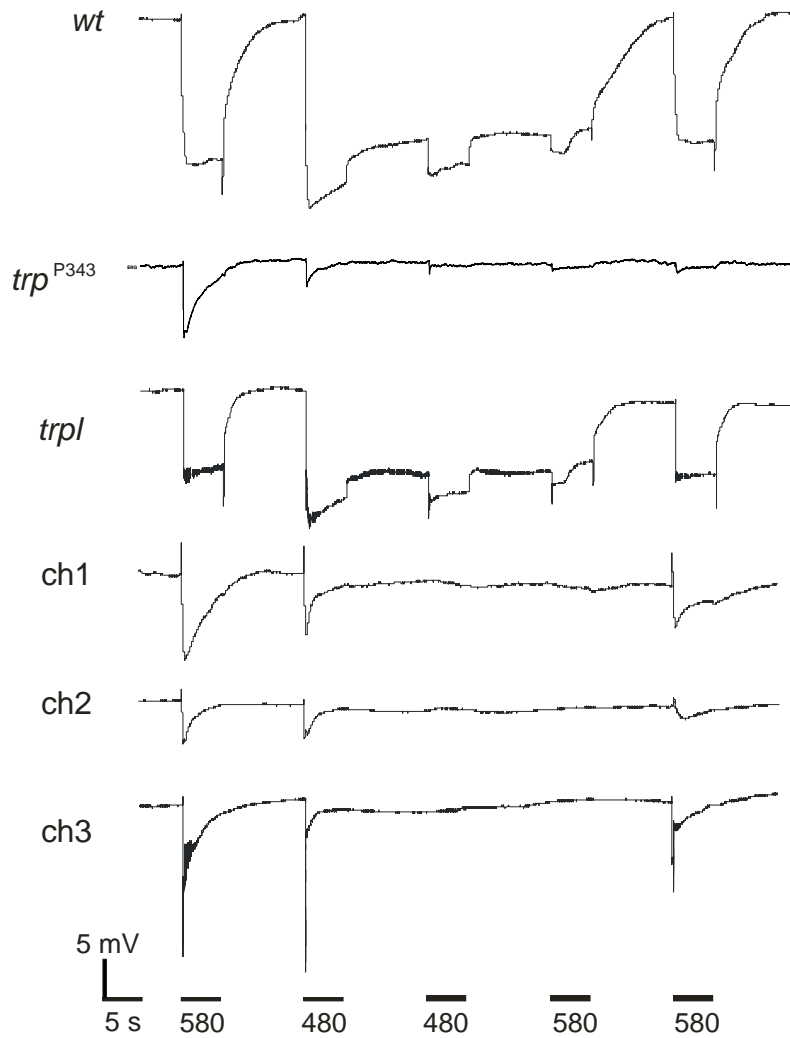
kjer je V = amplituda odgovora, V_{max} = maksimalna amplituda odgovora, I_{50} = jakost dražljaja, ki izzove polovico maksimalnega odgovora, I = intenziteta svetlobe in n = Hillov koeficient, ki opisuje strmino krivulje.

Parametra n in I_{50} sta uporabna za vrednotenje lastnosti očesa. Naklon krivulje določa dinamično območje svetlobnih jakosti, v katerem je oko funkcionalno (večja strmina pomeni ožje območje delovanja), intenziteta, ki izzove polovico maksimalnega odgovora, pa ima informativno vrednost glede občutljivosti očesa (nižja vrednost I_{50} pomeni večjo občutljivost).

3 REZULTATI

3.1 Splošne značilnosti ERG in PDA vinskih mušic

Vinskim mušicam smo merili ERG ob osvetljevanju s petimi svetlobnimi dražljaji, in sicer z enim oranžnim, dvema modrima in zopet dvema oranžnima svetlobnima pulzoma. Vsak svetlobni dražljaj je trajal 5 s, čas med dražljaji pa je znašal 10 s. Modra dražljaja sta v fotoreceptorjih R1-6 ustvarila visok delež metarodopsina. V primeru, da so imeli fotoreceptorji funkcionalne ionske kanalčke, je tako nastali prebitek metarodopsina v njih izzval podaljšani popotencial (PDA), sicer pa le prehodno neodzivnost na dražljaje. Popotencial ali neodzivnost je prekinila oranžna svetloba, ki je ves Rh1 pretvorila nazaj v rodopsinsko obliko.



Slika 10: ERG in PDA vseh sevov. Levo, oznaka seva: *wt*, divji tip; *trp^{P343}*, »transient receptor potential«; *trpl*, »transient receptor potential - like«; *ch1-3*, himera 1-3 (himerični kanalček, izražen pri sevu *trp^{P343};trpl*). 580, oranžni pulz (580 nm); 480, modri pulz (480 nm).

divji tip (*wt*)

Za ERG divjega tipa vinske mušice je ob osvetlitvi z oranžno in modro svetlobo značilna »on« faza ob začetku pulza, pri kateri gre za hiter in prehodni hiperpolarizacijski odgovor LMC nevronov. V ERG nato prevladuje tonični plato depolarizacije fotoreceptorjev. Ob koncu osvetljevanja nastopi »off« komponenta LMC nevronov. Ob osvetlitvi z modro

svetlobo smo izzvali PDA. Amplituda ERG odgovora na prvi oranžni pulz je bila $13,9 \pm 1,4$ mV.

trp^{P343}

Za ERG mutante *trp*^{P343} smo »on« fazo zaznali pri 40% preparatov, medtem ko je pri ostalih 60% nismo opazili. Amplituda ERG odgovora na oranžni pulz je bila $12,4 \pm 1,9$ mV in je že med pulzem pojemala (*trp*, »tranzientni receptorski potencial«). PDA nismo uspeli izzvati, namesto le-tega smo opazili zmanjšano občutljivost na drugi pulz.

trpl

Pri ERG mutante *trpl* »on« faza ni prisotna, medtem, ko smo »off« fazo zaznali. Plato ERG je toničen, tako kot pri divjem tipu, vendar pa so med osvetlitvijo prisotne značilne oscilacije neznanega izvora. Izzvali smo PDA, amplituda odgovora je bila 20 mV. Tu navajamo le vrednost amplitude ERG pri eni sami živali, ki smo jo uporabili kot kvalitativno referenco za nadaljnje primerjave fenotipov himeričnih mutant s kanoničnimi fotoreceptorskimi mutantami.

Primerjava ERG referenčnih sevov *wt*, *trp*^{P343} in *trpl*

Najbolj sta si podobna ERG *wt* in *trpl* mutante, imata namreč podobno amplitudo odgovora, tonični plato, prav tako pa smo pri obeh izzvali PDA. Razlikujeta se v »on« fazi, ki je za *wt* značilna, za *trpl* mutanto pa ne, in v oscilacijah med platojem ERG, ki so značilne le za *trpl* mutanto.

ERG mutante *trp*^{P343} se je bistveno razlikoval od ERG ostalih dveh tipov mušic. Amplituda je bila vidno manjša, plato je bil prehoden, PDA pa ni bilo mogoče izzvati.

Razvidno je torej, da odsotnost TRP kanalčkov izzove prehodni (tranzientni) ERG, medtem ko odsotnost TRPL kanalčkov izzove oscilacije, naložene na tonični plato, ter izostanek »on« faze ERG.

Primerjava ERG mušic s himeričnimi kanalčki z ERG referenčnih sevov

Testirali smo ERG treh sevov, ki so nastali s transformacijo seva *trp;trpl* (popolnoma slep sev) z genom za himerični ionski kanalček TRP-TRPL. Trije sevi s himeričnimi ionskimi kanalčki so imeli v fotoreceptorjih izražen samo himerični ionski kanalček, sestavljen iz delov TRP in TRPL, zato smo pričakovali, da bo njihov ERG podoben ERG seva *trp*^{P343} ali *trpl*.

ERG fenotip himere 1

Plato ERG je prehoden (tranzienten). Odziva na drugi modri in drugi oranžni svetlobni dražljaj nismo zaznali, opazili smo prehodno neodzivnost na dražljaje, torej tudi PDA ni bil zabeležen. Amplituda odgovora je bila $7,5 \pm 0,5$ mV, in značilno manjša od amplitude odgovora pri sevu *wt*, ne pa tudi od amplitude pri sevu *trp*^{P343}. ERG je bil v vseh značilnostih podoben ERG pri *trp*^{P343}.

ERG fenotip himere 2

Plato ERG je prehoden (tranzienten). Odziva na drugi modri in drugi oranžni svetlobni dražljaj nismo zaznali, opazili smo prehodno neodzivnost na dražljaje, torej tudi PDA ni bil zabeležen. Amplituda odgovora je bila $3,5 \pm 0,3$ mV. Ch2 v tem smislu kaže največjo prizadetost, saj je odziv na svetlobne dražljaje najšibkejši, in značilno manjši od odgovora pri sevih *wt* in *trp*^{P343}. ERG je bil v vseh značilnostih, razen v amplitudi, podoben ERG pri *trp*^{P343}.

ERG fenotip himere 3

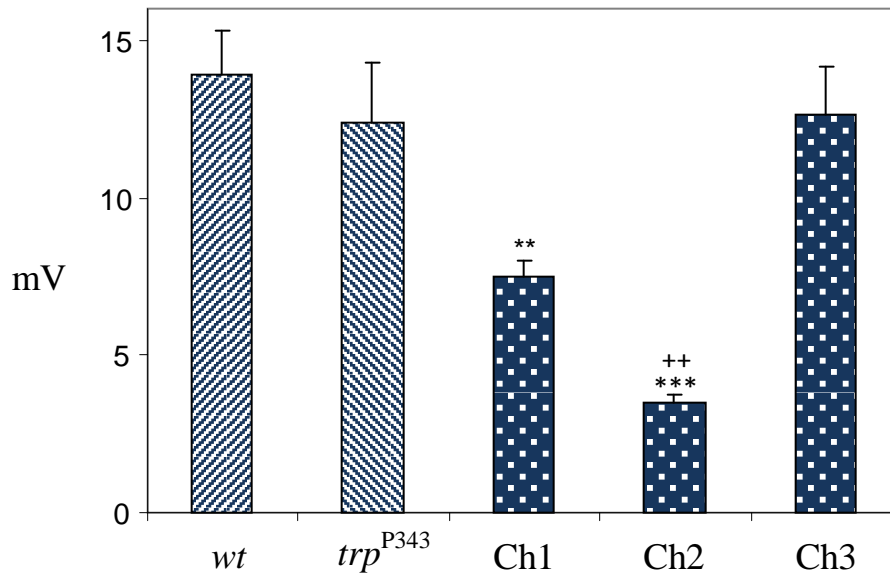
Plato ERG je prehodni (tranzientni). Odziva na drugi modri in drugi oranžni svetlobni dražljaj nismo zaznali, opazili smo prehodno neodzivnost na dražljaje, torej tudi PDA ni bil zabeležen. Amplituda odgovora je bila $12,7 \pm 1,5$ mV in ni bila značilno različna od amplitude odgovora pri sevih *wt* in *trp*^{P343}. Posebnost ERG Ch3 so oscilacije, ki se pojavljajo pri platu ERG, in močno spominjajo na oscilacije pri *trpl*. ERG je bil podoben tako ERG pri *trp*^{P343}, kakor tudi ERG pri *trpl*.

Amplituda ERG kot pokazatelj količine funkcionalnih ionskih kanalčkov v fotoreceptorjih ter inaktivacijskega fenotipa

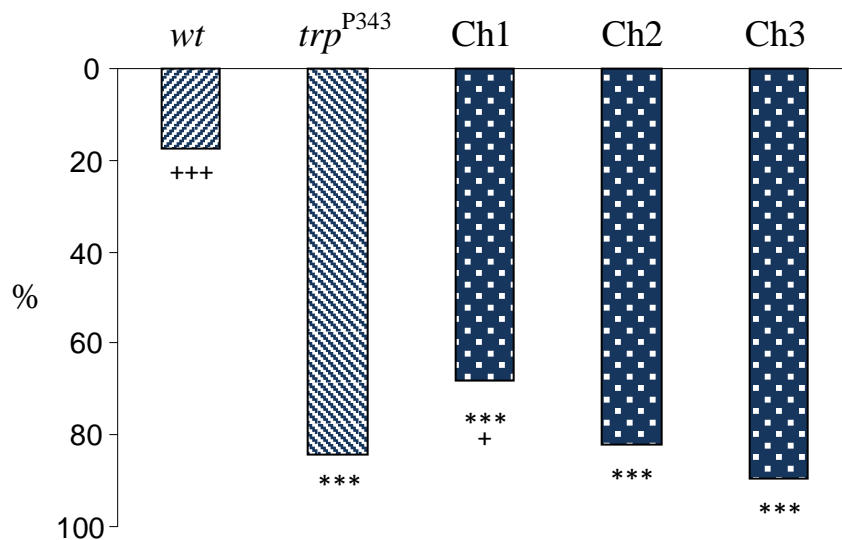
Dosedanje raziskave kažejo, da prisotnost vsaj enega razreda ionskih kanalčkov, TRP ali TRPL, zadošča, da je ERG pri temno adaptirani mušici enako velik, kot pri divjem tipu. To kaže tudi naša raziskava, kjer smo ugotovili, da se amplitudi ERG temno adaptiranih mušic *wt* in *trp*^{P343} ne razlikujeta (slika 11). Podobno velja tudi za mušice seva Ch3. Po drugi strani pa je bil ERG pri mušicah sevov Ch1 in Ch2 pomembno manjši kot pri *wt*, oziroma pri Ch2 manjši tudi kot pri *trp*^{P343}. Domnevamo, da lahko tako izmerjeno amplitudo ERG uporabimo kot pokazatelj funkcionalnosti in količine funkcionalnega ionskega kanalčka v mikrovilih. V tem primeru je pri sevih Ch1 in Ch2 zmanjšana količina himeričnih ionskih kanalčkov v mikrovilu, ali pa je zmanjšana njihova funkcionalnost.

Začetna amplituda ERG pri temno adaptiranih mušicah je neodvisna od tipa ionskega kanalčka, ki je prisoten (TRP ali TRPL). Pojemanje amplitude ERG med samim svetlobnim pulzom pa je dober pokazatelj inaktivacijskega oziroma prehodnega (tranzientnega) fenotipa, ki je značilen za sev *trp*^{P343}. Zato smo izmerili amplitudo ERG odgovora na prvi maksimalni oranžni pulz na začetku pulza in na koncu pulza ter jo izrazili v odstotkih (slika 12). Ugotovili smo, da pri divjem tipu pride do zmanjšanja odgovora le za 17,4%, medtem ko je pri vseh ostalih sevih odstotek padca amplitude občutno večji. Vsi sevi razen *wt* torej

kažejo bolj ali manj izražen prehodni (tranzientni) fenotip ERG. ERG je bil najbolj prehodni pri himeri 3.



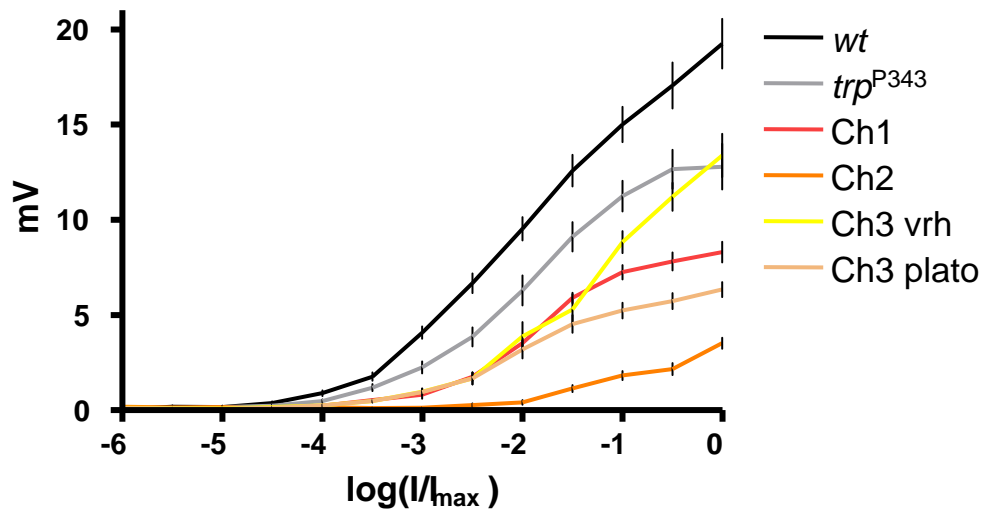
Slika 11: Amplituda ERG ob prvem svetlobnem dražljaju (580 nm). Amplituda depolarizacije je največja pri *wt* ($13,89 \pm 1,43$ mV), pri Ch2 pa najmanjša ($3,64 \pm 0,27$ mV). Vrednosti amplitud pri ostalih sevih: $A_{trp^{P343}} = 12,36 \pm 1,95$, $A_{Ch1} = 7,50 \pm 0,52$ in $A_{Ch3} = 12,65 \pm 1,53$. Statistična pomembnost razlike (p vrednost T-testa) je označena s simbolom * (*wt* proti ostalim sevom) oziroma s simbolom + (*trp^{P343}* proti ostalim sevom). Če je bila p vrednost $< 0,05$, smo to označili z * oziroma +, če je $p < 0,005$ smo označili z ** oz. ++ in če je $p < 0,0005$ smo označili z *** oz. +++. Pri poskusu smo uporabili sledeče število osebkov: $N_{wt} = 9$, $N_{trp^{P343}} = 5$, $N_{Ch1} = 6$, $N_{Ch2} = 8$ in $N_{Ch3} = 4$.



Slika 12: Padeč amplitude ERG v času prvega pulza (580 nm); 0% - ni inaktivacije, 100% - popolno ugašanje odgovora med osvetlitvijo. Pri *wt* amplituda med pulzom pade za manj kot 20% ($\%_{wt}=17,43\pm 1,89$), pri vseh ostalih sevih pa je padeč amplitude zelo izrazit ($\%_{trp^{P343}}=84,17\pm 2,56$, $\%_{Ch1}=68,08\pm 4,67$, $\%_{Ch2}=81,89\pm 3,11$ in $\%_{Ch3}=89,38\pm 3,38$). Statistična pomembnost razlike (p vrednost T-testa) je označena s simbolom * (*wt* proti ostalim sevom) oz. s simbolom + (*trp^{P343}* proti ostalim sevom). Če je bila p vrednost < 0,05, smo to označili z * oziroma +, če je p < 0,005 smo označili z ** oz. ++ in če je p < 0,0005 smo označili z *** oz. +++ . Uporabili smo enako število osebkov kot je zapisano v legendi pod sliko 11.

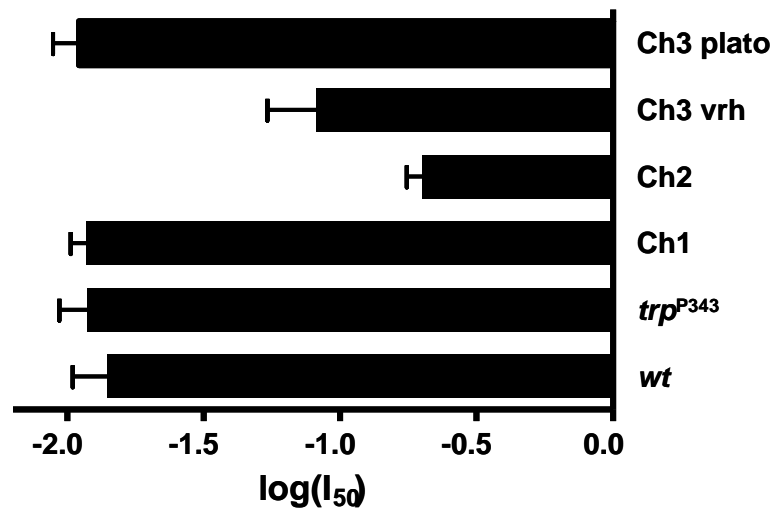
3.2 Intenzitetne krivulje

Vinske mušice smo osvetljevali s 13 pulzi svetlobe valovne dolžine 580 nm (oranžna svetloba) in naraščajoče intenzitete, in sicer od -6 do 0 log enot. Intenziteto smo uravnavali s sivimi filtri. Vsak svetlobni dražljaj je trajal 1s, čas med dražljaji pa je znašal 5 s. S tem smo določali svetlobno občutljivost posameznih sevov.



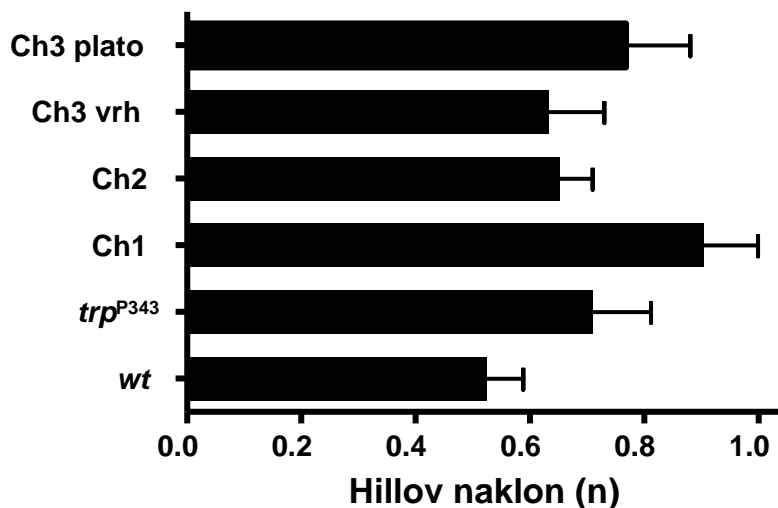
Slika 13: Intenzitetne krivulje. Odvisnost amplitude ERG od jakosti oranžnega pulza (580 nm) pri vseh sevih. Pri poskusu smo uporabili sledeče število osebkov: $N_{wt}=4$, $N_{trp^{P343}}=5$, $N_{Ch1}=8$, $N_{Ch2}=5$ in $N_{Ch3}=8$.

Merili smo maksimalno amplitudo platoja ERG odgovora na graduirano serijo svetlobnih pulzov pri 580 nm. Pri Ch3 smo ločeno obravnavali plato ERG (Ch3 plato) in vrh odgovora (Ch3 vrh), ki je pri tej himeri izrazito velik. Pri vseh svetlobnih intenzitetah je bila amplituda odgovora največja pri mušicah divjega tipa, najmanjša pa pri Ch2. Poleg tega smo pri Ch2 odgovor zabeležili šele pri svetlobni intenziteti -2 log, medtem ko je bil izmerjeni vzdražni prag pri ostalih sevih pri -5 do -4 log. Glede na velikost amplitude odgovora divjemu tipu sledi trp^{P343} , temu pa Ch3 (vrh odgovora), Ch1, Ch3 (plato) in Ch2.



Slika 14: Srednje vrednosti intenzitetnih krivulj. Parameter $\log I_{50}$ predstavlja srednjo vrednost Hillove krivulje, prilagojene empiričnim podatkom. Bolj negativna vrednost $\log I_{50}$ pomeni višjo svetlobno občutljivost. Število poskusnih osebkov je enako, kot je opisano v legendi pod sliko 13.

Prikazana je logaritmirana intenziteta svetlobe, ki je pri posameznem sevu izzvala 50% amplitudo odgovora fotoreceptorjev. Kljub zelo različnim absolutnim amplitudam ERG, sevi *wt*, *trp*^{P343}, Ch1 in Ch3 kažejo enako svetlobno občutljivost, saj smo pri njih zabeležili polovično amplitudo odgovora pri $-1,93 \pm 0,1 \log$ (*trp*^{P343}), $-1,93 \pm 0,06 \log$ (Ch1), $-1,86 \pm 0,13 \log$ (*wt*), oziroma $-1,96 \pm 0,10 \log$ (Ch3). Pri Ch3 se izrazit vrh na začetku ERG pojavi pri višjih svetlobnih jakostih ($-1,09 \pm 0,18 \log$). Sev Ch2 kaže izrazito najnižjo občutljivost na svetlobo, saj 50% odgovora izzove šele pulz z jakostjo $-0,70 \pm 0,06 \log$. Sev Ch2 je za približno 1,2 log enote manj občutljiv od *wt* in *trp*^{P343}, kar pomeni, da je približno 16 krat manj občutljiv na svetlobo.



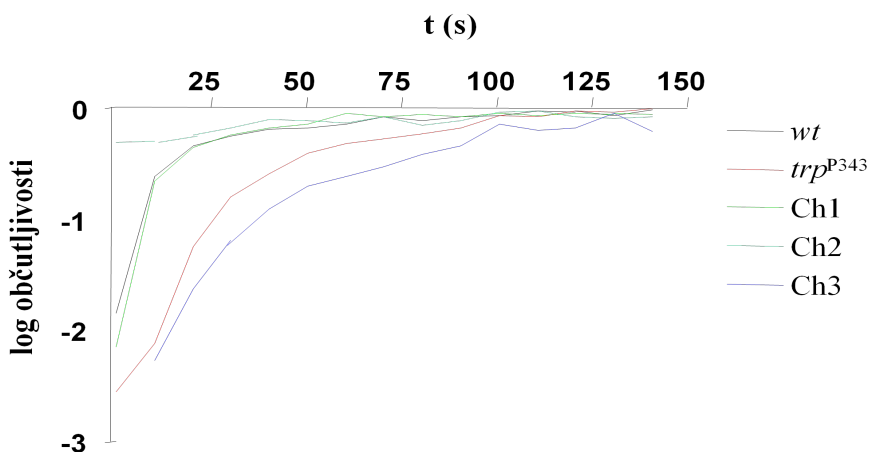
Slika 15: Nakloni intenzitetnih krivulj v točki log I_{50} . Število poskusnih osebkov je enako, kot je opisano v legendi pod sliko 13.

S pomočjo Hillove funkcije smo ugotavljali naklon intenzitetnih krivulj v točki 50% amplitude odgovora fotoreceptorjev. Ugotovili smo, da je naklon Hillove krivulje pri divjem tipu $n_{wt}=0,52\pm 0,06$, kar pomeni, da je dinamično delovno območje pri tem sevu največje, in znaša približno 5 log enot. Naklon pri vseh ostalih sevih je bil večji: največji pri Ch1 ($n_{Ch1}=0,90\pm 0,10$), zatem pri Ch3 (plato) ($n_{Ch3\ plato}=0,77\pm 0,11$), trp^{P343} ($n_{trp^{P343}}=0,71\pm 0,10$) ter Ch2 ($n_{Ch2}=0,65\pm 0,06$). Vrh ERG se pri Ch3 pojavi pri visokih jakostih (slika 13), zato je naklon $n_{Ch3\ vrh}=0,63\pm 0,10$.

3.3 Refraktarnost

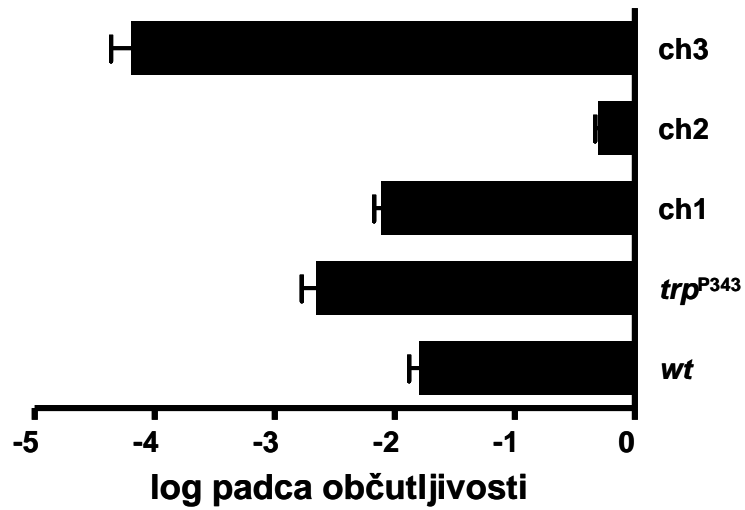
Vinske mušice smo najprej osvetlili s pulzom modre svetlobe (valovna dolžina 480 nm), ki je v fotoreceptorjih ves rodopsin pretvoril v metarodopsinsko obliko in izzval PDA. S tem smo fotoreceptorje izpostavili maksimalni metabolni obremenitvi in izpraznjenju rezerv

sekundarnih sporočevalnih molekul. Nato smo z oranžno svetlobo (580 nm) vidni pigment pretvorili nazaj v rodopsinsko obliko in prekinili obremenitev. Takoj zatem smo merili odgovor na kratke (30 ms) oranžne testne pulze (580 nm, 15 pulzev). Merili smo časovni potek refraktarnosti, to je čas zmanjšane odzivnosti na testne svetlobne pulze. Amplitudo odgovora na testni pulz smo s pomočjo reverzne Hillove transformacije preračunali na efektivno svetlobno občutljivost. Parametre Hillove funkcije smo predhodno izračunali v poskusu, pri katerem smo merili intenzitetne krivulje. Pri sevih smo zabeležili različno dolg čas refraktarnosti. Čas refraktarnosti smo ovrednotili v obliki časovne konstante τ večanja občutljivosti na testni pulz.



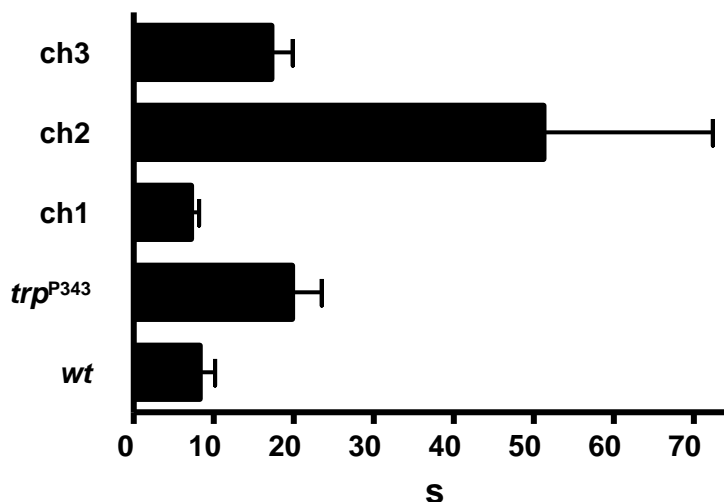
Slika 16: Časovni potek refraktarnosti po PDA. Pri poskusu smo uporabili sledeče število osebkov: $N_{wt}=4$, $N_{trp^{P343}}=5$, $N_{Ch1}=8$, $N_{Ch2}=5$ in $N_{Ch3}=8$.

Slika 16 prikazuje časovne poteke naraščanja občutljivosti na testni pulz. PDA je različno močno prizadel posamezne seve. Pri sevu Ch3 je občutljivost v času 0 s znašala manj kot destetisočinko prvotne (log občutljivosti = -4,2), zato smo to točko izpustili iz grafa. Po 100 s so vsi sevi, razen Ch3, postali znova enako občutljivi na testne pulze, kot pred PDA.



Slika 17: Padeč občutljivosti na testni pulz po PDA

Ugotavljali smo odstotek amplitude prvega odgovora na testni pulz v primerjavi z zadnjim. Podatke smo logaritmsko transformirali in ugotovili, da je zmanjšanje občutljivosti na testni pulz zaradi PDA daleč najbolj izrazito pri sevu Ch3, kjer znaša amplituda prvega odgovora le $-4,20 \pm 0,17$ log maksimalne amplitude. Sledijo trp^{P343} , Ch1 in *wt*, daleč najmanjši padeč občutljivosti pa smo zaznali pri sevu Ch2, kjer je prva amplituda znašala $-0,30 \pm 0,03$ log končne amplitude.



Slika 18: Časovna konstanta vračanja svetlobne občutljivosti po PDA

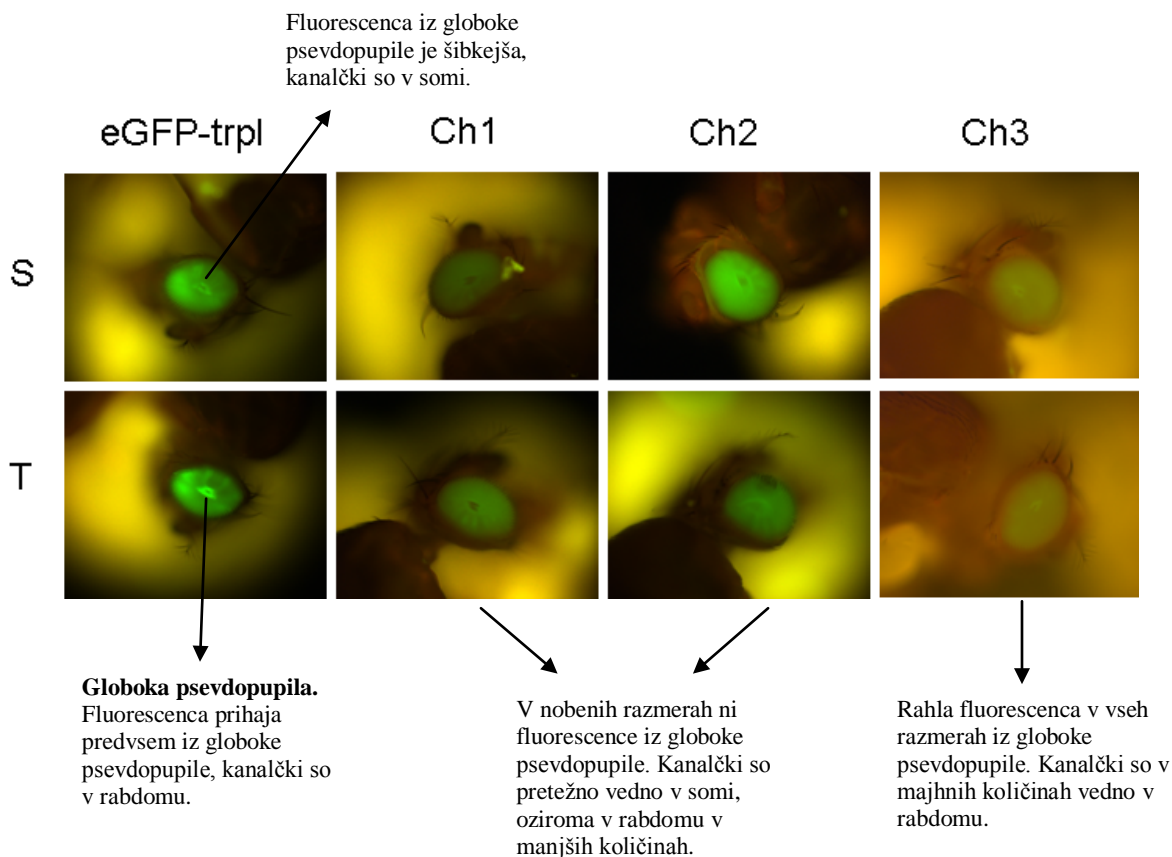
Hitrost vračanja svetlobne občutljivosti smo ocenili tako, da smo izmerili čas, ki je bil potreben, da so amplitude odovorov pri posameznih sevih dosegle 37% končne amplitude, ter tako določili časovno konstanto τ . Ugotovili smo, da se svetlobna občutljivost najpočasneje vrača pri Ch2 ($\tau=51,24\pm 21,14$ s), najhitreje pa pri Ch1 in *wt* ($\tau_{Ch1}=7,18\pm 1,0$ s in $\tau_{wt}=8,28\pm 1,92$ s).

3.4 Prisotnost himeričnih ionskih kanalčkov v rabdому

Vsi himerični ionski kanalčki imajo na aminokislinsko verigo na C-koncu pripojen zelen fluorescentni protein, eGFP. Ta na funkcionalnost ionskih kanalčkov ne vpliva (Meyer et al. 2006), zato pa lahko s pomočjo njegove fluorescence ugotovimo, kakšna je relativna razporeditev ionskih kanalčkov v fotoreceptorski celici oz. v njenih podenotah, rabdому in somi. Za TRPL ionske kanalčke je značilno, da so v temno adaptiranih celicah pretežno v rabdому, v svetlo adaptiranih celicah pa v somi. TRP kanalčki ne migrirajo v odvisnosti od

svetlobe. Predpostavili smo, da bodo vsaj nekateri od himeričnih ionskih kanalčkov podobni TRPL, tako da jih bomo opazili v različnih delih celice v odvisnosti od svetlobnih razmer. Prav tako smo dopustili možnost, da bodo nekateri himerični kanalčki slabše inkorporirani v rbdom pod vsemi pogoji, saj bi bil lahko zaradi njihove spremenjene strukture otežen znotrajcelični transport.

Oči himeričnih vinskih mušic smo slikali s fluorescentnim mikroskopom in uporabili fluorescenco z GFP označenih himeričnih kanalčkov kot kvalitativen pokazatelj količine izraženega himeričnega kanalčka v fotoreceptorjih. Izkazalo se je, da je količina himeričnega kanalčka v očesu pri vseh treh himerah zmanjšana glede na referenčni sev *w¹¹¹⁸;eGFP-trpl*. Na slikah oči himer Ch1 in Ch2 smo opazili, da fluorescenca v nobenih svetlobnih razmerah ni prihajala iz globoke psevdopupile. To seveda ne izključuje možnosti, da je pri teh mušicah ionski kanalček prisoten tudi v rbdomeri (saj je le tam funkcionalen), ga je pa verjetno količinsko zelo malo. V nasprotju s himerama Ch1 in Ch2 smo pri Ch3 opazili, da je ionski kanalček v vseh svetlobnih razmerah prisoten v rbdomeri (slika 19).



Slika 19: Oči mušic s kanalčki eGFP-TRPL in s himeričnimi ionskimi kanalčki (eGFP-Ch1, eGFP-Ch2, eGFP-Ch3), slikane s fluorescentnim mikroskopom (ekscitacijska val. dolžina 480 nm, emisijski filter nad 520 nm). S, svetlo adaptirane mušice; T, temno adaptirane mušice. V geometrijskem centru očesa lahko opazimo svetlo ali temno pego, globoko psevdopupilo, ki nastane z optično superpozicijo projekcij rabdomov. Zato nam jakost fluorescence eGFP v globoki psevdopupili glede na jakost difuzne fluorescence eGFP drugje v očesu daje kvalitativno informacijo o količini eGFP v očesu.

4 DISKUSIJA IN SKLEPI

4.1 Prehodni (tranzientni) ERG fenotip himeričnih sevov

Vsi himerični ionski kanalčki so zgrajeni iz TRP transmembranske domene in citoplazmatskih verig TRP ali TRPL. Pričakovali smo, da bo vrsta transmembranske domene določala tudi elektrofiziološke lastnosti himeričnih ionskih kanalčkov. Zato smo predpostavili, da bodo ERG fenotipi himer podobni ERG fenotipu mutante *trpl*: ERG bi

moral biti toničen, z oscilacijami. Vendar pa so vse preučene mušice s himeričnimi kanalčki imele prehodni (tranzientni) ERG (sliki 10 in 12). Pri sevu *trp*^{P343} posredujejo odgovor na svetlobo samo ionski kanalčki razreda TRPL; posledica tega je prehodni ERG signal. Zato sklepamo, da so vsi himerični kanalčki po svojih funkcionalnih lastnostih podobni TRPL kanalčkom, četudi vsebujejo transmembransko domeno TRP kanalčka. Iz oblike ERG signala seveda ne moremo sklepati o sposobnosti himeričnih kanalčkov za znotrajcelično translokacijo.

Pri sevu Ch3 smo zaznali tudi oscilacije ERG signala, ki so sicer neznanega izvora, so pa značilne za mušice, ki vsebujejo le TRP kanalčke (sev *trpl*). Iz tega sklepamo, da himerični kanalčki pri sevu Ch3 združujejo nekatere funkcionalne lastnosti TRP in TRPL ionskih kanalčkov.

4.2 Fluorescenca izraženih himeričnih kanalčkov in amplituda ERG

Fluorescenca oči himeričnih sevov je bila zmanjšana glede na referenčni sev *w⁺;eGFP-trpl*. Poleg tega je pri Ch1 in Ch2 prihajala le iz some, ne pa iz globoke psevdopupile oziroma rabdoma. Ionski kanalček je funkcionalen samo tedaj, ko je prisoten v rabdomu. Zato smo predpostavili, da bodo amplitude ERG pri himerah zmanjšane, še posebej pri Ch1 in Ch2. Izkazalo se je, da so maksimalne amplitude ERG pri Ch1 in Ch2 res značilno manjše, kot pri divjem tipu (slika 11). Posebej opozarjamo na dejstvo, da je bila amplituda ERG zgolj prepolovljena (Ch1) oziroma zmanjšana na tretjino (Ch2), četudi v rabdomu na slikah ni bilo zaznati prisotnosti ionskega kanalčka. To pomeni, da lahko fotoreceptorske celice dosegajo maksimalne depolarizacije tudi ob zelo zmanjšanih količinah ionskih kanalčkov.

Maksimalna amplituda ERG pri Ch3 ni bila značilno zmanjšana, četudi je bila raven fluorescence nižja kot pri referenčnem sevu. Poudarjamo, da smo pri Ch3 izmerili zelo izrazit in prehoden (tranzienten) vrh ERG, medtem ko je bil plato zmanjšan. Torej nekoliko pretiran vrh ERG določajo specifične funkcionalne lastnosti himeričnega kanalčka Ch3. Himerični kanalček Ch3 je bil prisoten v rabdomu pod vsemi pogoji, zato sklepamo, da se

ni translociral v odvisnosti od svetlobne adaptacije. Pri temu kanalčku sta obe citoplazmatski domeni vrste TRPL. Translokacijo torej preprečuje transmembranska domena TRP, bodisi tako, da kanalček trdno sidra v mikrovil, ali pa preprečuje interakcijo kanalčka z dejavniki translokacije. Obenem lahko trdimo, da je vgraditev kanalčka s TRP transmembransko domeno v rbdom možna le pod pogojem, da sta obe citoplazemski domeni razredov TRP ali TRPL.

Upad amplitude ERG med pulzom smo uporabili kot parameter prehodnosti (tranzientnosti) oziroma toničnosti ERG. Prehodni ERG fenotip pri sevu *trp*^{P343} izvira iz prenizke količine Ca²⁺, ki med depolarizacijo vdre v celico skozi kanalčke TRPL. Vsi himerični sevi so pokazali prehodni ERG fenotip, zato lahko povzamemo, da so vsi trije tipi himeričnih ionskih kanalčkov po prevodnosti podobni TRPL kanalčkom.

Kot zadnji vzrok za zmanjšano vrednost maksimalnih amplitud ERG pri himeričnih sevih pa naj omenimo še možnost spremembe funkcionalnosti ionskih kanalčkov. Obstaja možnost, da je pri umetni sintezi različnih delov osnovnih TRP in TRPL kanalčkov v himerične ionske kanalčke prišlo do zmanjšanja funkcionalnosti teh kanalčkov glede na izhodne. Vsekakor pa lahko opaženo zmanjšanje amplitude ERG pripišemo predvsem zmanjšani količini kanalčkov v rbdomu.

Omenili smo že, da je maksimalna amplituda ERG lahko nesorazmerno velika glede na količino prisotnih ionskih kanalčkov. Zato smo pri vseh sevih izmerili njihovo občutljivost na svetlobne dražljaje v obliki intenzitetnih krivulj ERG. Ugotovili smo, da je, ne glede na zmanjšano amplitudo ERG, absolutna svetlobna občutljivost pri sevih Ch1, Ch3 in pri kontrolnem sevu *trp*^{P343} enaka kot pri divjem tipu (slika 14). To pomeni, da občutljivost fotoreceptorja na šibke svetlobne dražljaje določajo mehanizmi, ki se v fototransdukcijski kaskadi nahajajo pred ionskim kanalčkom kot efektorjem kaskade.

Zmanjšano občutljivost na svetlobo smo opazili le pri sevu Ch2. Fluorescenca v očeh tega seva se ne zdi pomembno manjša, kot pri ostalih himerah, zato sodimo, da tudi količina

kanalčka ni manjša. Sklepamo, da kombinacija TRP domne na C-koncu in TRPL domene na N-koncu fototransdukcijskim dejavnikom otežuje aktivacijo, ali pa pospešuje inhibicijo tega ionskega kanalčka. Dopusčamo tudi možnost, da so kanalčki Ch2 konstitutivno aktivni, in so fotoreceptorji te himere ves čas depolarizirani. S svetlobnim draženjem v tem primeru potem izzovemo le še majhne dodatne depolarizacije; razumljivo je, da se takšni fotoreceptorji ne odzivajo na šibke dražljaje.

Naklon intenzitetne krivulje (naklon prilagojene Hillove krivulje, n) odraža dinamični delovni razpon fotoreceptorjev. Izmerili smo, da je bil naklon pri referenčnem mutiranem sevu *trp*^{P343} povečan glede na divji tip. Znano je, da je dinamično delovno območje odvisno od prisotnosti obeh razredov kanalčkov, TRP in TRPL. Naklon pri himeričnih sevih pa je bil rahlo povečan glede na referenčni sev, torej so imeli vsi himerični sevi zmanjšano dinamično območje. Sklepamo, da je za širok dinamični delovni razpon fotoreceptorjev potrebna funkcionalna prisotnost ionskega kanalčka v zadostni količini ali pa medsebojna interakcija dveh tipov ionskih kanalčkov.

4.3 Refraktarnost

Oči mušic smo izpostavili maksimalni obremenitvi s PDA protokolom in takoj zatem merili njihovo neobčutljivost na svetlobne dražljaje, refraktarnost. Protokol je izzval maksimalno svetlobno adaptacijo, del katere je tudi izpraznitev zaloge fosfoinozidnih obveščevalcev v mikrovilih. Pri divjem tipu vdor Ca^{2+} skozi TRP sicer najbrž proži negativno povratno zanko, ki preprečuje prekomerno izpraznitev fosfoinozidov. V primeru, da v mikrovilih ni TRP kanalčkov, je verjetno kalcijeva prevodnost kanalčkov TRPL prenizka, da bi se omenjena povratna zanka prožila v zadostni meri. To lahko vodi v popolno izpraznjenje zaloge fosfoinozidov ter v refraktarnost fotoreceptorjev. Občutljivost fotoreceptorjev na svetlobo se zatem postopoma povečuje, hitrost vračanja občutljivosti pa sovpada s procesom deadaptacije in resinteze PIP_2 (Hardie et al., 2010).

Amplituda in časovni potek refraktarnosti sta pri Ch1 zelo podobni kot pri sevu *wt*. Sklepamo, da so funkcionalne lastnosti ionskih kanalčkov pri Ch1 podobne lastnostim TRP kanalčkov, saj so pri visokih svetlobnih intenzitetah pri *wt* funkcionalni (torej prisotni v rabdomu fotoreceptorja) le TRP ionski kanalčki.

Zmanjšanje občutljivosti na testni pulz zaradi PDA je daleč najbolj izrazito pri sevu Ch3. Pri tem sevu smo sicer izmerili največjo maksimalno amplitudo izmed vseh himeričnih sevov in pri protokolu intenzitetnih krivulj ugotovili podobno občutljivost kot pri *wt* (obe lastnosti sta rezultat pretiranega vrha ERG pri tej hmeri). Hkrati je fluorescenca Ch3 kanalčka najbolj izrazita in izvira iz rabdoma. Sklepamo, da je v primerjavi s TRP to kanalček z zelo znižano prevodnostjo za Ca^{2+} , kar v zvezi z njegovo visoko ravniyo izražanja in vgraditve v rabdom povzroča izrazito izpraznitev fosfoinozitivov ob aktivaciji fototransdukcije. Odsotnost Ca^{2+} negativne povratne zanke je tako verjetno razlog za pretiran vrh ERG in relativno izrazito zmanjšanje občutljivosti zaradi PDA.

Na drugi strani pa je bil najmanjši padec svetlobne občutljivosti zabeležen pri sevu Ch2. Pri tem sevu kanalčki niso izraženi v tako veliki količini kot pri Ch3, najbrž tudi niso popolnoma funkcionalni, ali pa so konstitutivno aktivni. Slednja teza zadovoljivo pojasnjuje dejstvo, da je maksimalna obremenitev receptorjev pri Ch2 izzvala le majhno desenzitizacijo.

S pomočjo časovne konstante τ smo ovrednotili proces deadaptacije receptorjev, ki predvidoma odraža proces resinteze fosfoinozitivov. Najpočasnejše vračanje svetlobne občutljivosti in najdaljši τ smo zabeležili pri sevu Ch2. Če privzamemo tezo o konstitutivni odprtosti kanalčkov Ch2 za resnično, potem lahko počasno deadaptacijo pojasnimo s siceršnjo obremenitvijo fosfoinozitivnega metabolizma. Seveda kot razlago dopuščamo tudi druge možnosti, kot npr. manjšo funkcionalnost ali manjšo količino kanalčkov Ch2.

Pri sevu Ch 1 smo zabeležili najmanjšo vrednost konstante τ , obenem pa je bila tudi najbolj podobna τ divjega tipa. Domnevamo, da je razlog za to zmanjšana količina omenjenih

himeričnih kanalčkov v mikrovilu, kar ima za posledico manjšo obremenitev celice ob močni svetlobi.

4.4 Sklepi

Pri himeričnih sevih mutant smo pričakovali fenotipsko večjo podobnost *trpl* sevom, torej večjo podobnost himeričnih kanalčkov TRP kanalčkom, saj so vsi trije tipi himeričnih kanalčkov vsebovali TRP transmembransko domeno, ki naj bi po pričakovanjih ključno vplivala na funkcionalne lastnosti kanalčkov. Izkazalo pa se je, da so bili vsi himerični kanalčki bolj podobni prav TRPL kanalčkom, saj smo pri vseh izmerili prehodni (tranzientni) receptorski potencial. Presenetljiva ugotovitev kaže na dejstvo, da terminalni konci kanalčkov v večji meri vplivajo na lastnosti kanalčkov v kompleksnem sistemu kot pa sama transmembranska domena. Očitno je torej vsidranje v mikrovilarno membrano in s tem interakcija s signalkompleksom ključnega pomena za uspešno prevajanje vidne informacije. Pri nobeni himerični mutanti ionski kanalčki niso vsebovali TRP domene na N- in C- terminalnih koncih, zato se najbrž niso bili sposobni docela vključiti v transducisom, rezultat tega pa je zmanjšana tonična komponenta receptorskega potenciala oziroma večja podobnost TRPL ionskim kanalčkom.

Glede na fluorescenco e-GFP smo za ionske kanalčke Ch1 in Ch2 ugotovili, da so premalo abundantni, da bi lahko s to tehniko sklepali na podobnost nativnim kanalčkom, saj pod nobenimi pogoji nismo zaznali fluorescence iz rbdomere (to pa ni lastnost ne enih ne drugih). Zato pa lahko z večjo gotovostjo trdimo, da so himerični kanalčki Ch3 zasidrani v fotoreceptorsko membrano, saj smo jih pod vsemi pogoji zaznali v rbdomeri fotoreceptorskih celic. V tem merilu so torej podobni TRP kanalčkom, kar obenem pojasnjuje oscilacije ERG te himere (slika 10).

TRP in TRPL kanalčki so pri *wt* v medsebojnih interakcijah pri prenosu signala preko membrane (Leung, Geng in Pak, 2000). Zelo verjetno je, da je ta vzajemna povezava nujno

potrebna za učinkovit prenos signala. Pri himeričnih mutantah pa v fototransdukcijski kaskadi sodeluje le en tip ionskih kanalčkov in morda je ravno odsotnost interakcije razlog za prehodne signale in nesposobnost vzdrževanja toničnega odgovora.

Za izzvanje PDA so TRP ionski kanalčki nujno potrebni; samostojno ali v kombinaciji s TRPL (slika 10). TRPL in vsi trije himerični kanalčki zaradi premajhne permeabilnosti za Ca^{2+} in s tem odsotnosti Ca^{2+} negativne povratne zanke ne uspejo preprečiti izpraznitve zaloga fosfoinozolidov. To vodi v refraktarnost fotoreceptorjev in nezmožnost dosega PDA.

5 POVZETEK

Pri zaznavi vidne informacije gre za pretvorbo fotona svetlobe v električno vzburjenje fotoreceptorskih celic, ki nastane s pomočjo odprtja ionskih kanalčkov v mikrovilarni membrani omenjenih celic. Vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) je zaradi dobro raziskanega genoma in lahko dostopnih raziskovalnih prijemov odlično orodje za proučevanje lastnosti teh kanalčkov.

V membrani fotoreceptorjev vinske mušice obstajata dve vrsti ionskih kanalčkov, TRP in TRPL. Ker vloge posameznih tipov kanalčkov še vedno niso jasno definirane, smo v diplomski nalogi želeli raziskati, kako kombinirana sestava himeričnih kanalčkov iz delov nativni kanalčkov vpliva na fizične lastnosti (abundanca, mobilnost) in funkcijske lastnosti (fenotip ERG, prepustnost, občutljivost pripadajočih himeričnih sevov) teh himeričnih kanalčkov.

Pri obeh tipih nativnih kanalčkov je skupna organizacijska shema (transmembranska pora regija iz šestih domen, na katero sta pripeta N- in C-konec), razlikujeta pa se v naslednjih lastnostih: TRP ionski kanalček je glede na TRPL šestkrat bolj abundanten, bolj selektiven in ima nižjo prevodnost. Poleg tega je zasidran v transducisom preko InaD proteina, kar pa za TRPL ne velja, tako da se kanalčka razlikujeta tudi v mobilnosti. Glede na omenjene razlike ločimo različne fenotipe ERG pri klasičnih mutantah mušic, ki vsebujejo samo en tip kanalčkov v membrani fotoreceptorskih celic: mutanta *trp*, ki vsebuje le TRPL kanalčke, ima izrazit prehodni (tranzientni) receptorski potencial, mutanta *trpl*, ki ima le TRP kanalčke pa toničen receptorski potencial z oscilacijami in ERG z zmanjšano nevrnalno komponento.

V poskusu smo uporabili tri himerične seve vinskih mušic, ki so imele v fotoreceptorjih izražene himerične ionske kanalčke, sestavljene iz delov TRP in TRPL. Vse so vsebovale

transmembransko porno regijo TRP kanalčka in različno kombinirane konce TRP in TRPL kanalčkov.

Eksperimentalno smo na sevih *wt*, *trp*^{P343} in vseh treh himeričnih sevih merili ERG, odvisnost amplitud ERG od različnih svetlobnih intenzitet in refraktarnost po PDA. Obenem pa smo s pomočjo fluorescentnega mikroskopa slikali oči mušic in posredno preko fluorescence eGFP proteina, ki je bil na C-terminalnem koncu pripojen na kanalčke, sklepali na razporeditev in s tem mobilnost kanalčkov v fotoreptorskih celicah. S pomočjo omenjenih protokolov smo želeli ugotoviti, katerim od nativnih ionskih kanalčkov bodo himerični ionski kanalčki glede na funkcionalne in fizične lastnosti bolj podobni. Pričakovali smo večjo podobnost TRP kanalčkom, vendar se je izkazalo, da so vsi himerični kanalčki glede na elektrofiziološke lastnosti bolj podobni prav TRPL kanalčkom, saj smo pri vseh zabeležili prehodni (tranzientni) receptorski potencial. Glede na fluorescenco e-GFP smo za kanalčke Ch1 in Ch2 ugotovili, da so premalo abundantni, da bi lahko s to tehniko sklepali na podobnost katerikoli od nativnih kanalčkov, so pa zato kanalčki Ch3 v tem merilu podobni TRP kanalčkom, saj smo jih pri svetlo- in temnoadaptoranih mušicah zaznali v rbdomu.

Ugotovili smo, da terminalni konci kanalčkov v večji meri vplivajo na lastnosti kanalčkov v kompleksnem sistemu kot pa sama transmembranska domena.

6 VIRI

Bähner, M., Frechter, S., Da Silva, N., Minke, B., Paulsen, R., and Huber, A. (2002). Light-regulated subcellular translocation of *Drosophila* TRPL channels induces long-term adaptation and modifies the light-induced current. *Neuron* 34:83–93.

Borst, A. (2009): *Drosophila*'s View on Insect Vision. *Curr Biol* 19: R36–R47

Chevesich, J., Kreuz, A.J., and Montell, C. (1997). Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron* 18:95-105.

Cosens, D.J. and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287.

Devary, O., Heichal, O., Blumenfeld, A., Cassel, D., Suss, E., Barash, S., Rubinstein, C.T., Minke, B., and Selinger, Z. (1987). Coupling of photoexcited rhodopsin to inositol phospholipid hydrolysis in fly photoreceptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:6939-6943.

Dolph, P. J., Ranganathan, R., Colley, N. J., Hardy, R. W., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1993). Arrestin function in inactivation of G protein- coupled receptor rhodopsin *in vivo*. *Science* 260:1910-1916.

Gerster, U. (1997). A Quantitative Estimate of Flash-induced Ca^{2+} - and Na^{+} -influx and Na^{+}/Ca^{2+} -exchange in Blowfly *Calliphora* Photoreceptors. *Vision Research* 37(18):2477-2485

Hamdorf, K., Paulsen, R., Schwemer, J. (1973) Photoregeneration and sensitivity control of photoreceptors of invertebrates. V: Langer H (ed) Biochemistry and physiology of visual pigments, pp. 155-166. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Hamdorf, K., Razmjoo, S. (1979). Photoconvertible pigment states and excitation in *Calliphora*; the induction and properties of the prolonged depolarizing afterpotential. Biophys. Struct. Mechanism 5:137-161.

Hardie, R.C. (1983). Functional organization of the fly retina. V Progress in sensory physiology 5. H. Autrum, D. Ottoson, E.R. Perl, R.F. Schmidt, H. Shimazu in W.D. Willis, uredniki. (New York: Springer-Verlag), pp. 1-81.

Hardie, R.C., Minke, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca₂₊ channel in *Drosophila* photoreceptors. Neuron 8:643-651.

Hardie, R.C., Minke, B. (1993a). Novel Ca₂₊ channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca₂₊ mobilization. Trends Neurosci. 16:371-376.

Hardie, R.C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. J.Exp.Biol. 204:3403-3409

Hardie RC, Gu Y, Martin F, Sweeney ST, Raghu P (2004). In vivo light-induced and basal phospholipase C activity in *Drosophila* photoreceptors measured with genetically targeted phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive ion channels (Kir2.1). J Biol Chem 279(46):47773-82.

Huang J, Liu CH, Hughes SA, Postma M, Schwiening CJ, Hardie RC. (2010) Activation of TRP channels by protons and phosphoinositide depletion in *Drosophila* photoreceptors. Curr Biol. 9; 20(3):189-97)

Kirschfeld, K. (1973). Das neurale Superpositionsauge. V: Fortschritte der Zoologie. 21:229-257. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Leung, H., Geng, C., Pak, W. (2000). Phenotypes of *trpl* Mutants and Interactions between the Transient Receptor Potential (TRP) and TRP-Like Channels in *Drosophila*. *J. Neurosci* 20:6797-6803.

Minke, B., Cook, B. (2002) TRP Channel Proteins and Signal Transduction *Physiol Rev* 82:429–472.

Montell, C., Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323.

Niemeyer, B.A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K., and Zuker, C.S. (1996). The *Drosophila* lightactivated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85:651-659.

Niven, J.E., Vähäsöyrinki, M., Kauranen, M., Hardie, R.C., Juusola, M. & Weckström, M. (2003) The contribution of Shaker K⁺ channels to the information capacity in *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 421:630-634.

Oberwinkler, J., Stavenga, D.G. (2000). Calcium transients in the rhabdomeres of dark- and light-adapted fly photoreceptor cells. *J. Neurosci.* 20:1701–1709.

Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E. (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8:631-642.

Reuss, H., Mojet, M.H., Chyb, S., and Hardie, R.C. (1997). In vivo analysis of the *Drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* 19:1249-1259.

Richter, D. (2007). Struktur-Funktionsanalysen von TRP-Ionenkanälen in den Photorezeptorzellen von *Drosophila melanogaster*. Doktorsko delo, Univerza v Karlsruheju.

Störtkuhl, K.F., Hovemann, B.T., and Carlson, J.R. (1999). Olfactory adaptation depends on the Trp Ca₂₊ channel in *Drosophila*. *J.Neurosci.* 19:4839-4846.

Xu, X.Z., Chien, F., Butler, A., Salkoff, L., and Montell, C. (2000). TRPgamma, a *Drosophila* TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* 26:647-657.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem članom skupine za fiziologijo živali, posebej asist. dr. Gregorju Belušču za vodenje in nesebično strokovno pomoč pri nastanku diplomskega dela.

Hvala tudi moji družini, posebej mami Jožici in sestri Valentini, ker sta verjeli vame in me vseskozi podpirali, fantu Denisu za vso ljubezen, potrpežljivost in tehnično pomoč in vsem ostalim, posebej Darji, ki ste mi vsa študijska leta stali ob strani in jih naredili nepozabna.